

## DETECCIÓN DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES POR MÉTODOS MOLECULARES EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA: ¿POSIBLE MARCADOR PRONÓSTICO?

Luis Sáenz Mateos, Carmen María Cabrera Morales, Teodoro Javier Palomino Muñoz, Pilar García-Chico Sepúlveda.

### Servicio de Análisis Clínicos:

Hospital General Universitario de Ciudad Real.  
C/Obispo Rafael Torija s/n.  
CP. 13005 Ciudad Real. España.

### Autor para correspondencia:

Dr. Luis Sáenz Mateos.  
Hospital General Universitario de Ciudad Real.  
C/ Obispo Rafael Torija s/n  
C.P. 13005 Ciudad Real. España  
e.mail: txito3@hotmail.com

### PALABRAS CLAVE:

Células tumorales circulantes (CTCs), cáncer de mama, RT-PCR.

**Objetivo:** dar a conocer la existencia así como los usos, históricos y actuales, de los denominados enteógenos y/o alucinógenos.

### RESUMEN:

El cáncer de mama es la neoplasia que con más frecuencia se diagnostica en la mujer. Sin embargo, a pesar de los avances en su detección y tratamiento la mortalidad sigue siendo todavía muy significativa, siendo la enfermedad metastásica la principal causa.

En la actualidad se conoce, que la dispersión metastásica de un carcinoma mamario localizado ocurre en estadios tempranos mediante la diseminación de células tumorales circulantes (CTCs). Siendo el principal destino de éstas células, los ganglios linfáticos, médula ósea, sangre periférica, y otros órganos distales.

Por lo tanto, la detección de CTCs en sangre periférica por técnicas moleculares representa un método útil tanto en el diagnóstico de metástasis y recidivas, así como en la evaluación de la progresión de la enfermedad. Además podría funcionar como una "biopsia a tiempo real" para evaluar y monitorizar la respuesta al tratamiento en las pacientes con metástasis, indicando las respondedoras de las no-respondedoras, y posibilitando nuevos tratamientos.

**Objetivo:** Revisar la bibliografía más relevante sobre la detección de CTCs por métodos moleculares como herramienta valiosa en el estudio del carcinoma mamario.

**Estrategia de búsqueda:** Búsqueda de datos bibliográficos en Doyma-Elsevier, y Pubmed. A partir de revisiones sistemáticas y artículos originales nacionales e internacionales, así como de la asistencia a ponencias de congresos.

**Selección de estudios:** Los artículos se han seleccionado atendiendo a la metodología de detección de CTCs, a los tipos de marcadores utilizados y a la relevancia científica obtenida.

## INTRODUCCIÓN

El carcinoma mamario sigue siendo el tipo de neoplasia que con más frecuencia se diagnostica en la población femenina a nivel mundial, con una estimación de aproximadamente un millón de nuevos casos anuales<sup>1</sup>. Representando una de las principales causas de muerte por cáncer en la mujer (15% de todas las muertes por cáncer en las mujeres)<sup>2</sup>.

A pesar de las mejoras en su detección y tratamiento, alrededor de un 30-40% de las pacientes finalmente fallece por la enfermedad, fundamentalmente por el desarrollo de enfermedad metastásica<sup>3</sup>. La dispersión metastásica ocurre en el 50% de los casos de pacientes con carcinoma mamario localizado. Y en alrededor del 30% de las pacientes sin enfermedad detectable en los ganglios linfáticos durante el segundo y tercer año, llegando incluso en algunos casos al quinto año, después del diagnóstico<sup>3-5</sup>.

Existen muchos investigadores que creen que la detección de estas células potencialmente metastásicas en médula ósea (células tumorales diseminadas, DTCs)<sup>3,4</sup> o en sangre periférica (CTCs)<sup>6-8</sup> podrían revelar información pronóstica adicional a la conseguida con el sistema de estadiaje actual del cáncer de mama<sup>9</sup>. Además existen estudios en los que se ha observado que dichas células acumulan un menor número de alteraciones genómicas que las células del tumor primario, sugiriendo que la diseminación de las CTCs ocurre en una fase temprana de la enfermedad<sup>10</sup>. Teniendo en cuenta este dato, muchos de los pacientes diagnosticados de

cáncer de mama en estadios precoces podrían ser considerados como afectados de una enfermedad sistémica<sup>11</sup>. En el caso de la enfermedad metastásica, la detección de CTCs podría ser utilizada como “una biopsia a tiempo real” para evaluar y monitorizar la respuesta al tratamiento<sup>12-14</sup>.

En el presente trabajo se realiza una revisión de los estudios en los que se detectaron CTCs mediante técnicas moleculares de detección de DNA y mRNA a partir de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama. Así como una descripción de los marcadores moleculares más relevantes elegidos para el estudio de dicha enfermedad.

## Células Tumorales Circulantes: CTC's

Las CTCs son células tumorales epiteliales que se encuentran en la sangre periférica de pacientes con cáncer de mama en un estadio temprano<sup>2,15</sup>. Dichas células fueron descritas por primera vez 1869 en pacientes con cáncer<sup>16</sup>. Éste hallazgo permitió que durante mucho tiempo, se supusiera que la presencia de dichas células significaba una progresión de la enfermedad neoplásica y que se podría relacionar directamente con la aparición de metástasis tumorales. Pero su verdadero significado biológico no pudo establecerse por su escaso número y por no contar en aquel momento con técnicas que permitieran su aislamiento e identificación. Gracias al desarrollo de nuevas técnicas, se ha puesto de manifiesto que las CTCs poseen alteraciones genómicas características propias de células malignas, y que rara vez se encuentran en sangre periférica de personas sanas<sup>4,17</sup>.

Se estima que solamente 1 de cada  $10^5$ - $10^6$  CTCs presentes en sangre periférica pueden ingresar en tejidos distantes del tumor primario y que sólo un pequeño porcentaje de estas células va a desarrollar una enfermedad metastásica<sup>18,19</sup>.

La detección de dichas células y su monitorización durante el seguimiento y tratamiento de las pacientes, podría tener un gran valor clínico con respecto a una predicción temprana de recidiva<sup>20-22</sup>, incluso pudiendo superar los resultados obtenidos con los marcadores tumorales séricos clásicos<sup>23,24</sup>. La utilidad clínica de la detección de CTCs ha sido también demostrada en el cáncer de mama metastático<sup>2,25</sup>, en cáncer colorectal y de próstata metastáticos<sup>26,27</sup>. Así como en el cáncer pancreático<sup>28</sup>, gástrico<sup>29</sup>, de vejiga<sup>30</sup>, y de pulmón entre otros<sup>31</sup>.

