

Células tumorales circulantes en cáncer de mama: un posible riesgo biológico

RESUMEN

El cáncer es una enfermedad que afecta a millones de personas en el mundo. Por esto, la investigación que se realiza día a día es extenuante. Sin embargo, aún falta mucho por esclarecer. Hoy por hoy se sabe que, desde estadios muy tempranos, un proceso neoplásico maligno puede desprender hacia la circulación sanguínea células con características similares a las del tumor (células tumorales circulantes, CTC) las cuales, cumpliendo algunas condiciones, pueden tener la capacidad para anclarse a casi cualquier tejido sano, diferente al de su sitio de origen, y así generar un nuevo crecimiento tumoral (metástasis). El objetivo de esta revisión es describir cómo se comportan estas células, así como su identificación, importancia clínica en el diagnóstico, pronóstico y como agentes de riesgo biológico en la terapia transfusional.

Palabras clave: CTC, cáncer de mama, diagnóstico molecular, hemotransfusión.

Esmeralda Morán Mendoza^{1&}
Jorge Rodríguez Gallegos^{2&}
Manuel Lara Lozano³
Celia Piña Leyva⁴
María del Rocío Thompson Bonilla⁵
Guillermina Rosas Sandoval⁶
Hayde Nallely Moreno Sandoval⁷
Gabina Calderón Rosete M⁸
Sergio Israel Rangel Guerrero⁹
José Luis Merino García¹⁰
Juan Antonio González Barrios¹¹

⁵⁻⁶⁻¹¹ Doctor en Ciencias

³⁻⁴⁻⁷⁻⁸ Maestro en Ciencias

¹⁰ Químico

^{1&-2&-9} Pasante de la carrera de Química

¹⁻² Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM.

³⁻⁴⁻⁵⁻⁶⁻⁷⁻¹⁰⁻¹¹ Laboratorio de Medicina Genómica, Hospital Regional 1° de Octubre.

⁷ Laboratorio de Virología, Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría, CMN SXXI.

⁸ Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México.

⁹ Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

[&] Los autores contribuyeron de igual forma para la realización de esta revisión.

Circulating tumor cells in breast cancer: a potential biological hazard

ABSTRACT

At the present time, cancer affects millions of persons worldwide. Due to this fact, research in this area is thorough. Nevertheless, there are many voids in knowledge. Today it is known that from early stages, a neoplastic process can deliver cells to the bloodstream that have similar characteristics to the tumor cells (Circulating Tumor Cells, CTCs). Given certain condition, these cells can anchor to almost any tissue different to the original and generate a new tumor growth (metastasis). The purpose of this revision is to describe the behavior, identification and clinical relevancy in diagnosis and prognosis of these cells, as well as a risk agent in transfusion therapy.

Keywords: CTCs, Breast cancer, Molecular diagnosis, Blood transfusion.

Recibido: octubre 2013

Aceptado: enero 2014

Correspondencia

Dr. Juan Antonio González Barrios
Hospital Regional 1o de Octubre
Avenida IPN No. 1669
Colonia Magdalena de las Salinas
CP 07760, México, D.F.
Tel: 01 (55) 51415300 Ext. 16605
jantgonzalez@issste.gob.mx

Este artículo debe citarse como

Morán Mendoza E, Rodríguez Gallegos J, Lara Lozano M, Piña Leyva C, Thompson Bonilla MR, Rosas Sandoval G y col. Células tumorales circulantes en cáncer de mama: un posible riesgo biológico. Rev Esp Med Quir 2014;19:45-51.

