

Micrometástasis: estrategias para su detección.

Francisco Arvelo^{1,2}.

¹Centro de Biociencias, Fundación IDEA. Carretera Nacional Hoyo de la Puerta, Valle de Sartanejas, Baruta, Edo. Miranda, Venezuela.

²Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores, Instituto de Biología Experimental, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Palabras clave: cáncer, metástasis, micrometástasis, enfermedad mínima residual, inmunohistoquímica, biología molecular, marcadores tumorales.

Resumen. La micrometástasis o enfermedad mínima residual ha adquirido una importancia trascendental en oncología al representar un verdadero problema clínico que debe ser solucionado, ya que aún se desconoce la respuesta de estos focos tumorales a los diferentes tratamientos que se usan para el control del cáncer. Aun cuando este es un problema específico fundamental a ser solucionado, ya existen métodos de ensayo inmunohistoquímicos y de biología molecular, que han permitido la ubicación de microfocos de células tumorales en diferentes órganos y tejidos, existiendo diferentes técnicas para determinar y cuantificar estas lesiones. Dentro de estas técnicas destacan la citometría de flujo y diferentes técnicas moleculares que van desde las ya tradicionales hasta las más nuevas y sofisticadas. El objetivo de la presente revisión está dirigido evaluar los nuevos métodos de diagnóstico que permitan la identificación de esta enfermedad residual, lo cual serviría para establecer tratamientos individualizados que pudieran prevenir la recurrencia de la enfermedad en los pacientes de cáncer bajo tratamiento.

Micrometastases: strategies for detection.*Invest Clin 2013; 54(2): 206 - 225*

Keywords: cancer, metastases, micrometastases, minimal residual disease, immunohistochemistry, molecular biology, tumor markers.

Abstract. Micrometastasis or minimal residual disease has become critically important in oncology since it represents a true clinical problem that must be solved, as the response of these tumor foci to the different treatments that are used for the control of cancer, is still unknown. Even though this is a fundamental specific problem to be solved, there are already immunohistochemical and molecular biology diagnostic methods that have allowed microfoci location of tumor cells in various organs and tissues, and different techniques are available to determine and quantify these lesions. Within these techniques, flow cytometry and different molecular methods are included, and they range from the traditional to the newest and most sophisticated. The goal of this review was aimed to evaluate new diagnostic methods that permit the identification of this residual disease, which would serve to establish individualized treatments and prevent the recurrence of the disease in cancer patients under treatment.

Recibido: 15-10-2012. Aceptado: 13-12-2012

INTRODUCCIÓN

Los dos mecanismos biológicos que determinan la malignidad del cáncer son la infiltración y la metástasis, procesos muy complejos cuyo carácter está más allá de ser fenómenos puramente mecánico (1). Ellos suceden cuando en las células del tumor primario ocurren cambios genéticos que hacen posible la expresión de proteínas específicas, permitiendo que algunas células se separen de las vecinas, rompan la membrana basal y entren en los vasos linfáticos y sanguíneos, circulando por ellos para viajar a distancia (2, 3). La importancia clínica de estos mecanismos se hace evidente cuando se considera que buena parte de los tumores sólidos pueden presentar metástasis clínica al hacerse su diagnóstico, o bien estar en fase subclínica, apareciendo tiempo después tras el diagnóstico y tratamiento del tumor primario (4).

Por otra parte, es muy importante considerar que los tratamientos dirigidos contra la metástasis no son efectivos en la mayoría de los pacientes, ya que los tratamientos convencionales locales, como lo son la cirugía y la radioterapia, cuando son usados para afrontar la enfermedad metastásica clínica, usualmente tienen más papel paliativo que curativo, en tanto que los tratamientos sistémicos, como la quimioterapia, son más favorables, pero con una efectividad limitada y una toxicidad importante (4). Este comportamiento se debe a la complejidad de una enfermedad en la que destaca su heterogeneidad celular, una de las principales limitaciones para su curación. En un tumor maligno existen diferentes subpoblaciones celulares con diferentes grados de diferenciación, proliferación y capacidad metastásica, a lo cual se suma una gran capacidad de respuesta a los tratamientos, ya que las subpoblaciones se van

adaptando y seleccionando en función de los cambios del medio ambiente en que se localizan y la resistencia a los agentes citotóxicos. Tales cambios, como lo son la hipoxia, toxicidad y radiación (5, 6) hacen que algunos subclones se escapen y formen nuevos focos de células a distancia, donde pueden crecer si son capaces de inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos mediante la angiogénesis (7). Así, la heterogeneidad celular tumoral se debe principalmente a la inestabilidad genética de las células tumorales, y a la selección de las subpoblaciones mutantes. Entre los factores fundamentales que participan en esta inestabilidad se encuentran las mutaciones de la proteína p53, los genes implicados en la reparación del ADN, los genes que intervienen en la regulación del ciclo celular y la muerte programada o apoptosis (8, 9).

Como podemos ver, la diseminación metastásica es un evento clave en la historia natural del cáncer, ya que mediante su desarrollo se transforma una enfermedad circunscrita y potencialmente curable por un tratamiento local en una enfermedad generalizada cuyo tratamiento debe ser sistémico. A pesar de los grandes avances terapéuticos logrados en oncología durante las últimas décadas, surge una dura verdad: todavía mueren muchos pacientes a causa de la metástasis, incluso en muchos de aquellos que ya no presentaban signos de enfermedad clínicamente detectable luego de su tratamiento. En todos estos pacientes la recurrencia de la enfermedad se ha originado a partir de los residuos tumorales microscópicos que constituyen la denominada “micrometástasis” o “enfermedad mínima residual”.