### MÉTODOS DE DETECCIÓN:

El hecho de que la muestra a analizar sea sangre periférica convierte a esta técnica en un método ventajoso, ya que su recogida es relativamente sencilla, pero además se puede realizar de forma reiterada, al contrario que en las muestras procedentes de médula ósea. Además, muchos pacientes que no presentan células tumorales diseminadas en médula ósea sí presentan células tumorales circulantes en sangre periférica<sup>32,33</sup>.

Las CTCs son indetectables por los métodos de rutina actuales de imagen y laboratorio<sup>34</sup>. Para su detección se utiliza un paso previo de enriquecimiento pre-analítico basado en aspectos morfológicos de las CTCs (como el

tamaño o la densidad), y técnicas de inmunoseparación (de esta manera se incrementa la sensibilidad del ensayo)<sup>23</sup>. Seguimiento de métodos de detección directos basados en inmunocitoquímica, inmunofluorescencia y citometría de flujo, o bien mediante métodos indirectos moleculares (detección de mRNA por RT-PCR)<sup>32,35,36</sup>. El uso de esta gran variedad de métodos de detección para CTCs dificulta la comparación de los resultados entre los distintos estudios.

En la presente revisión nos hemos centrado en los trabajos que han utilizado los ensayos de ácidos nucleicos con multimarcadores moleculares, por ser los más sensibles y específicos; aunque presenten el inconveniente de no poder observar la morfología de las células<sup>37</sup>.

Los más usados son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, cuantitativa o cualitativa), la transcripción reversa (RT-PCR) y algunas variaciones de la misma, en las que se requiere un paso previo de transcripción reversa a partir de mRNA específicos<sup>38</sup> (Tabla 1). La PCR a partir de DNA genómico se utiliza para identificar y caracterizar CTCs, mediante la búsqueda de mutaciones puntuales en oncogenes o genes supresores de tumores; siendo su principal desventaja la gran variabilidad genética entre diferentes tipos histológicos de tumor<sup>32</sup>. Además, la PCR tiene menos especificidad; no está claro si el DNA libre que es amplificado en sangre periférica es de CTCs o si proviene de tumores primarios, tumores metastásicos o de tejido normal<sup>19</sup>.

Tabla1. Métodos de detección de CTCs basados en ensayos de ácidos nucleicos.

Técnica	Volumen de muestra	Principio	Ventajas	Inconvenientes
PCR	5-10 mL	DNA	Alta sensibilidad Fase de enriquecimiento preanalítica corta	Baja especificidad No análisis morfológico
RT-PCR	5-10 mL	RNA	Alta sensibilidad Detección de CTCs viables	No análisis morfológico
<i>Nested</i> RT-PCR	5-10 mL	RNA	Sensibilidad muy alta Detección de CTCs viables	No análisis morfológico
RT-PCR a tiempo real	5-10 mL	RNA	Alta sensibilidad Detección de CTCs viables Cuantificación celular	No análisis morfológico
RT-PCR a tiempo real multimarcador	5-10 mL	RNA	Alta sensibilidad y alta especificidad Detección de CTCs viables Cuantificación celular Significación pronóstica en el cáncer de mama precoz	No análisis morfológico

Sin embargo con la RT-PCR se detecta en sangre periférica pequeñas cantidades de moléculas de mRNA específicas de determinadas proteínas que sólo son expresadas por las células epiteliales del tumor sólido. Éste fenómeno además de demostrar la presencia de la célula tumoral en sangre, también demuestra que posee su maquinaria de transcripción activa y que por tanto su capacidad invasiva está intacta<sup>11,39</sup>.

Sin embargo, el principal inconveniente al que se enfrenta la RT-PCR es la detección de falsos positivos<sup>32</sup>. Mediante: a) la contaminación con DNA genómico durante la extracción del RNA; b) la expresión ilegítima de los marcadores en otros tipos celulares (transcripción en bajas cantidades de un gen específico de tejido en células no específicas); c) la inducción de los genes usados como marcadores por citoquinas

o por factores de crecimiento en trastornos hemáticos<sup>32,40</sup>; y d) la presencia de pseudogenes<sup>32,41,42</sup>.

Tanto con el uso de la *nested* RT-PCR y de la RT-PCR a tiempo real se consigue aumentar la sensibilidad, se puede discriminar la transcripción ilegítima, así como diseñar oligonucleótidos que no amplifiquen DNA genómico o pseudogenes resolviendo en gran parte los falsos positivos que puedan aparecer<sup>43,44</sup>.

Mediante la RT-PCR a tiempo real se consigue una sensibilidad en la detección de 1 CTC entre  $10^6$  células nucleadas de sangre periférica<sup>45-47</sup>. Siendo el método que mejor se perfila para la detección de recidivas por vía hematológica y para identificar el alto riesgo de metástasis en el cáncer de mama<sup>48-50</sup>.

### Papel de las CTCs en el cáncer de mama

Las CTCs han sido ampliamente estudiadas por su valor pronóstico en el cáncer de mama. Cuando están presentes después de una cirugía potencialmente curativa en sangre periférica, es lógico pensar en riesgo de recidiva y por tanto las pacientes son obvias candidatas al tratamiento adyuvante<sup>51</sup>.

Hay autores que describen que en el cáncer de mama precoz, la detección de CTCs mediante la cuantificación tanto por *nested* RT-PCR como por RT-PCR a tiempo real del marcador CK19 (citoqueratina 19) es un factor pronóstico independiente que disminuye el intervalo libre de enfermedad (*disease-free interval*, DFS) y la supervivencia general (“*overall survival*”, OS)<sup>6,52,53</sup>. Así, en un estudio en el que se usó la RT-PCR a tiempo real, se detectaron células CK19 positivas en el 32.7% de pacientes con cáncer de mama en estadio I y II después de quimioterapia adyuvante; y su presencia fue un factor pronóstico independiente que redujo el DFS y la OS<sup>54</sup>. El mismo grupo investigador, en otro trabajo detectó CTCs positivas en sangre periférica para RNAm CK19 en el 21.6% de 167 pacientes de cáncer de mama con ganglio axilar negativo, antes de la administración de quimioterapia adyuvante.