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por un crecimiento sin control y diseminación de un determinado tipo de células en prácticamente cualquier sitio del cuerpo: pulmón, estómago, hígado riñón, etc.¹

Específicamente, el cáncer de mama es un tumor maligno originado en los conductos o lobulillos (Figura 1).² A escala mundial se registran 411,000 muertes al año a causa de esta enfermedad y se estima que en los últimos 5 años 4.4 millones de mujeres han sido diagnosticadas con la enfermedad. La tasa de supervivencia del cáncer mamario varía mucho en todo el mundo, desde 80% o más en América del Norte, Suecia y Japón, pasando por un 60% aproximadamente en los países de ingresos medios, hasta cifras inferiores a 40% en los países de ingresos bajos.³ A partir de 2006 el cáncer mamario ha sido la segunda causa de muerte general en mujeres de 30 a 50 años; y la primera por cáncer, desplazando al cáncer cérvico-uterino.²

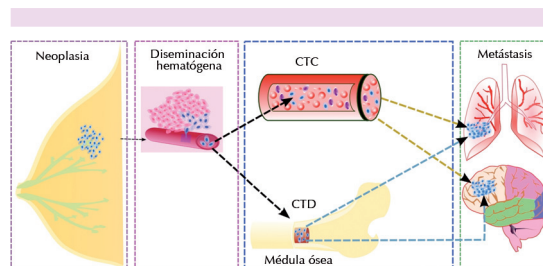


Figura 1. Historia natural del cáncer de mama. En su estadio incipiente se encuentra localizado en la mama; sin embargo, desde esta etapa se produce la diseminación hematológica de células tumorales que pueden tomar dos caminos. **A)** Células tumorales diseminantes (CTD) las cuales se alojan en la médula ósea y posteriormente se reproducen y diseminan a otros tejidos coaccionando metástasis. **B)** Células tumorales circulantes (CTC) que se desprenden del tumor primario y originan metástasis de forma directa. **C)** La metástasis es el resultado de la implantación de las CTD o CTC en el parénquima de un tejido específico.

A través de varios estudios se ha determinado que las células tumorales se desprenden del tumor primario en las etapas iniciales de la progresión maligna. De esta manera, las células liberadas invaden capilares viajando por el torrente sanguíneo; por ello se les conoce como células tumorales circulantes (CTC). Al adherirse a las paredes de los capilares y escapar del vaso sanguíneo (extravasación) pueden establecerse en otro órgano diferente al del tumor primario generando metástasis.⁴ Sin embargo, las CTC no se establecen en un lugar al azar. Stephen Paget propuso, en 1889, la teoría del suelo y la semilla, misma que sostiene que ciertas células tumorales (semillas) tienen afinidad para implantarse en las condiciones de un órgano en particular (suelo), y cuando ambas condiciones se dan se propicia la metástasis.⁵

Identificación de células tumorales circulantes

Las células tumorales circulantes (CTC) pueden distinguirse de las células normales en sangre periférica mediante sus características físicas y biológicas. Para ello se requieren de técnicas sensibles y específicas que permitan su correcta identificación dado que la concentración de CTC en sangre periférica, incluso en pacientes con un proceso metastásico en curso, no supera el índice de una CTC por cada 10^5 células leucocitarias; es por ello que la mayoría de los sistemas de detección consisten en una fase de enriquecimiento seguida del proceso de detección en sí mismo.⁶ Generalmente, podemos decir, que los sistemas de detección se categorizan en dos tipos:

1. Técnicas basadas en la identificación de ácidos nucleicos.
2. Separación de las células tumorales circulantes (citometría).⁷

Técnicas basadas en ácidos nucleicos: aunque la detección de alteraciones genéticas en ADN presente en la circulación sanguínea, tales como mutaciones en protooncogenes, genes supresores

de tumor o ADN metilado aberrante, pueden emplearse como marcadores de ADN derivado del tumor primario; la detección de ADN asociado con el tumor en el plasma puede deberse simplemente a la presencia de ADN circulante, sin indicar necesariamente la presencia de CTC ya que el ADN libre tiene una vida media prolongada en el plasma y puede ser detectable mucho tiempo después de que fue liberado por un derrame en el tumor primario, haciendo que la detección de ADN en sangre pueda reflejar meramente la presencia de ADN libre y no de células tumorales circulantes. Otro inconveniente es que, debido a que los cambios como la metilación del ADN ocurren en los estadios tempranos del proceso de tumorigénesis, tales anomalías pueden ser detectadas en ADN liberado de lesiones displásicas de pacientes que no tienen lesiones neoplásicas. Así pues, aunque la posible detección de CTC basada en ADN es prometedora, aún tiene muchos retos que superar antes de poder ser usada en la práctica clínica.