DESARROLLO DE LAS MICROMETÁSTASIS

Las micrometástasis se definen como “pequeños depósitos de células tumorales

inferiores a 2 mm de diámetro, distantes de la lesión original o tumor primario”. Este término, aun cuando tiene connotaciones morfológicas –ya que su descubrimiento y descripción se han dado en el campo de la histopatología–, ha sido redimensionado mediante el desarrollo de técnicas no morfológicas para la detección de las células tumorales diseminadas, por lo cual el uso habitual del viejo término se aplica a los restos tumorales de pequeño tamaño identificados por cualquier técnica (10). Los residuos tumorales inferiores a 0,02 mm se denominan “células aisladas”, no estando definida su relevancia clínica, por lo que hay algunos autores que prefieren considerar el término “células tumorales ocultas” (en inglés OTC, *occult tumour cells*). Doekhie y col. (11) postularon que es posible que en los individuos inmunocompetentes, las OTC son destruidas por el sistema inmune antes de que puedan progresar a lesiones de mayor tamaño, y así puedan proliferar.

Las micrometástasis se distinguen de las macrometástasis porque no tienen una fuente propia de aporte sanguíneo y se alimentan a través de la difusión pasiva de nutrientes y oxígeno, lo que limita su crecimiento. Estos pequeños grupos de células podrían permanecer quiescentes durante largos periodos, hasta que el sistema inmune los elimine o hasta que se produjera la formación de nuevos vasos sanguíneos mediante la angiogénesis, haciendo posible el crecimiento de las micrometástasis (12). Estos pequeños focos celulares no se detectan mediante técnicas de imagen convencionales, requiriéndose la aplicación de métodos más sofisticados tales como los citométricos o moleculares. Esta realidad hace que los pacientes sean sometidos indiscriminadamente a tratamientos de consolidación para eliminar la enfermedad mínima residual, haciendo que algunos enfermos reciban más tratamiento del necesario, mientras que en otros es insuficiente (13). Por

tanto, es preciso desarrollar técnicas más sensibles que permitan evaluar la masa residual de forma más precisa, lo que posibilitaría realizar tratamientos de consolidación adaptados a cada enfermo. El abordaje eficiente en el problema del cáncer sigue siendo un reto, ya que se trata de buscar soluciones en la prevención, buscar métodos que sean capaces de detectar precozmente la enfermedad, cuantificar su grado de control y seguimiento y predecir las recidivas. Recordemos que los inconvenientes que han planteado, en determinadas circunstancias, el diagnóstico diferencial del cáncer y la necesidad de contar con elementos objetivos para la caracterización de procesos malignos, llevaron a la necesidad de la búsqueda de características bioquímicas y moleculares que pudieran brindar datos adicionales para establecer el pronóstico, y perfilar una estrategia de tratamiento de cada variante neoplásica. De aquí que los marcadores tumorales pueden aportar esta información muy útil en la búsqueda de individuos enfermos en poblaciones de riesgo, definición del estadio del tumor o como elemento complementario en la confirmación de un diagnóstico histopatológico (14).

MARCADORES TUMORALES Y MICROMETÁSTASIS

Se consideran “marcadores tumorales” o “biomarcadores tumorales” aquellas sustancias que pueden cuantificarse en los tejidos o en los fluidos biológicos para detectar la presencia de cáncer. Eventualmente puede servir en la determinación de la localización de la masa neoplásica, el tamaño de la carga tumoral o estimar la respuesta al tratamiento (15). Muchos elementos, incluyendo antígenos asociados a tumor, enzimas, distintas proteínas, metabolitos, oncogenes o productos de oncogenes, pueden ser reconocidos como marcadores tumorales. Algunos marcadores son específicos de

una variante tumoral mientras que otros pueden encontrarse en varios tipos de cáncer. Es importante recalcar que los marcadores tumorales no son capaces de asegurar el diagnóstico de procesos neoplásicos por sí mismos, ya que el diagnóstico seguro de la enfermedad depende, en última instancia, de un apropiado estudio histopatológico a partir del material de la biopsia (16, 17). Sin embargo, los marcadores proveen una información muy útil que contribuye a diagnosticar precozmente la enfermedad, establecer el pronóstico, predecir la respuesta al tratamiento o detectar la recurrencia (18).

Diferentes tipos de marcadores expresados por las células tumorales en el cáncer

1. Marcadores de detección temprana. Se aplica para la identificación de nuevos casos de cáncer. Un ejemplo es el antígeno prostático específico (PSA, siglas en inglés), usado para detectar el cáncer de próstata (19, 20).
2. Marcadores de riesgo. Se basa en la identificación de mutaciones germinales heredadas en genes involucrados en la tumorigénesis. Se trata de genes supresores tumorales o genes que codifican para moléculas que mantienen la estabilidad del genoma. Como ejemplo las mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 en cáncer de mama (21, 22).
3. Marcadores de diagnóstico. Se utiliza en pacientes con síntomas para establecer el origen de un tumor indiferenciado, ayudando a definir la estirpe que dio origen al tumor. Por ejemplo el marcador. CA-125 para el cáncer de ovario (23, 24).
4. Marcadores de estadificación (clasificación de la extensión y gravedad de una enfermedad cancerosa). Una vez diagnosticada la enfermedad, ayuda a determinar si la misma ha avanzado, y

si las células tumorales han invadido órganos y tejidos. Es ejemplo el CA19-9 en ciertos casos de cáncer de páncreas (25, 26).