La presencia de estas células fue un peor factor pronóstico independiente del DFS y de la OS<sup>6,7</sup>. Los mismos autores detectaron CTCs positivas en sangre periférica para mRNA CK19 en el 40.8% de 444 pacientes con estadios I-III de cáncer de mama y antes de la quimioterapia adyuvante<sup>8</sup>.

La presencia de estas células fue un factor pronóstico independiente que acortó el DFS y la OS. A pesar de los datos del estudio anterior, sólo el 30% de las pacientes CK19 mRNA positivos para CTCs recidivaron, mientras que un 15% de las pacientes CK19 mRNA negativos terminaron recidivando y muriendo de cáncer de mama después de 5 años de media de seguimiento<sup>8</sup>. Las posibles razones por las cuales a estas últimas pacientes no se les detectó CTCs en sangre periférica podrían ser varias, como por ejemplo por un error en la muestra, podría atribuirse a una subóptima sensibilidad del ensayo o de las citoqueratinas usadas como marcadores de células tumorales circulantes o incluso a la pérdida de los marcadores celulares epiteliales como consecuencia de la diseminación tumoral<sup>55</sup>. Por otro lado, las pacientes en las que se detectó la presencia de CTCs y no sufrieron ninguna recidiva probablemente se debiera a la baja especificidad del marcador utilizado. Por ambas razones, está claro que la determinación de CTCs hasta el momento no ha ofrecido siempre un pronóstico relevante. Para mejorar este aspecto, se ha intentado aumentar la sensibilidad/especificidad en la detección de CTCs para que además de servir como una herramienta pronóstica, defina también las subpoblaciones de CTCs con gran capacidad invasiva y resistente<sup>56,57</sup>. Para ello se han realizado varios estudios con otros marcadores que podrían ser sustitutos de las citoqueratinas como marcadores de recidiva, como por ejemplo mucinas, mamoglobina-A (MGB1), maspina, antígeno carcinoembrionario (CEA), HER2, EGFRvIII y cathepsina D<sup>40,58-66</sup> (en la Tabla 2 se describen los trabajos más destacados).

# ARTÍCULO ESPECIAL

Marcadores moleculares	Tipo de cáncer de mama	Nº pacientes (% de marcador expresado)	Método de detección	Referencia	Resultado
HER2	Operable: antes y después de quimioterapia adyuvante	214 (prequimioterapia 21%. Se elimina 30% tras tratamiento)	Nested RT-PCR	Apostolaki et al. 2007 (64)	La detección de CTCs positivas para HER2 fue un factor pronóstico independiente para el DFS, la detección de dicho marcador tras quimioterapia redujo dicho intervalo pero no la OS.
HER2	Operable: antes de quimioterapia adyuvante	216 (24.5%)	Nested RT-PCR	Apostolaki et al. 2009 (78)	La detección de CTCs positivas para HER2 fue un factor pronóstico independiente para el DFS y la OS, la detección de dicho marcador antes de la quimioterapia redujo dichos intervalos.
MGA	Operable	101 (13.9%)	Nested RT-PCR	Ntoulia et al. 2006 (61)	La detección de CTCs positivas MGA fue un factor de riesgo independiente que redujo el DFS. El 64,3% de las pacientes MGA positivas, recidivaron.
CK-19, MGA y HER2	Precoz: antes de quimioterapia adyuvante	175 (CK-19: 41.1%; MGA: 8%; HER2: 28.6%)	RT-PCR a tiempo real multimarcador	Ignatiadis et al. 2008 (69)	La presencia de CTCs redujo el DFS y la OS
CK-19	Precoz: después de quimioterapia adyuvante	179 (41%)	RT-PCR a tiempo real	Xenidis et al. 2009 (109)	La detección de CTCs positivas para CK-19 fue un factor independiente que redujo el DFS y la OS tras la quimioterapia adyuvante, indicando enfermedad residual resistente.
ER/PR	Precoz	48 (ER: 25%; PR: 4%)	RT-PCR	Fehm et al. 2009 (110)	El perfil de expresión de estos marcadores en las CTCs difiere del perfil del tumor primario influyendo en la elección del posible tratamiento.
CK-19	Pacientes en quimioterapia	30 (CK-19: 33%)	Nested RT-PCR	Bozionello et al. 2004 (111)	30 pacientes CK-19 positivos en CTCs y DTCs, que tras quimioterapia 28 (93%) negativizan la expresión de CK-19 manteniéndose negativa hasta 12 meses evaluando la evolución del tratamiento.
CK-19	Precoz: antes de quimioterapia adyuvante	444 (CK-19: 40.8%)	RT-PCR	Ignatiadis et al. 2007 (8)	CTCs: mal pronóstico clínico para los pacientes antes de la quimioterapia adyuvante
Survivina, TERT y MGA.	Operable y tratable: antes de quimioterapia	96 (Survivina: 36.2%; Telomerasa: 59.6%; MGA: 33%)	RT-PCR a tiempo real multimarcador	Shen et al. 2009 (71)	La detección conjunta de los marcadores aumentó la sensibilidad (70.2%) y la especificidad (100%) pudiendo tener significado clínico en la monitorización temprana de estos pacientes que podrían desarrollar metástasis o recidivar.
STC-1, GalNacT y MAGE-A3	Precoz	90 (al menos 1 marcador detectado en el 29% pacientes estadio I, 45% estadio II y 77% estadio III).	RT-PCR a tiempo real multimarcador	Nakagawa et al. 2007 (74)	Los niveles de CTCs obtenidos correlacionan con la progresión tumoral
MGA y Maspina	Pacientes antes y después de quimioterapia	85 (pretratamiento, MGA: 11.7%; Maspina: 23.5%)	Nested RT-PCR	Bitisik et al. 2010 (105)	El 33% de los pacientes MGA positivos después de la terapia desarrollaron metástasis. La detección de MGA podía utilizarse para evaluar la respuesta a la terapia, mientras que la expresión de maspina indicaría mayor resistencia.
TF	Metastásico	16 (TF: 80%)	Nested RT-PCR	Otero LL et al. 2011 (94)	Las pacientes con niveles altos de expresión de las CTCs del marcador TF obtuvieron una peor OS.