Por otra parte, las técnicas de retrotranscripción y posterior amplificación de ADNc a partir de ARN permiten estimar indirectamente la presencia de CTC al evaluar la expresión de marcadores específicos de ARNm⁸ tales como CK19, MUC1, Mam-A y antígeno carinoembrionario. Estos marcadores, si se emplean en paneles, es decir, un sistema de evaluación de más de un marcador de manera simultánea, permiten elevar la especificidad de la técnica.⁸

En definitiva, las principales ventajas de la reacción en cadena de la polimerasa de marcadores basados en ARNm son su gran sensibilidad y la amplia gama de iniciadores disponibles aunadas a la posibilidad de emplear dichos marcadores no sólo para detectar CTC sino para hacer predicciones y pronósticos mediante el análisis de los marcadores expresados. Sin embargo, esta modalidad también tiene limitaciones, entre las cuales se incluyen:

1. La propia *inestabilidad del ARN* que hace necesaria la aplicación de medidas específicas durante los procesos de extracción, como son el almacenamiento y la preparación de la muestra.
2. El riesgo de *falsos negativos* debidos a que las CTC estén presentes pero no expresen los marcadores a estudiar.
3. *Falsos positivos* provocados por una sobreexpresión de marcadores en células normales, contaminación de la muestra o transcripción ilegítima de genes.

La técnica, al requerir la destrucción de las células hace imposible su caracterización morfológica.^{8,9} También existen ventajas, como por ejemplo; el uso de paneles con múltiples marcadores y la creación de nuevos y mejores oligonucleótidos disminuyen la cantidad de falsos positivos, mientras que los avances en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real permiten una mayor seguridad al diferenciar entre células cancerígenas y no cancerígenas, estableciendo qué valores de transcripción corresponden a las células tumorales.⁶

Métodos citométricos: incluyen una gran variedad de técnicas basadas en inmunohistoquímica, inmunofluorescencia *in situ* y citometría de flujo.⁹ Estos sistemas aíslan la célula completa permitiendo su caracterización morfológica y molecular.⁷ A continuación se mencionan algunos de los más utilizados.

1. Sistema CellSearch: se trata de un dispositivo automatizado de enriquecimiento y detección inmunocitoquímica desarrollado por la empresa Veridex (NJ, USA). El sistema de enriquecimiento usa partículas magnéticas marcadas con anticuerpos dirigidos a las moléculas de adhesión epitelial (EpCAM) que permite separar a aquellas células que expresen dichos antígenos. Después del enriquecimiento, las células capturadas

son enfrentadas con anticuerpos fluorescentes monoclonales contra leucocitos (CD45) y células epiteliales (citoqueratinas 8, 18 y 19), acto seguido, se generan fotografías de las muestras que pueden ser evaluadas por un analista capacitado.^{7,10} Las CTC se definen como células mononucleares con un perfil inmunológico CD45-/CK+.^{9,11} Este método está autorizado por la FDA para ser usado en la detección de CTC en pacientes diagnosticados con cáncer metastásico de mama, colon y próstata. La sensibilidad del método se encuentra en el orden de hasta una CTC por cada 7.5 mL de sangre periférica, este dato ha sido evaluado y confirmado en varios estudios realizados por distintas instituciones.⁹ El sistema también tiene sus desventajas, como el exceso de tiempo gastado para la revisión de las imágenes y la necesidad de personal bien capacitado destinado a realizar dichas revisiones. Además, en estudios recientes han reportado que el genotipo “normal” del cáncer de mama invasivo (que representa aproximadamente 10% de todos los casos) es típicamente negativo para la expresión de EpCAM y esto puede propiciar la aparición de falsos negativos en las determinaciones de CTC mediante el sistema CellSearch.¹²