5. Marcadores de pronóstico. Ayudan a valorar la agresividad y comportamiento del tumor, así como la posible evolución del paciente al momento del diagnóstico o de la extirpación quirúrgica. Un ejemplo es la expresión aberrante de CD117 en casos de mieloma múltiple (27, 28).
6. Marcadores predictivos. Indica la probabilidad de respuesta a un determinado tipo de tratamiento, permitiendo hacer el seguimiento para monitorear su efectividad. Un ejemplo es la expresión de receptores de estrógeno en la terapia hormonal en cáncer de mama (29, 30).

TÉCNICAS DE ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL

Para que una técnica pueda ser utilizada para estudiar las micrometástasis (31, 32) debe reunir las siguientes propiedades:

a. Sensibilidad. Define el límite de detección de la técnica, y que debe ser capaz de detectar, por lo menos, una célula tumoral de entre mil células normales. Se debe considerar que la sensibilidad de los ensayos para la determinación de la enfermedad mínima residual está limitada también por la estabilidad de las respectivas dianas de la muestra a analizar. Siendo que el ADN genómico, es una molécula estable, sin embargo, el RNA mensajero tiene una vida media muy corta.

b. Especificidad. Define la capacidad que tiene la técnica de distinguir las células tumorales de las normales, lo cual es fundamental para evitar falsos positivos o falsos negativos.

c. Reproducibilidad. Exige y determina utilizar un ensayo idéntico determinado por

el protocolo, reactivos y controles en los diferentes laboratorios.

d. Repetibilidad. Mide el grado de concordancia entre las réplicas probadas durante la realización de un ensayo y las probadas en distintas realizaciones del mismo ensayo.

e. Validación. Es la evaluación de una prueba de diagnóstico con el fin de determinar su idoneidad para una utilización concreta.

f. Correlación clínica. La técnica debe ser consistente, y cumplir todos los requisitos exigidos para poderla correlacionar clínicamente

TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN DE LA ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL

A. Técnicas inmunológicas

Métodos inmunohistoquímicos. En una muestra histológica, mediante los anticuerpos monoclonales específicos, se puede detectar marcadores específicos de superficie de un determinado tipo de cáncer. Estos antígenos pueden ser proteínas con expresión aumentada en las células del carcinoma o pueden ser proteínas no detectables en las células normales por técnicas inmunológicas, utilizándose usualmente, como antígenos, las citoqueratinas y otras proteínas de membrana (33). Para detectar por este método células tumorales, se han utilizado distintos anticuerpos monoclonales en médula ósea y/o sangre periférica de pacientes con tumores epiteliales para los cánceres de: mama (34), colon (35), recto (36), estómago (37), páncreas (38), pulmón (39), vejiga (40), riñón (41) y hematológicos (42). Su especificidad y sensibilidad dependen de la expresión del antígeno diana, y de la afinidad del anticuerpo monoclonal frente al antígeno.

En diversos estudios inmunohistoquímicos realizados en pacientes con cáncer de mama se ha utilizado una batería de an-

tígenos tales como citoqueratina 18, pancitoqueratinas, antígeno epitelial de membrana y TAG72 para determinar la presencia de células residuales. En este caso se encontró que el antígeno que proporcione mayor sensibilidad fue la citoqueratina 18 (43). En el caso de muestras de ganglio linfático no pueden utilizarse las citoqueratinas debido a que las células reticulares las expresan, y así podría provocarse un falso positivo. En tal caso, para estudiar las células tumorales en ganglios linfáticos se utiliza como marcador específico el Ber-EP4 (44). La sensibilidad de este método inmunohistoquímico es de detectar una célula tumoral entre 10^5 - 10^6 células normales.

Citometría de flujo. La citometría de flujo es utilizada para analizar y definir el perfil inmunofenotípico de las células neoplásicas y establecer la presencia de fenotipos aberrantes. Se basa en la aplicación de anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra proteínas de membrana o intracitoplasmáticas (45). Esta técnica de análisis celular multiparamétrico se basa en hacer pasar partículas en suspensión, como lo pueden ser las células, por un haz luminoso, debiendo estar alineadas para pasar de una en una por el haz luminoso. Su interacción con el haz luminoso genera señales debido a una dispersión de la luz, caracterizada por el tamaño de la célula, su núcleo, la membrana nuclear, el material granular del citoplasma o a una emisión de la luz por los anticuerpos marcados con fluorocromos. Estas señales generadas son llevadas a unos detectores que las transforman en impulsos eléctricos, se amplifican y son transformadas en señales digitales mediante un sistema informático apropiado (46, 47).

Su principal aplicación en oncología es la evaluación y seguimiento de leucemias agudas (48), leucemias linfoblástica crónicas (49) y otros síndromes linfoproliferativos con infiltración medular o expresión en sangre periférica (50). En el caso de la eva-

luación de la enfermedad mínima residual en las patologías oncohematológicas, la citometría de flujo es útil para la determinación de fenotipos propios de la población leucémica y su presencia en la recidiva (51). Las células leucémicas, salvo raras ocasiones, no presentan antígenos específicos que permitan distinguirlas de las células normales, sin embargo sí expresan fenotipos que están escasamente representados en personas sanas o son indetectables en las células normales. Estos fenotipos reciben el nombre de fenotipos leucémicos, los cuales se suelen caracterizar por la expresión en una misma célula de antígenos asociados a dos líneas celulares, por la presencia de asincronismos de maduración, por alteraciones en el patrón de expresión del antígeno o la localización aberrante de fenotipos restringidos a ciertos tejidos (52, 53).