Existen muchos investigadores que basándose en la heterogeneidad de las CTCs han optado por realizar ensayos utilizando múltiples marcadores a la vez por RT-PCR<sup>67-69</sup>. Pero hay que destacar un estudio en concreto, en el que por primera vez se describe el uso de la RT-PCR a tiempo real con multimarcadores (CK19, mamoglobina-A y HER2) para detectar CTCs. En dicho estudio se pronostica un peor resultado clínico en pacientes con cáncer de mama precoz y demuestra ser un ensayo mucho más sensible y específico comparado con la detección de CTCs por RT-PCR a tiempo real con un único marcador<sup>69</sup>. Otros investigadores utilizando el mismo método con los marcadores p1B, PS2, CK19 and EGP2 en pacientes con cáncer de mama metastásico, observaron que la positividad para estos marcadores se asociaba (29/94 pacientes) con una peor supervivencia libre de progresión (“progression-free survival”, PFS) y peor OS. Para las pacientes CTCs positivas la supervivencia media fue de 6 meses, mientras que las pacientes CTCs negativas la supervivencia media fue de 18 meses<sup>25</sup>. Estos estudios junto con algunos otros descritos en la Tabla 2, evidencian que el uso de varios marcadores aumenta la probabilidad de detectar CTCs que hayan perdido algún marcador epitelial como consecuencia de la diseminación tumoral<sup>70,71</sup>.

### **Clásicos y nuevos marcadores:**

#### Citoqueratina 19

Es una proteína de filamento intermedio expresada en todos los epitelios y en un pequeño número de otros tejidos. Existen numerosos estudios que la presentan como un marcador prometedor y sensible para la detección de

células de cáncer de mama en ganglios linfáticos axilares, sangre periférica y médula ósea<sup>52,67,72</sup>. Pero hay autores que han encontrado expresión de este marcador en sangre periférica<sup>41</sup> y en médula ósea de pacientes sanos, e incluso en pacientes con neoplasias hematológicas<sup>73</sup>, cuestionando su utilidad como marcador específico de detección de CTCs en el cáncer de mama. En cualquier caso la citoqueratina 19 es estable y tiene un nivel alto de expresión en tumores epiteliales, lo que la convierte en un marcador general de cánceres epiteliales<sup>18</sup>. Y en un marcador potencial de enfermedad mínima residual en sangre en el cáncer de mama<sup>67</sup>, pudiéndose detectar entre el 20% al 40% de las pacientes mediante RT-PCR<sup>75</sup>.

#### HER-2

Se trata de una glicoproteína perteneciente a la familia de receptores celulares de membrana ErbB con actividad tirosinquinasa en su dominio intracitoplasmático<sup>76</sup>. La amplificación del gen Her-2 se ha encontrado en el 25-30% de los tumores de mama estudiados, y resulta en un aumento de expresión de la proteína que correlaciona positivamente con el número de metástasis y es indicativo de enfermedad recurrente<sup>77</sup>. Existe un estudio reciente en el que se detectó la expresión de HER-2 en CTCs en 53 pacientes de un total de 216 con cáncer de mama precoz antes del tratamiento adyuvante. Este dato se asoció con una peor DFS y OS. Este trabajo, junto con otros reflejados en la Tabla 2, concluye que el nivel de mRNA de HER-2 podría ser un marcador pronóstico independiente importante para la detección de CTCs en esta clase de pacientes<sup>78</sup>.

## Telomerasa

La telomerasa (TERT) es una ribonucleoproteína que pertenece a un complejo multiproteico con actividad retrotranscriptasa, que mantiene la longitud de los telómeros de los cromosomas. Se ha encontrado una expresión positiva en el 90% de los cánceres siendo esta paso crucial para que una célula se transforme en inmortal<sup>79</sup>. La TERT no se expresa generalmente en las células somáticas diferenciadas. Este marcador se ha detectado en plasma<sup>80</sup>, en células mononucleares de sangre periférica<sup>81</sup>, y en tumores primarios de diferente histología incluido el cáncer de mama<sup>82,83</sup>. En un estudio actual se ha encontrado la expresión de TERT en CTCs en el 59,6% de los pacientes con cáncer de mama estudiados; siendo negativa la expresión de dicho marcador en voluntarios sanos y controles<sup>71</sup>. La expresión de TERT en estas pacientes correlacionó con la clasificación TNM (internationally used tumor, node, metastases staging system) y la metástasis linfática. TERT se expresó en el 24.2, 67.9, 80, y 100% de los pacientes clasificados por la TNM en estadios I, II, III y IV respectivamente. Para aumentar la sensibilidad y la especificidad del estudio, los autores incluyeron la determinación de otros marcadores como la survivina y la mamoglobina mediante RT-PCR a tiempo real y concluyeron que este ensayo con multimarcadores podría ser muy útil en la monitorización clínica del cáncer de mama precoz y en su diseminación por vía hematogénea desarrollando metástasis o recidivas<sup>71</sup>.

## Maspina

La maspina es una proteína relacionada

con la familia serpina de inhibidores de la proteasa. Es sintetizada por las células epiteliales del tejido mamario y aunque se desconoce su mecanismo de acción, se sabe desde hace más de 10 años que actúa como una proteína supresora de tumores inhibiendo la motilidad, la capacidad invasiva y metastásica de las células cancerígenas de la mama<sup>84,85</sup>.

Esta descrito que la maspina es uno de los pocos genes expresados por las células epiteliales, capaz de discriminar entre tumores primarios y sus metástasis, sugiriendo que las metástasis del cáncer de mama son distintas a nivel molecular de sus tumores primarios<sup>86</sup>. Tanto por inmunohistoquímica, hibridación in situ como por RT-PCR se ha visto disminuida la expresión de maspina en tumores avanzados (metástasis), este dato sugiere que pacientes de cáncer de mama con menor expresión de maspina podrían tener un mayor riesgo de desarrollar metástasis<sup>87,88</sup>.

Gracias a los ensayos basados en la detección de ácidos nucleicos, se ha conseguido aumentar la sensibilidad en la detección de las CTCs analizando la expresión de maspina en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama<sup>88-90</sup>. Como además se trata de una proteína expresada únicamente por las células epiteliales, la convierte en un marcador específico para la detección de células ocultas de cáncer de mama, no habiéndose detectado ni en sangre periférica, ni en médula ósea de personas sanas, ni en pacientes con neoplasias hematológicas<sup>73,89,90</sup>.