2. *Ensayo de microfiltrado en membrana*: en este método se aprovecha la diferencia de tamaño entre las CTC y las células sanguíneas normales. Los filtros de polycarbonato fueron los primeros en desarrollarse y son relativamente eficientes, baratos y sencillos de usar; recientemente se han logrado fabricar microfiltros a base de parileno C especializados en separar CTC. Después de la separación las células se someten a un proceso de reacción en cadena de la polimerasa directamente en la membrana de filtrado. Aun no se han reportado ensayos clínicos usando esta técnica y tampoco tiene fecha de salida al mercado.^{7,9}

3. *Adna Test*: la prueba Adna es otro sistema basado en enriquecimiento de CTC mediante el uso de perlas con recubrimiento magnético; sin embargo, a diferencia de CellSearch, el sistema usa

como blanco del sistema de captura una mezcla de antígenos de superficie en lugar de uno solo. Después del enriquecimiento inmunomagnético el sistema extrae el ARNm que será usado en una subsecuente reacción en cadena de la polimerasa para determinar de manera indirecta el número de CTC a través de la detección de 3 marcadores asociados: MUC1, HER2 y la glicoproteína de superficie GA733-2. Al combinar las técnicas tradicionales de anticuerpos con la reacción en cadena de la polimerasa se obtiene sensibilidad superior a la de CellSearch.^{7,9} Al día de hoy el sistema se comercializa en la Unión Europea para su uso en cáncer colorrectal y de mama, pero no ha obtenido la aprobación regulatoria de la FDA para su comercialización en Estados Unidos.

4. *CTC-chip*: es un método en el cual una placa de micropostes cubiertos con anticuerpos anti-EpCAM interacciona con una muestra de sangre periférica anticoagulada del paciente que se hace circular por la placa mediante un sistema de flujo laminar; se produce un área de contacto mayor que se refleja en una recolección de células EpCAM+ más eficiente. Las CTC capturadas son identificadas mediante microscopía de fluorescencia: positivas para citoqueratinas y negativas para el antígeno de superficie CD-45. La sensibilidad del CTC-chip es mucho mayor a la del sistema CellSearch debido a la mayor superficie de contacto disponible y al lento flujo de la muestra de sangre a través de la placa (1-2 mL de sangre por hora). Además, atrapa menos leucocitos obteniéndose rendimientos de CTC superiores a 50% de las células capturadas, en comparación con el 0.1% de los sistemas magnéticos.^{11,13} Este sistema aún no se encuentra disponible en el mercado pues todavía está en fase de desarrollo.^{6-8,14}

Además de los mencionados existen otros sistemas: *EPISPOT*, *FAST*, *Citometría de Escaneo Lasser* entre otros, los cuales aún están en desarrollo y sólo se emplean en investigación clínica y no se encuentran disponibles en el mercado.

Valor diagnóstico

Las células tumorales circulantes (CTC) son uno de los principales biomarcadores para el diagnóstico y la terapia en el cáncer sistémico. Sin embargo, la tecnología para su detección aún se encuentra en fase de validación, especialmente en el cáncer no metastásico, hecho que en la actualidad impide el uso clínico de las CTC como marcadores diagnósticos. A la fecha solamente se ha aprovechado su poder predictivo para la evolución del tratamiento y las recidivas. Recientemente, en el 2013, se determinó que el análisis de las células mononucleares obtenidas por leucoféresis (LA) de sangre periférica permite el enriquecimiento de CTC pues estas últimas tienen una densidad similar a los mononucleares y por lo general involucra el procesamiento de toda la sangre circulante de un individuo. Con esta aproximación se han podido detectar CTC en más de 90% de los pacientes con cáncer de mama no metastásico, obteniendo aproximadamente 100,000 CTC, con una media de 7.500 CTC por paciente, determinándose una correlación positiva entre el número de CTC con la propagación anatómica de la enfermedad. Se ha propuesto que la aféresis se puede combinar fácilmente con el sistema CellSearch aprobado por la FDA de Estados Unidos para la cuantificación de las CTC. La comparación directa entre la cuantificación de CTC a partir de 7.5 mL de sangre total reveló un mayor poder de resolución de la aféresis combinada con la inmunodetección por CellSearch para la evaluación pronóstica de pacientes con cáncer de mama no metastásico.