A través de la citometría de flujo se puede obtener información acerca de la eficacia de un tratamiento implementado para: diseñar protocolos en los pacientes de alto riesgo una vez alcanzada la remisión, predecir recaídas previamente a las manifestaciones clínicas, para el estudio de la calidad del producto de la recolección de células madre o *stem cells* en el trasplante autólogo de médula ósea. Aquí se puede dimensionar el valor de estas técnicas al poseer una sensibilidad de 10^{-4} a 10^{-5} , es decir, detecta una célula tumoral de entre 10.000 y 100.000 células normales (54).

B. Técnicas de biología molecular

Las técnicas de biología molecular están basadas en la asociación de alteraciones que ocurren en los ácidos nucleicos en las células malignas, las células se caracterizan por presentar alteraciones tanto genéticas como epigenéticas. Por otra parte, las mutaciones somáticas puntuales en los genes supresores del tumor u oncogenes son frecuentes, observándose anormalidades cromosómicas tales como reordenamientos,

delecciones, amplificaciones y aneuploidías (55). Estas son características de inestabilidad genómica a consecuencia del fenotipo maligno, siendo utilizadas en clínica como marcadores moleculares para poder detectar las células tumorales (56).

Citogenética convencional. La citogenética, al estudiar la apariencia microscópica, cambios estructurales y las anomalías de los cromosomas que presentan estos en la enfermedad (55), son una herramienta de suma importancia a la hora del diagnóstico, pronóstico y seguimiento de las neoplasias hematológicas (57). La técnica de citogenética convencional o de bandeo G nos brinda una amplia información acerca del espectro de aneuploidías y cambios estructurales presentes en las células malignas, con una sensibilidad de 1 a 5%, dependiendo de la cantidad de metafases analizadas. Dentro de las ventajas del bandeo G, está la posibilidad de estudiar cada uno de los 46 cromosomas presentes en la célula considerando el patrón de bandas característico de cada cromosoma, lo cual permite la visualización de re-arreglos genómicos (58). Se han identificado anomalías cromosómicas tanto numéricas como estructurales por translocaciones, inversiones, deleciones, duplicaciones, todas asociadas directamente con la génesis tumoral, características clínicas del cáncer, factores pronósticos y respuesta a la terapia del cáncer (59). En algunas leucemias se ha identificado la t(9,22)(q34.1; q11.2) (60) y en los síndromes mielodisplásicos la 5q-, del (5)(q13q33) (61). Cuando se identifican estas anomalías se puede realizar un diagnóstico tanto a nivel citogenético como al seguimiento de la progresión de la enfermedad. Si el tratamiento es efectivo no se van a observar los reordenamientos cromosómicos y el paciente presentará una remisión completa (62). Por otra parte, cuando los cromosomas presentan bandas poco definidas, no es posible determinar el cariotipo, y

tampoco es posible detectar las alteraciones genéticas que afecten a regiones muy pequeñas en el ADN. Estas situaciones producen limitaciones en la aplicabilidad de la citogenética convencional para el estudio de la enfermedad mínima residual. La ventaja más importante de su utilización es que todos los cromosomas pueden ser visualizados a la vez. Sin embargo la falta de células en división y la mala morfología de los cromosomas, situaciones muy frecuentes en las hemopatías malignas, son una limitación de la citogenética convencional. La sensibilidad de la técnica oscila entre el 5-10%, dependiendo de la cantidad de metafases analizadas.

Hibridación *in situ*. Las técnicas de hibridación *in situ* (HIS) permiten detectar y localizar secuencias específicas de ácidos nucleicos, bien sea en ADN o ARN, sobre preparaciones cromosómicas, extensiones celulares, cortes de tejidos, y en cortes ultrafino utilizados para el estudio de microscopía electrónica. La utilización de estas técnicas ha aumentado en los últimos años como complemento de la citogenética convencional, cuya ventaja radica en la visualización de todos los cromosomas. Presenta varias limitaciones, siendo necesario que las células estén en división y los cromosomas pueden presentar bandas cromosómicas poco definidas.

Hibridación *in situ* convencional. La HIS convencional de aplicación más generalizada en el estudio de los tumores se basa en la utilización de tres tipos principales de sondas: sondas centroméricas, sondas de pintado cromosómico (*painting*) y sondas de secuencia única o también llamada locus específico. La HIS con el uso de fluorocromos se denomina FISH, mientras que si el marcaje es cromogénico se denomina CISH.

- Centroméricas o ADN satélite. Está formada por una secuencia repetitiva de ADN que hibridiza con el ADN de la

región centromérica del cromosoma, siendo útiles para detectar alteraciones cromosómicas numéricas como monosomías y trisomías. Esta técnica puede aplicarse sobre células en división o núcleos interfásicos sin necesidad de tener células en metafase (63).