### **Factor Tisular**

El Factor Tisular (TF), también conocido como tromboplastina o factor III de la coagulación, es una glicoproteína transmembrana que actúa como iniciador de la cascada de la coagulación. En los procesos de metástasis dicho marcador se encuentra sobreexpresado sugiriendo que podría jugar un importante papel<sup>91</sup>. Existe un trabajo muy actual con 16 pacientes con carcinoma de mama avanzado, en el que utilizando la *nested* RT-PCR, se observó que el 80% de las pacientes con elevada expresión de TF terminaron falleciendo, mientras que solo el 18% de aquellas con bajos niveles de TF tuvieron el mismo comportamiento. Las pacientes con altos niveles de expresión de TF mostraron una peor OS, lo que convierte al TF como un potencial marcador pronóstico en el cáncer de mama metastásico. Pero la mayor objeción que presenta éste marcador son los posibles falsos positivos, aunque no se expresa en la mayoría de las células expuestas al flujo sanguíneo<sup>92</sup>; sin embargo los monocitos, células endoteliales, y los macrófagos en condiciones de inflamación podrían expresarlo por estimulación de citoquinas<sup>93</sup>. Los autores concluyen que necesitan nuevos estudios para analizar personas sanas, y pacientes con otras enfermedades para establecer la especificidad del marcador. Y establecer mediante RT-PCR a tiempo real un valor de corte para discriminar entre los niveles de TF en enfermedades inflamatorias y los niveles en el cáncer de mama metastásico<sup>94</sup>.

### **Mamoglobina A**

La mamoglobina A (MGA) es una proteína que exhibe homología con varias proteínas

secretoras epiteliales, formando parte de la superfamilia de las secretoglobinas (SCGB)<sup>95</sup>. Su expresión no está asociada con la lactancia sino con la proliferación de la glándula mamaria y la diferenciación terminal<sup>95</sup>. Sin embargo, hasta el día de hoy su función es desconocida<sup>96</sup>.

La determinación de MGA se ha convertido en uno de los principales métodos para la detección de CTCs mediante RT-PCR, y es el marcador de cáncer de mama más estudiado después de la citoqueratina 19 (CK-19)<sup>32</sup>. Existen datos que reafirman a la MGA y a la maspina como marcadores específicos para cáncer de mama, expresándose en un 97% y un 80% de las muestras de tejido con carcinoma mamario, respectivamente<sup>73</sup>. Hay un estudio actual que demuestra como la detección de CTCs por *nested* RT-PCR, usando como único marcador la mamoglobina en pacientes con cáncer de mama invasivo en el momento del diagnóstico, se asocia con un peor pronóstico, los autores proponen a la mamoglobina como un indicador pronóstico adicional<sup>97</sup>.

Aunque parecía que la expresión de MGA estaba restringida a la glándula mamaria adulta<sup>98</sup>, en estudios recientes se ha detectado también en tejidos normales y malignos del tracto genital femenino (cérvix, útero y ovario) y en efusiones malignas ginecológicas<sup>99-103</sup>. Sin embargo, se ha encontrado una expresión de MGA significativamente mayor en tejidos de mama respecto de tejidos de ovario y de endometrio<sup>101</sup>. También se ha visto expresión de MGA en tejidos normales y en tumores de las glándulas sudoríparas<sup>103</sup>, y salivales<sup>102</sup>; y raramente y en bajo grado de expresión en otros tejidos<sup>99</sup>.

En sangre periférica de personas sanas sin embargo, son numerosos los trabajos en los que no se detecta ningún caso de expresión de MGA, demostrando su gran especificidad (superando incluso a la CK19)<sup>40,104,106</sup>.

A diferencia de la maspina, la MGA no es inducida por ninguna citoquina lo que se traduce en una mayor especificidad. Al no haber interferencia por citocinas se evita de este modo posibles falsos positivos<sup>107</sup>. Los resultados de numerosos estudios sugieren que MGA es un marcador de alta especificidad e independiente de los factores pronósticos tradicionalmente utilizados en el cáncer de mama<sup>55,61,100,106,108</sup>.

## CONCLUSIONES:

Las perspectivas futuras en el uso de esta tecnología y de estos marcadores para la detección de CTCs son muy buenas. Pero es necesario realizar nuevos estudios clínicos para corroborar si la expresión de estos marcadores en sangre periférica de pacientes con carcinoma mamario (principalmente en las pacientes sin evidencia de metástasis), puede brindar un pronóstico en la evolución de la enfermedad y contribuir en la elección del tratamiento que haya que seguir para prevenir su recidiva. Además, la estandarización de las técnicas moleculares para la determinación de CTCs en los laboratorios clínicos asistenciales es hoy día relativamente sencilla.

En un futuro cercano, la detección de este tipo de células y su estudio genético en profundidad, podría ser una herramienta predictiva útil para la individualización del tratamiento del cáncer de mama.

## AGRADECIMIENTOS:

Los autores agradecen a la Dra. Juana María Mateos Muñoz su ánimo y apoyo en la preparación de este trabajo.

## BIBLIOGRAFÍA:

1. Lee JA, Kim KI, Bae JW, Jung YH, An H, Lee ES. Triple negative breast cancer in Korea-distinct biology with different impact of prognostic factors on survival. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Aug; 123(1):177-87.
2. Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, et al. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23:1420-30.
3. Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Holle R, von Minckwitz G, Solomayer EF, et al. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88:1652-8.
4. Braun S, Pantel K, Müller P, Janni W, Hepp F, Kantenich CR, et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* 2000;342:525-33.
5. Bernd Gerber, Mathias Freund, Toralf Reimer. Recurrent breast cancer: treatment strategies for maintaining and prolonging good quality of life. *Dtsch Arztebl Int.* 2010 Feb;107(6):85-91.
6. Stathopoulou A, Vlachonikolis I, Mavroudis D, Perraki M, Kouroussis Ch, Apostolaki S, et al. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *J Clin Oncol* 2002;20:3404-12.
7. Xenidis N, Perraki M, Kafousi M, Apostolaki S, Bolonaki I, Stathopoulou A, et al. Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mRNA-positive cells detected by real-time polymerase chain reaction in node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2006;24:3756-62.