Se han hecho múltiples aproximaciones diagnósticas de CTC en diferentes tipos de cáncer y la identificación de ARNm que transcribe para los genes mucina-1, citoqueratina 19, HER2 y mamaglobina A; estos son los mejores biomarcadores de CTC en pacientes con cáncer de mama y tienen su principal aplicación en la evaluación del tratamiento y el pronóstico de la enfermedad. Así, la mamaglobina tuvo con una sensibilidad

de 80% y una especificidad de 100% mientras que la mucina-1 tuvo una sensibilidad de 86% y una especificidad de 100%.¹⁵

En estudios previos se ha demostrado que en la etapa 1 de ciertos tipos de cáncer se pueden detectar CTC. Con base en éstos se realizó un estudio en el cual se detectó que 19.3% (n = 88 pacientes) con cáncer pulmonar en etapa I presentaban CTC y en 2 de los 17 pacientes positivos a CTC se evidenció metástasis.¹⁶

Valor pronóstico

Un estudio prospectivo para evaluar la importancia pronóstica de la detección de CTC en pacientes con cáncer de mama avanzado incluyó 80 pacientes con los siguientes criterios: mujeres con diagnóstico histológico de cáncer de mama, con evidencia de enfermedad metastásica mediante estudios de imagen, empezando una nueva línea de tratamiento o tratamiento para la enfermedad avanzada, con un máximo de dos líneas de tratamiento. Al inicio del estudio se reportaron 49 pacientes que tenía ≥ 5 CTC en 7.5 mL de sangre total. El número de referencia de CTC se asoció con la supervivencia libre de progresión (HR 2.5, intervalo de confianza del 95%: 1.2 a 5.4). En la última extracción de sangre las pacientes con aumento o CTC persistentemente ≥ 5 demostraron mayor riesgo estadístico significativo de progresión que las pacientes con CTC < 5 (HR 6.4, IC 95%: 2.8 a 14.6).¹⁷

Diversos estudios han permitido estimar que las CTC se encuentran en 70-100% de los pacientes con metástasis, así como en 46-71% de pacientes con afectación local. Además, se ha observado que en estadios tempranos de cáncer pueden encontrarse, en promedio, 16 CTC en 20 mL de sangre.¹⁸

En un estudio para evaluar el valor pronóstico de las CTC en pacientes con cáncer de mama metastásico recién diagnosticado se demostró

que 30.3% (n = 59) de las pacientes con enfermedad metastásica *de novo* y 69.7% (n = 129) que presentaron reincidencia de cáncer de mama, así como 61.6% (n = 114) de las pacientes tenían una concentración de CTC < 5 y 38.4% (n = 71) de las que tenían una concentración de CTC ≥ 5 (Figura 2). La mediana de supervivencia global fue de 28.3 meses en las pacientes que tuvieron < 5 CTC por cada 7.5 mL de sangre total y de 15 meses en pacientes con ≥ 5 CTC por cada 7.5 mL de sangre total ($p < 0.0001$). Hecho que es independiente de la expresión del receptor HER-2/neu. Se reportó una supervivencia superior entre los pacientes con CTC < 5 si el paciente tenía reincidencia o si la enfermedad metastásica era *de novo*. Los pacientes con CTC ≥ 5 tenían una relación de riesgo de muerte de 3.64 (IC 95%: 2.11-6.30) en comparación con los pacientes con < 5 CTC (modelo multivariado).¹⁹

Comentario (riesgo biológico)

En reportes previos se ha demostrado que las CTC se encuentran presentes en pacientes con estadios 1 de cáncer de mama; sin embargo,