- La sonda de pintado cromosómico (*painting*). Está formada por una batería de sondas que en su conjunto hibridizan todo el cromosoma. Con esta sonda podemos detectar alteraciones estructurales o numéricas de los cromosomas solo en células en metafase, siendo de gran utilidad cuando los cromosomas son de mala calidad (64).
- La sonda de secuencia única (locus específico). Hibridizan con el ADN de una región en particular, correspondiente a un gen o a una banda cromosómica. Con esta sonda se pueden visualizar alteraciones tanto estructurales como numéricas en núcleos tanto en interfase como en metafase. Se puede detectar la presencia de células tumorales residuales con una anomalía característica de estirpe o subtipo, como la t(9; 22) en la leucemia mieloide crónica (65) y la t(15; 17) que afecta al PML/RAR α en la leucemia mieloide aguda (66)

Hibridación *in situ* fluorescente. La hibridación *in situ* fluorescente, FISH, es una tecnología que utiliza sondas de DNA marcadas con un fluoróforo para detectar o confirmar anomalías génicas o cromosómicas que generalmente están más allá de la capacidad de resolución de la citogenética de rutina. En primer lugar, la muestra de DNA en cromosomas metafásicos o núcleos en interfase se desnaturaliza, proceso que separa las hebras complementarias de la estructura en doble hélice del DNA. A la muestra desnaturalizada se le añade entonces la sonda de interés, marcada con un fluoróforo, que se asociará al DNA de la

muestra en el sitio diana, la hibridación, donde se vuelve a formar una doble hélice. La señal emitida por la sonda se observa mediante un microscopio de fluorescencia, clasificándose la muestra de DNA según la presencia o ausencia de la señal (67). La FISH, puede ser utilizada como complemento de la citogenética convencional, ya que ambas pueden ser de utilidad diagnóstica y pronóstica, sobre todo en el estudio de las neoplasias hematológicas (68). Es importante destacar que tanto la FISH como la citogenética presentan limitaciones y ventajas: la citogenética requiere que las células tumorales se encuentren en división, y si las células no tienen buena calidad, la interpretación los resultados es dudosos. Además se pueden analizar pocas células, y el sistema presenta una baja sensibilidad; por otra parte, la FISH puede utilizarse tanto en núcleos en interfase como en células en metafase, pudiendo analizarse más células que con la citogenética, siendo además una técnica con mayor sensibilidad que varía desde 10^{-2} a 10^{-5} , es decir, detecta una célula tumoral entre 100 a 100.000 células normales.

Nuevas técnicas FISH. Las técnicas de FIS multicolor-FISH (M-FISH) y *Multibanding*-FISH (RX-FISH) han surgido con la intención de superar las carencias de la HIS convencional, y aportar una mayor información en el conocimiento del cariotipo.

- La técnica M-FISH. Esta técnica se basa en la cohibridación de 24 sondas de pintado cromosómico marcadas con fluorescencia en células en metafase, lo cual permite visualizar cada par de cromosomas de un color diferente. Esta técnica es muy útil para determinar cariotipos complejos, siendo el inconveniente la necesidad de obtener células en metafase (69).
- *Multibanding* FISH o *cross species color binding* (RX-FISH). La técnica es muy similar a la M-FISH permitiendo la

generación de un patrón de bandas de distintos colores para cada uno de los cromosomas, siendo su principal ventaja permitir detectar inversiones y translocaciones entre cromosomas homólogos (70).

- Hibridación cromogénica *in situ* (CISH). Esta hibridación cromogénica es un método descrito para la detección de la amplificación de un gen, combinando características de la técnica de FISH e inmunohistoquímica. La CISH, al igual que la FISH, permite cuantificar el número de copias de un gen e identificar translocaciones en los cromosomas. La diferencia radica en que la CISH usa reacciones convencionales con peroxidasa a partir de tejidos fijados en formol o embebidos en parafina (71).
- Hibridación genómica comparada. En los tumores sólidos, la obtención de metafases de calidad es a menudo complicada, por lo que se desarrolló una nueva técnica de citogenética molecular denominada hibridación genómica comparada o CGH en inglés. Esta técnica emplea ADN del tumor y no analiza metafases, obviando la necesidad de células en crecimiento, siendo una técnica de citogenética molecular derivada del FISH. Ella permite detectar cambios numéricos de secuencias de ADN en un tejido tumoral, como lo son pérdida, deleciones, ganancias y amplificaciones. Dicha técnica hibridiza el ADN tumoral y de un ADN control, ambos marcados con fluorocromos de distinto color sobre metafases normales. La CGH tiene particular interés en el análisis de cambios numéricos de secuencias de ADN tanto en tumores sólidos como en neoplasias hematológicas de índice proliferativo bajo, al no ser necesaria la obtención de metafases. Así mismo es de gran

utilidad en aquellos casos que presentan cariotipos complejos con numerosos cromosomas marcadores dobles diminutos (DM) y regiones de tinción homogénea (HSR). Esta técnica nos permite detectar translocaciones, inversiones y otras alteraciones de tipo equilibrado que no comportan ganancia o pérdida de material genético (72, 73).

Con el mismo fundamento que la HGC recientemente ha surgido una técnica denominada array-CGH o matrix-CGH, que en lugar de hibridar sobre portaobjetos con metafases hibrida lo hace sobre matrices con oligos que puede cubrir todo el genoma (74). La CGH ha contribuido significativamente al conocimiento actual de las alteraciones genómicas en las neoplasias humanas proporcionando información para la identificación de nuevos genes implicados en estas enfermedades. Actualmente esta técnica se utiliza sobre todo para detectar alteraciones cromosómicas en tumores sólidos, con el inconveniente, siempre presente, de la obtención de metafases, que presenta muchas dificultades técnicas (75). En neoplasias hematológicas, la CGH está casi restringida a síndromes linfoproliferativos crónicos, ya que en éstos, el índice mitótico de las células tumorales es generalmente muy bajo (76).

C. Pruebas por *Northern blot*, *Western blot*, *Southern blot*

***Northern blot*.** Es utilizado para analizar ARN, bien sea total o purificado, separándose de acuerdo con su tamaño en un gel de agarosa y se transfiere posteriormente a una membrana. Los ARNs se revelan con una sonda marcada con radioactividad o fluorescencia, la cual es una secuencia de ácido nucleico específica y complementaria para el ARN de interés. Esta técnica se ha utilizado para mostrar la sobreexpresión de oncogenes y la desregulación de genes su-

presores tumorales en células cancerosas cuando son comparadas con tejidos normales (77, 78).