8. Ignatiadis M, Xenidis N, Perraki M, Apostolaki S, Politaki E, Kafousi M, et al. Different prognostic value of cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells according to estrogen receptor and HER2 status in early breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:5194-202.
9. Fehm T, Müller V, Alix-Panabières C, Pantel K. Micrometastatic spread in breast cancer: detection, molecular characterization and clinical relevance. *Breast Cancer Res* 2008; 10(suppl 1):S1.
10. Jiang WG, Martin TA, Mansel RE. Molecular detection of micro-metastasis in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2002;43:13-31.
11. Hüseman Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, Burghart E, et al. Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* 2008;13:58-68.
12. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351:781-91.
13. Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, Stopeck A, Borden E, Miller MC, et al. Circulating tumor cells versus imaging—predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:6403-9.
14. Cerveira N, Torres L, Rocha P, Bizarro S, Pereira D, Abreu J, et al. Highly sensitive detection of the MGB1 transcript (mammaglobin) in the peripheral blood of breast cancer patients. *Int J Cancer*. 2004;108:592-5.
15. Müller V, Stahmann N, Riethdorf S, Rau T, Zabel T, Goetz A, et al. Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity. *Clin Cancer Res*. 2005;11:3678-85.
16. Asworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in tumors were seen in the blood after death. *Aust Med J* 1869; 14:146-7.
17. Fehm T, Sagalowsky A, Clifford E, Beitsch P, Saboorian H, Euhus D, et al. Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant. *Clin Cancer Res* 2002;8:2073-84.
18. Fabisiewicz A, Kulik J, Kober P, Brewcyfska E, Piefkowski T, Siedlecki JA. Detection of circulating breast cancer cells in peripheral blood by a two-marker reverse transcriptase- polymerase chain reaction assay. *Acta Biochim Pol*. 2004;51:747-55.
19. Ring A, Smith IE, Dowsett M. Circulating tumour cells in breast cancer. *Lancet Oncol*. 2004;5:79-88.
20. Tewes M, Aktas B, Welt A, Mueller S, Hauch S, Kimmig R, et al. Molecular profiling and predictive value of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: an option for monitoring response to breast cancer related therapies. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 115:581-90.
21. Biggers B, Knox S, Grant M, Kuhn J, Nemunatitis J, Fisher T, et al. Circulating tumor cells in patients undergoing surgery for primary breast cancer: preliminary results of a pilot study. *Ann Surg Oncol* 2009; 16:969-71.
22. Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, Krauspe S, Malarski N, Gajda M, et al. Monitoring the response of circulating epithelial tumor cells to adjuvant chemotherapy in breast cancer allows detection of patients at risk of early relapse. *J Clin Oncol* 2008; 26:1208-15.
23. Gerges N, Janusz R, Jabado N. New technologies for the detection of circulating tumour cells. *British Medical Bulletin* 2010; 94: 49-64.
24. American Society of Clinical Oncology. Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2843-2877.
25. Weigelt B, Bosma AJ, Hart AA, Rodenhuis S, Van 't Veer LJ. Marker genes for circulating tumour cells predict survival in metastasized breast cancer patients. *Br J Cancer* 2003;88:1091-4.
26. Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:3213-21.

27. de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:6302-9.
28. Kurihara T, Itoi T, Sofuni A, Itokawa F, Tsuchiya T, Tsuji S, et al. Detection of circulating tumor cells in patients with pancreatic cancer: a preliminary result. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2008;15:189-95.
29. Szatanek R, Drabik G, Baran J, Kolodziejczyk P, Kulig J, Stachura J, et al. Detection of isolated tumour cells in the blood and bone marrow of patients with gastric cancer by combined sorting, isolation and determination of MAGE-1, -2 mRNA expression. *Oncol Rep* 2008;19:1055-60.
30. Beecken WD, Engl T, Engels K, Blumenberg C, Oppermann E, Camphausen K, et al. Clinical relevance of maspin expression in bladder cancer. *World J Urol* 2006;24:338-44.
31. Woenckhaus M, Bubendorf L, Dalquen P, Foerster J, Blaszyk H, Mirlacher M, et al. Nuclear and cytoplasmic maspin expression in primary non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol* 2007;60:483-6.
32. Lacroix M. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 2006;13:1033-67.
33. Slade MJ, Payne R, Riethdorf S, Ward B, Zaidi SA, Stebbing J, Palmieri C, et al. Comparison of bone marrow, disseminated tumour cells and blood-circulating tumour cells in breast cancer patients after primary treatment. *Br J Cancer* 2009;100:160-6.
34. Gradilone A, Raimondi C, Nicolazzo C, Petracca A, Gandini O, Vincenzi B, et al. Circulating tumor cells lacking cytokeratin in breast cancer: the importance of being mesenchymal. *J Cell Mol Med.* 2011 Feb 25. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01285.x.
35. Ignatiadis M, Georgoulis V, Mavroudis D. Circulating tumor cells in breast cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008;20: 55-60.
36. Mostert B, Sleijfer S, Foekens JA, Gratama JW. Circulating tumor cells (CTCs): detection methods and their clinical relevance in breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2009 Aug;35(5):463-74.
37. Ring AE, Zabaglo L, Ormerod MG, Smith IE, Dowsett M. Detection of circulating epithelial cells in the blood of patients with breast cancer: comparison of three techniques. *Br J Cancer* 2005;92:906-12.
38. Gilbey AM, Burnett D, Coleman RE, Holen I. The detection of circulating breast cancer cells in blood. *J Clin Pathol.* 2004;57:903-11.
39. Lin YC, Wu Chou YH, Liao IC, Cheng AJ. The expression of mammaglobin mRNA in peripheral blood of metastatic breast cancer patients as an adjunct to serum tumor markers. *Cancer Lett.* 2003;191:93-9.
40. Zach O, Kasparu H, Krieger O, Hehenwarter W, Girschikofsky M, Lutz D. Detection of circulating mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients via a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for mammaglobin mRNA. *J Clin Oncol* 1999;17:2015-9.
41. Jung R, Krüger W, Hosch S, Holweg M, Kröger N, Gutensohn K, et al. Specificity of reverse transcriptase polymerase chain reaction assays designed for the detection of circulating cancer cells is influenced by cytokines in vivo and in vitro. *Br J Cancer* 1998;78:1194-8.
42. Kowalewska M, Chechlinska M, Markowicz S, Kober P, Nowak R. The relevance of RT-PCR detection of disseminated tumour cells is hampered by the expression of markers regarded as tumour-specific in activated lymphocytes. *Eur J Cancer* 2006;42:2671-4.
43. Stathopoulou A, Ntoulia M, Perraki M, Apostolaki S, Mavroudis D, Malamos N, et al. A highly specific real-time RT-PCR method for the quantitative determination of CK-19 mRNA positive cells in peripheral blood of patients with operable breast cancer. *Int J Cancer* 2006;119:1654-9.