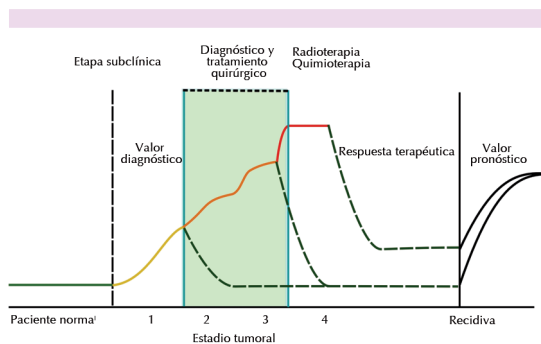


Figura 2. Curso temporal de las células tumorales circulantes y su valor clínico. Evolución natural de las CTC desde los estadios tempranos del cáncer de mama hasta estadios tardíos. En los países en vías de desarrollo el diagnóstico del cáncer de mama se realiza en estadios 2 y 3 que se caracterizan por alta concentración tanto de células tumorales circulantes como de células tumorales diseminantes.

alrededor del mundo la gran mayoría del diagnóstico temprano de esta enfermedad se realizó en estadios 2 o 3, por lo que las pacientes no diagnosticadas que se encuentran en etapa subclínica pudiesen ser admitidas por los servicios de banco de sangre como donadoras clínicamente sanas y las CTC presentes en los concentrados globulares provenientes de éstas pacientes podrían estar siendo transferidas a pacientes sanos, tanto hombres como mujeres. Aunado a esto, la realización de pruebas cruzadas asegura que estas CTC tengan un nicho adecuado para su desarrollo y pueden ser un factor condicionante y desencadenante de cáncer metastásico de origen desconocido. La estabilidad y viabilidad de las CTC en los concentrados globulares sin desleucocitar depende de las condiciones de almacenamiento y del tiempo que transcurre entre la extracción, separación y trasfusión de los paquetes globulares.²⁰ Quizá en esta parte habría que agregar porque las pruebas cruzadas garantizan, lo que se propone en el texto, fundamentándolo en la base de la técnica, es decir, qué son las pruebas cruzadas.

DISCUSIÓN

La cuantificación de las CTC ha demostrado su utilidad como valor pronóstico, como marcador de la supervivencia en pacientes con cáncer de mama. El futuro del diagnóstico de CTC es el análisis molecular, aunque aún se encuentra en desarrollo y depende de ensayos de aislamiento y purificación que generen mayores cantidades de CTC y, por lo tanto, una mayor cantidad del ADN tumoral, ARN mensajero tumoral y micro-ARN tumoral que faciliten la realización de técnicas de biología molecular encaminadas al diagnóstico e identificación de las CTC, que las discriminen de las células leucocitarias contaminantes.

En estudios previos se ha demostrado que las proteínas de enriquecimiento inmunomagnético

utilizadas en las pruebas de detección de CTC (CellSearch), basada en la expresión de EpCAM, arrojan falsos negativos ya que ésta no se expresa en todos los subtipos de cáncer de mama.²¹ Sin embargo, al utilizar la proteína CD146 se aumenta la sensibilidad para la detección de CTC negativas a EpCAM.²² Este hecho es común a una gran cantidad de tumores cancerígenos, por lo que se hace indispensable contar con un conjunto específico de biomarcadores que identifiquen a cada tipo de cáncer.

En el futuro la correcta purificación y aislamiento de las CTC permitirá desarrollar los tratamientos anti-microARNs y tenerlos disponibles para su uso terapéutico en el cáncer de mama. Es muy probable que algunos de estos microARNs tumorales sean detectables en la circulación, lo cual podría simplificar y establecer las pruebas de fármacos encaminados a suprimir o a activar la maquinaria mirnómica con finalidad farmacoterapéutica.