Western blot o inmunoblot. Esta prueba se emplea para identificar proteínas específicas mediante técnicas inmunológicas, las cuales se separan por electroforesis en geles de poliacrilamida y se transfieren a una membrana. La membrana se expone a un anticuerpo que reconoce a la proteína, pudiéndose estudiar, de esta forma, la presencia de la proteína y analizar su cantidad relativa respecto a otras proteínas (79, 80).

Southern blot. Esta técnica se basa en el empleo de enzimas de restricción que corta las hebras de ADN y generan una serie de fragmentos de distinta longitud, los cuales se separan mediante una electroforesis. El ADN se transfieren a una membrana, y se expone a sonda marcada que es complementaria de la secuencia de interés, el patrón de bandas formado indicará el número y el tamaño de los fragmentos complementario con la sonda. Si la población de células en estudio posee alteraciones o deleciones en la secuencia genómica, las enzimas de restricción cortan en otros sitios y se generan fragmentos de ADN de longitudes diferentes respecto a las células normales. La comparación de los bandeos de genoma de células normales y del tejido en estudio, se pone de manifiesto la presencia o ausencia de fragmentos anómalos, y así puede inferirse la existencia o no de alteraciones genéticas (81, 82).

TÉCNICAS BASADAS EN LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA O PCR

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR en inglés fue creada en 1983 por Kary Mullis, la cual implica una reacción de amplificación durante el ensayo. El término “reacción en cadena” se refiere a los varios ciclos de copiado de un fragmento específico de ADN a partir de un

ácido nucleico diana. La región amplificada se caracteriza por dos o más oligonucleótidos cortos y dos cebadores que son complementarios con las regiones de ADN que flanquean la secuencia diana. Utilizando una ADN polimerasa termoestable, que no resulte desnaturalizada durante el ciclo de calentamiento, es posible copiar la secuencia de ADN entre los dos cebadores. Repitiendo de 20 a 40 veces el régimen de ciclos de calentamiento, se obtendrá una cantidad de ADN diana copiado que será suficiente para operaciones ulteriores, tales como la detección, el clonado y la secuenciación. La sensibilidad de diagnóstico de la PCR es muy alta, ya que se producen varios millones de copias de la diana seleccionada, pudiendo ser también muy alta la especificidad de la reacción debida a las secuencias nucleotídicas específicas formadas por los oligonucleótidos (cebadores). Los cebadores están diseñados para detectar secuencias nucleotídicas específicas en los genomas de las dianas seleccionadas (83).

1. Amplificación del ADN. Si el genoma es ADN, se realiza la ampliación de forma directa, con o sin purificación previa del ADN diana (84).
2. Amplificación del ARN. Esta técnica acopla la transcripción reversa de ARN y PCR, consistente en la amplificación de pequeñas moléculas de ARN, tanto total como mensajeros, en forma de cadenas complementarias de ADNc mediante una enzima llamada transcriptasa inversa o reversa. Esta enzima tomando como base o modelo una cadena de ARN es capaz de colocar las bases nucleótidas complementarias para crear una hebra de ADN. Posteriormente, la nueva cadena de ADN creada se amplifica mediante el método de PCR.

Es una técnica rápida que puede realizarse con una pequeña cantidad de muestra, pero es cualitativa indicando

presencia o ausencia de la secuencia específica del ADN, lo cual es una limitación a la hora de monitorizar la enfermedad mínima residual. La sensibilidad es de 10^6 - 10^7 y su elevada sensibilidad puede ser causas de falsos positivos, hecho que puede minimizarse mediante la técnica RT-PCR cuantitativa (85, 86).

A continuación se ofrecen algunos ejemplos de técnicas PCR utilizadas en la actualidad.

- El PCR a tiempo real o PCR cuantitativa. En esta prueba los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea y además, mediante la detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento. Ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado, ello permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. Los termocicladores para llevar a cabo la PCR a tiempo real incorporan un lector de fluorescencia para medir la fluorescencia emitida por la amplificación, y los datos son analizados mediante un software informático (87). La utilidad de la PCR a tiempo real se caracteriza por: la rapidez; el mayor número de ensayos; la utilización de sistemas cerrados por lo que el riesgo de contaminación disminuye; ello permite cuantificar la concentración inicial del ácido nucleico presente en la muestra de manera sencilla y precisa que por los procedimientos convencionales, y adicionalmente permite la determinación de mutaciones puntuales. Hoy por hoy esta técnica es el estándar en la cuantificación de la expresión genética (88, 89).

- Prueba de PCR anidada. Es una técnica muy sensible en la que el producto de una amplificación es utilizado como molde para realizar una segunda amplificación con cebadores que se ubican dentro de la primera secuencia amplificada, es decir, cuando se tiene el primer amplicón se pueden unir los cebadores, y se hace de nuevo una amplificación dentro del amplicón inicial. Este tipo de PCR tiene la ventaja de brindar alta sensibilidad mas gran especificidad, la cual aumenta porque como es amplificación de un amplicón obtenido previamente, los cebadores sólo van a hibridar en un sitio dentro de la molécula y el resultado será una única banda. Así se evitan posibles hibridaciones inespecíficas de los cebadores. La desventaja de ésta técnica es que no nos permite cuantificar la muestra (90, 91).
- Prueba de PCR múltiple o "PCR multiplex". Es un tipo de PCR en el cual se amplifica más de una secuencia en una misma reacción, en este tipo de PCR se utilizan múltiples pares de primers, hasta 8, lo que da una serie de productos. Los amplificados pueden verse como múltiples bandas en un gel. Esta técnica ofrece la ventaja dar información sobre varios locus en una sola reacción (92, 93).