44. Baker M, Gillanders WE, Mikhitarian K, Mitas M, Cole D. The molecular detection of micrometastatic breast cancer. *Am J Surg*. 2003;186:351-8.
45. Lianidou ES, Markou A. Circulating tumor cells in breast cancer: detection systems, molecular characterization, and future challenges. *Clin Chem*. 2011 Sep;57(9):1242-55.
46. Houghton RL, Dillon DC, Molesh DA, Zehentner BK, Xu J, Jiang J, et al. Transcriptional complementarity in breast cancer: application to detection of circulating tumor cells. *Mol Diagn*. 2001;6:79-91.
47. Sieuwerts AM, Kraan J, Bolt-de Vries J, van der Spoel P, Mostert B, Martens JW, et al. Molecular characterization of circulating tumor cells in large quantities of contaminating leukocytes by a multiplex real-time PCR. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 Dec;118(3):455-68.
48. Alix-Panabières C, Riethdorf S, Pantel K. Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 5013–5021.
49. Bernards R, Weinberg RA. A progression puzzle. *Nature* 2002; 418: 823.
50. Gradilone A, Naso G, Raimondi C, Cortesi E, Gandini O, Vincenzi B, et al. Circulating tumor cells (CTCs) in metastatic breast cancer (MBC): prognosis, drug resistance and phenotypic characterization. *Ann Oncol*. 2011 Jan;22(1):86-92.
51. Ignatiadis M, Georgoulas V, Mavroudis D. Micrometastatic disease in breast cancer: Clinical implications. *European journal of cancer* 2008; 44: 2726-36.
52. Stathopoulou A, Gizi A, Perraki M, Apostolaki S, Malamos N, Mavroudis D, et al. Real-time quantification of CK-19 mRNA-positive cells in peripheral blood of breast cancer patients using the lightcycler system. *Clin. Cancer Res*. 9(14)(2003) 5145–5151.
53. Daskalaki A, Agelaki S, Perraki M, Apostolaki S, Xenidis N, Stathopoulos E, et al. Detection of cytokeratin-19 mRNA-positive cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with operable breast cancer. *Br J Cancer* 2009; 101:589-97.
54. Xenidis N, Apostolaki S, Perraki M. Circulating CK-19 mRNA (+) cells in patients with stage I and II breast cancer after the completion of adjuvant chemotherapy: evaluation of their prognostic relevance. *Breast Cancer Res Treat* 2007;106(Suppl. 1) [abstract 109].
55. Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Opinion: migrating cancer stem cells – an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2005;5:744–9.
56. Gazzaniga P, Gradilone A, Naso G, Cortesi E, Gianni W, Frati L, et al. Chemoresistance profile of circulating tumor cells: toward a clinical benefit? *Int J Cancer* 2008; 123: 1730–1732.
57. Gazzaniga P, Naso G, Gradilone A, Cortesi E, Gandini O, Gianni W, et al. Chemosensitivity profile assay of circulating cancer cells (CTCs): prognostic and predictive value in epithelial tumors. *Int J Cancer* 2010; 126(10): 2437–2447.
58. de Cremoux P, Extra JM, Denis MG, Pierga JY, Boustyn E, Nos C, et al. Detection of MUC1- expressing mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients by real-time polymerase chain reaction. *Clin Cancer Res* 2000;6:3117–22.
59. Zach O, Kasparu H, Wagner H, Krieger O, Lutz D. Prognostic value of tumour cell detection in peripheral blood of breast cancer patients. *Acta Med Austriaca Suppl* 2002;59:32–4.
60. Silva AL, Tome MJ, Correia AE, Passos-Coelho JL. Human mammaglobin RT-PCR assay for detection of occult breast cancer cells in hematopoietic products. *Ann Oncol* 2002;13:422–9.
61. Ntoulia M, Stathopoulou A, Ignatiadis M, Malamos N, Mavroudis D, Georgoulas V, et al. Detection of mammaglobin A-mRNA-positive circulating tumor cells in peripheral blood of patients with operable breast cancer with nested RT-PCR. *Clin Biochem* 2006;39:879–87.

62. Stathopoulou A, Mavroudis D, Perraki M, Apostolaki S, Vlachonikolis I, Lianidou E, et al. Molecular detection of cancer cells in the peripheral blood of patients with breast cancer: comparison of CK-19, CEA and maspin as detection markers. *Anticancer Res* 2003;23:1883-90.
63. Brandt B, Roetger A, Heidl S, Jackisch C, Lelle RJ, Assmann G, et al. Isolation of blood-borne epithelium-derived c-erbB-2 oncoprotein-positive clustered cells from the peripheral blood of breast cancer patients. *Int J Cancer* 1998;76:824-8.
64. Apostolaki S, Perraki M, Pallis A, Bozionelou V, Agelaki S, Kanellou P, et al. Circulating HER2 mRNA-positive cells in the peripheral blood of patients with stage I and II breast cancer after the administration of adjuvant chemotherapy: evaluation of their clinical relevance. *Ann Oncol* 2007;18:851-8.
65. Silva HA, Abraúl E, Raimundo D, Dias MF, Marques C, Guerra C, et al. Molecular detection of EGFRvIII-positive cells in the peripheral blood of breast cancer patients. *Eur J Cancer* 2006;42:2617-22.
66. Solomayer EF, Diel IJ, Meyberg GC, Gollan C, Bode S, Wallwiener D, et al. Prognostic relevance of cathepsin D detection in micrometastatic cells in the bone marrow of patients with primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998;49:145-54.
67. Reinholz MM, Nibbe A, Jonart LM, Kitzmann K, Suman VJ, Ingle JN, et al. Evaluation of a panel of tumor markers for molecular detection of circulating cancer cells in women with suspected breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:3722-32.
68. Zehentner BK, Secrist H, Hayes DC, Zhang X, Ostenson RC, Loop S, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of breast cancer patients during or after therapy using a multigene real-time RT-PCR assay. *Mol Diagn Ther* 2006;10:41-7.
69. Ignatiadis M, Kallergi G, Ntoulia M, Perraki M, Apostolaki S, Kafousi M, et al. Prognostic value of the molecular detection of circulating tumor cells using a multimarker reverse transcription-PCR assay for cytokeratin 19, mammaglobin A, and HER2 in early breast cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:2593-600.
70. Chen Y, Zou TN, Wu ZP, Zhou YC, Gu YL, Liu X, et al. Detection of cytokeratin 19, human mammaglobin, and carcinoembryonic antigen-positive circulating tumor cells by three-marker reverse transcription-PCR assay and its relation to clinical outcome in early breast cancer. *Int J Biol Markers*. 2010 Apr-Jun;25(2):59-68.
71. Shen C, Hu L, Xia L, Li Y. The detection of circulating tumor cells of breast cancer patients by using multimarker (Survivin, hTERT and hMAM) quantitative real-time PCR. *Clin Biochem*. 2009 Feb;42(3):194-200.
72. Moscinski L, Trudeau W, Fields K, Eifenbein G. High-sensitivity detection of minimal residual breast carcinoma using the polymerase chain reaction and primers for cytokeratin 19. *Diagnostic Mol Pathol* 1996, 5, 173±180.
73. Corradini P, Voena C, Astolfi M, Dell'Oro S, Pilotti S, Arrigoni G, et al. Maspin and mammaglobin genes are specific markers for RT-PCR detection of minimal residual disease in patients with breast cancer. *Ann Oncol*. 2001;12:1693-8.
74. Nakagawa T, Martinez SR, Goto Y, Koyanagi K, Kitago M, Shingai T, et al. Detection of circulating tumor cells in early-stage breast cancer metastasis to axillary lymph nodes. *Clin Cancer Res*. 2007 Jul 15;13(14):4105-10.
75. Saloustros E, Mavroudis D. Cytokeratin 19-positive circulating tumor cells in early breast cancer prognosis. *Future Oncol*. 2010 Feb;6(2):209-19.
76. Albanell Mestres J, Muñoz Mateo M, Gascón P. ErbB tyrosine kinase receptor inhibitors in breast cancer. *Rev Oncol* 2004; 6:12-21.
77. Carney WP, Neumann R, Lipton A, Leitzel K, Ali S, Price CP. Monitoring the circulating levels of the HER2/neu oncoprotein in breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2004; 5(2):105-116.
78. Apostolaki S, Perraki M, Kallergi G, Kafousi M, Papadopoulos S, Kotsakis A, et al. Detection of occult HER2 mRNA-positive tumor cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their