REFERENCIAS

- OMS | Cáncer [Internet]. WHO. Disponible en: <http://www.who.int/topics/cancer/es/>
- Knaul F, López-Carillo L, et al. México Reporte Rosa 2009-2010: Cáncer de mama a conciencia. Informe final. Primera edición. México, DF: Fundación Mexicana para la Salud; 2009.
- OMS | Cáncer de mama: prevención y control [Internet]. WHO. Disponible en: <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index.html>
- Circulating Tumor Cells for Cancer Diagnosis and Prognosis - Circulating Tumor Cells for Cancer Diagnosis and Prognosis. Disponible en: <http://cancer.scripps.edu/research.aspx>
- Ribatti D, Mangialardi G, Vacca A. Stephen Paget and the "seed and soil" theory of metastatic dissemination. *Clin ExperMed*. 2006;6:145-9.
- Graves H, Czerniecki BJ. Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients: An Evolving Role in Patient Prognosis and Disease Progression. *Pathology Research International*, 2011.
- Kim SI, Jung H. Circulating Tumor Cells: Detection Methods and Potential Clinical Application in Breast Cancer. *Journal of Breast Cancer* 2010;13:125.
- Alix-Panabières C, Riethdorf S, Pantel K. Circulating Tumor Cells and Bone Marrow Micrometastasis. *Clin Cancer Res* 2008;14:5013-21.
- Ross JS, Slodkowska EA. Circulating and Disseminated Tumor Cells in the Management of Breast Cancer. *AJCP* 2009;132:237-45.
- Hou J-M, Krebs M, Ward T, Morris K, Sloane R, Blackhall F, et al. Circulating Tumor Cells, Enumeration and Beyond. *Cancers* 2010;2:1236-50.
- How does the CELLSEARCH® CTC Test work? Disponible en: <https://www.cellsearchctc.com/about-cellsearch/how-cellsearch-ctc-test-works>
- Sieuwerts AM, Kraan J, Bolt J, et al. Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:61-66.
- Clinical Studies. Disponible en: http://www.adnagen.com/cfscrips/main_technology_clinical_studies.cfm?auswahl=01.25.20
- Dotan E, Cohen SJ, Alpaugh KR, Meropol NJ. Circulating Tumor Cells: Evolving Evidence and Future Challenges. *The Oncologist* 2009;14:1070-82.
- Ebeed SA, El-Moneim A, A N, Saad A, Zaher ER, Yassin OG, et al. Diagnostic and prognostic value of circulating tumor cells in female breast cancer patients. *Alexandria Journal of Medicine* 2012;48:197-206.
- Tanaka F, Yoneda K, Kondo N, Hashimoto M, Takuwa T, Matsumoto S, et al. Circulating Tumor Cell as a Diagnostic Marker in Primary Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:6980-6.
- Nolé F, Munzone E, Zorzino L, Minchella I, Salvatici M, Botteri E, et al. Variation of circulating tumor cell levels during treatment of metastatic breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Ann Oncol* 2008;19:891-7.
- Iakovlev VV, Goswami RS, Vecchiarelli J, Arneson NCR, Done SJ. Quantitative detection of circulating epithelial cells by Q-RT-PCR. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2007;107:145-54.
- Dawood S, Broglio K, Valero V, Reuben J, Handy B, Islam R, et al. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: from prognostic stratification to modification of the staging system? *Cancer* 2008;113:2422-30.
- Riethdorf S, Fritsche H, Müller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, et al. Detection of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood of Patients with Metastatic Breast Cancer: A Validation Study of the CellSearch System. *Clin Cancer Res* 2007;13:920-8.
- Sieuwerts AM, Kraan J, Bolt J, Spoel P van der, Elstrodt F, Schutte M, et al. Anti-Epithelial Cell Adhesion Molecule Antibodies and the Detection of Circulating Normal-Like Breast Tumor Cells. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2009;101:61-6.
- Ren C, Han C, Wang D, Zhao X, Jin G, Shen H. Detection of circulating tumor cells: Clinical relevance of a novel metastatic tumor marker. *Exp Ther Med* 2011;2:385-91.