Para el estudio de la enfermedad mínima residual se pueden utilizar, como marcadores moleculares, dianas localizadas tanto en el ADN como en el ARN.

I. Marcadores para el ADN

1. Anomalías cromosómicas. translocaciones, deleciones, aneuploidías (94).
2. Hipermetilación de CpG. Un mecanismo de regulación de la transcripción, y por tanto de la expresión génica, es el control de la metilación de los genes.

- La adición de grupos metilo (CH₃) a las bases del ADN en las regiones reguladoras (promotores) ocasiona generalmente inhibición de la transcripción génica. En tumores se ha visto que la metilación causa frecuentemente la inhibición de la expresión del gen. Los factores que conducen a la metilación de las islas CpG son desconocidos, aunque obviamente puede estar implicada la expresión inadecuada o la actividad de enzimas metilantes del ADN (ADN-metiltransferasas) (95).
3. Mutaciones puntuales en determinados genes. Cerca del 50% de todos los carcinomas contienen alguna mutación del gen supresor tumoral p53, por lo que y como consecuencia de la pérdida de funciones críticas, se producirían re-arreglos cromosómicos y daños genómicos irreparables. La presencia de formas aberrantes de la proteína p53 se correlaciona con parámetros de índole clínico, como serían: mayor agresividad, desarrollo de metástasis y menor supervivencia de los pacientes (96).
 4. Pérdida de heterocigosidad. Normalmente las células poseen dos copias de cada uno de los genes, por lo que, la eventual pérdida de las funciones de un gen supresor, por ende de su producto proteico, determinará un crecimiento celular exagerado y fuera de control, que es característico del cáncer. Por lo general, las deleciones involucran la pérdida de uno de los alelos, fenómeno conocido como pérdida de heterocigosidad (97).
 5. Inestabilidad de microsatélites. La inestabilidad de microsatelites en células de cáncer humano se asocia a alteraciones en ciertos genes, los cuales son homólogos a los que en los microorganismos codifican para las proteínas que reparan los errores ocurri-

dos durante la replicación del ADN al formarse pares de bases erróneos. Son los genes de reparación de errores de replicación o genes MMR, siglas en inglés de MisMatch Repair genes. La inestabilidad de los microsatélites sirve como un indicador de hiper-mutación génica (98).

II. Marcadores para el ARN

1. Transcritos con un patrón de expresión específico. Es ejemplo el ARN mensajero (ARNm) del gen mamaglobina para la detección de células tumorales circulantes en el cáncer de mama (99).
2. Fusión de transcritos. En la leucemia se utiliza como marcador el MLL/AF4. Esta fusión de genes se debe a una translocación entre el cromosoma 4 y 11(100).

La PCR presenta algunas limitaciones

En referencia a su gran sensibilidad, la contaminación y amplificación de fragmentos de ADN extraño puede originar resultados falsos positivos, además puede existir una mayor facilidad de contaminación cuando se utiliza el ARN. La pérdida de sensibilidad también puede ocurrir cuando se utilizan marcadores moleculares de reordenamientos de los genes de las inmunoglobulinas, ya que pueden emerger subclones que predominan sobre el clon original. También, adicionalmente, la alteración de la secuencia del clon IgH debido a mutaciones que impedirían una correcta hibridación, lo cual podría provocar una recurrencia de la enfermedad al no poder ser detectado con las mismas sondas utilizadas para detectar el clon inicial (101, 102).

MICROARRAYS Y PERFIL DE EXPRESIÓN

El desarrollo tecnológico, junto con el avance de la informática, ha permitido la

creación de plataformas que realizan el análisis simultáneo de hasta 40.000 genes de una misma muestra de tejido. Esta tecnología recibe el nombre de microarrays, conocidos también como biochips, genochips o genosensores, la cual se puede aplicar al estudio de los niveles de expresión de genes analizando el ARNm de un tejido (103). Sus aplicaciones en estudios sobre la biología del cáncer son de largo alcance, al ser ésta una enfermedad del genoma a nivel celular, ya que los cambios en la expresión de los genes que están implicados en la carcinogénesis pueden ser identificados, a lo cual se suma que diferentes señales de expresión genética pueden ser identificadas para tipos específicos de cáncer. Las señales moleculares pueden permitir la predicción tanto de la evolución de la enfermedad como de la prescripción de tratamientos más eficientes para un determinado tipo de tumor. Una visión de futuro es desarrollar terapias hechas a medida para cada paciente en función del perfil genético de su tumor primario (104, 105).

La técnica que describimos se fundamenta en preparar placas de silicio o vidrio a cuya superficie se han adherido, según una secuencia conocida y ordenada, diversas moléculas de cADN o bien oligonucleótidos de secuencias diferentes, específicas para un determinado gen o una región de ADN de interés. La tecnología empleada permite unir, en cada biochip, entre decenas y cientos de moléculas diferentes, por lo que se puede hacer, de forma simultánea a partir de una muestra muy pequeña, un número elevado de ensayos. Esencialmente se trata de un ensayo de hibridación en el que papel de sonda lo desempeñan las moléculas unidas al biochip, marcando el ADN o ARN de la muestra, la cual, desnaturalizada, se vierte sobre el biochip para que se hibride con las secuencia de éste. Al lavar se detecta en que posiciones aparece el marcaje (106, 107).