- prognostic relevance. *Breast Cancer Res Treat.* 2009 Oct;117(3):525-34.
79. Friel AM, Corcoran C, Crown J, O'Driscoll L. Relevance of circulating tumor cells, extracellular nucleic acids, and exosomes in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Oct;123(3):613-25.
80. Terrin L, Rampazzo E, Pucciarelli S, Agostini M, Bertorelle R, Esposito G, et al. Relationship between tumor and plasma levels of hTERT mRNA in patients with colorectal cancer: implications for monitoring of neoplastic disease. *Clin Cancer Res* 2008; 14(22):7444–7451.
81. Li H, Diao TY, Zhou ZY, Yang FY, Ma Q, Li QH. Relationship between the expression of hTERT and EYA4 mRNA in peripheral blood mononuclear cells with the progressive stages of carcinogenesis of the esophagus. *J Exp Clin Cancer Res.* 2009 Nov 25;28:145.
82. Elder EE, Xu D, Höög A, Enberg U, Hou M, Pisa P, et al. KI-67 AND hTERT expression can aid in the distinction between malignant and benign pheochromocytoma and paraganglioma. *Mod Pathol.* 2003 Mar;16(3):246-55.
83. Chen XQ, Bonnefoi H, Pelte MF, Lyautey J, Lederrey C, Movarekhi S, et al. Telomerase RNA as a detection marker in the serum of breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2000 Oct;6(10):3823-6.
84. Zou Z, Anisowicz A, Hendrix MJ, Thor A, Neveu M, Sheng S, et al. Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells, *Science* 1994, 263, 526±529.
85. Zhang M, Volpert O, Shi YH, Bouck N. Maspin is an angiogenesis inhibitor. *Nat Med* 2000;6:196–9.
86. Vecchi M, Confalonieri S, Nuciforo P, Viganò MA, Capra M, Bianchi M, et al. Breast cancer metastases are molecularly distinct from their primary tumors. *Oncogene* 2008;27: 2148-58.
87. Joensuu K, Leidenius M, Andersson L, Heikkilä P. High expression of maspin is associated with early tumor relapse in breast cancer. *Human Pathology* 2009, 40, 1143–1151.
88. Maass N, Hojo T, Rösel F, Ikeda T, Jonat W, Nagasaki K. Down regulation of the tumor suppressor gene maspin in breast carcinoma is associated with a higher risk of distant metastasis. *Clinical Biochemistry* 2001, 34, 303–307.
89. Luppi M, Morselli M, Bandieri E, Federico M, Marasca R, Barozzi P, et al. Sensitive detection of circulating breast cancer cells by reverse-transcriptase polymerase chain reaction of maspin gene. *Ann Oncol* 1996; 7: 619-24.
90. Sabbatini R, Federico M, Morselli M, Depenni R, Cagossi K, Luppi M, et al. Detection of circulating tumor cells by reverse transcriptase polymerase chain reaction of maspin in patients with breast cancer undergoing conventional- dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1914-20.
91. Versteeg HH, Spek CA, Peppelenbosch MP, Richel DJ. Tissue factor and cancer metastasis: the role of intracellular and extracellular signaling pathways. *Mol Med.* 2004; 10(1-6):6–11.
92. Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol* 1989; 134(5):1087–97.
93. Osterud B, Bjørklid E. The production and availability of tissue thromboplastin in cellular populations of whole blood exposed to various concentrations of endotoxin. An assay for detection of endotoxin. *Scand J Haematol* 1982; 29(2):175–84.
94. Otero LL, Alonso DF, Castro M, Cinat G, Gabri MR, Gomez DE. Tissue factor as a novel marker for detection of circulating cancer cells. *Biomarkers.* 2011 Feb;16(1):58-64.
95. Watson MA, Darrow C, Zimonjic DB, Popescu NC, Fleming TP. Structure and transcriptional regulation of the human mammaglobin gene, a breast cancer associated member of the uteroglobin gene family localized to chromosome 11q13. *Oncogen.* 1998;16:817-24.
96. Gargano G, Agnese V, Calò V, Corsale S, Augello C, Bruno L, et al. Detection and quantification of mammaglobin in the blood of breast cancer patients: can it be useful as a potential clinical marker? Preliminary results of a GOIM (Gruppo