Existen varios tipos de microarrays de ácidos nucleicos:

1. Microarrays de cDNA. Las sondas son producidas en laboratorios mediante la amplificación selectiva de cDNAs, 100-3000 nucleótidos por PCR (108).
2. Microarrays de oligonucleótidos. Las sondas son porciones de DNA sintético de cadena simple que pueden ser cortas (15-25 nucleótidos) o largas (50-120 nucleótidos). Estos fragmentos pueden ser pre-sintetizados y depositados en portaobjetos por robots o sintetizados *in situ* y depositados por ink jet o fotolitografía (DNAchips). Los arrays de cDNA son los más flexibles y usados en investigación porque permiten depositar genes o fragmentos de genes amplificados de cualquier especie, y así diseñar y generar de manera sencilla y menos costosa el grupo de sondas (109).
3. Microarrays de proteínas. Las sondas son anticuerpos fijados a portaobjetos de vidrio, y los blancos son muestras de suero o tejido (110).
4. Microarrays de tejidos (TMA). Llamada también micro-matriz tisular, proporciona un nuevo método de alto rendimiento para estudiar el perfil molecular, expresión de ARNm o el análisis de alteraciones cromosómicas mediante hibridación *in situ* a partir de tejidos que se encuentran incluidos en bloques de parafina (111).

En conclusión, como hemos visto, la enfermedad mínima residual se caracteriza por la presencia de una pequeña cantidad de células tumorales residuales tras un tratamiento con intención curativa aplicadas a un paciente con cáncer. El objetivo fundamental de esta revisión ha sido dar a conocer las técnicas que se utilizan actualmente en este campo. Por ello se ha dado una visión general y ordenada del problema con

el fin informar y ayudar a optimizar las estrategias tendientes a lograr los mejores resultados de tratamiento tanto para los pacientes portadores de esta enfermedad, bien sea localmente avanzada al momento del diagnóstico como con alto riesgo de recurrencia. Para alcanzar tal propósito ello exige conocer las técnicas existentes hasta la fecha, así como los marcadores pronósticos específicos para cada tipo de cáncer, ya que la utilización de los mismos requiere la aplicación adecuada de las técnicas más corrientes, las optimizadas y las más novedosas, muchas de ellas altamente sensibles y específicas.

REFERENCIAS

1. **Fidler IJ.** The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 453-458.
2. **Arvelo F, Poupon MF.** Aspectos moleculares y celulares de la metástasis cancerosa. *Acta Cient Venez* 2001; 52: 304-312.
3. **Bidard FC, Poupon MF.** The metastatic process: history, models and recent advances. *Med Sci (Paris)* 2012; 28:89-95.
4. **Chaffer CL, Weinberg RA.** A perspective on cancer cell metastasis. *Science*. 2011; 331:1559-1564.
5. **Arvelo F, Merentes E, Cotte C.** Resistencia multidroga (MDR) o pleiotropica. *Acta Cient Venez* 2000; 51:45-52.
6. **Arvelo F, Cotte C.** Hipoxia en la malignidad del Cáncer. *Invest Clín* 2009; 50: 529-546.
7. **Arvelo F, Cotte C.** Metaloproteasas en la progresión tumoral. *Invest Clín* 2006; 47:185-205.
8. **Mayora A, Arvelo F.** Cáncer de próstata y apoptosis. *Invest Clín* 2011; 52: 376-396.
9. **Hanel W, Moll UM.** Links between mutant p53 and genomic instability. *J Cell Biochem* 2012; 113:433-439.
10. **Lugo TG, Braun S, Cote RJ, Pantel, K Rusch V.** Detection and measurement of occult disease for the prognosis of solid tumors. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2609-2615.
11. **Doekhie F, Kuppen P, Peeter K, Mesker W, van Soest R, Morroau H.** Prognostic relevance of occult tumor cells in lymph nodes in colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol* 2006; 32: 253-258.
12. **Kell MR, Winter DC, O'Sullivan GC, Shanahan F, Redmond HP.** Biological behaviour and clinical implications of micro-metastases. *Br J Surg* 2000; 87: 1629-1639.
13. **Freeman SD, Jovanovic JV, Grimwade D.** Development of minimal residual disease-directed therapy in acute myeloid leukemia. *Semin Oncol* 2008; 35:388-400.
14. **Schrohl A, Holten-Andersen M, Sweep F, Schmitt M, Harberck N, Foekens J, Brunner N.** Tumor markers: from laboratory to clinical utility. *Mol Cell Proteomics* 2003; 2: 378-387.
15. **Lindblom A, Liljegren A.** Tumour markers in malignancies. *BMJ* 2000; 320: 424-427.
16. **Steinarsdottir M, Gudmundsson IH, Jonasson JG, Olafsdottir EJ, Eyfjörd JE, Ogmundsdottir HM.** Cytogenetic polyclonality of breast carcinomas: association with clinico-pathological characteristics and outcome. *Genes Chromosomes Cancer* 2011; 50:930-939.
17. **Sturgeon C.** Practice guidelines for tumor marker use in the clinic. *Clin Chem* 2002; 48:1151-1159.
18. **Vázquez V, Otero L, Laurent V, Gabri M, Gómez D, Alonso D.** Detección Molecular de enfermedad mínima residual en melanoma y otros tumores sólidos. *Medicina* 2009; 69: 181-190.
19. **Zhu X, Albertsen PC, Andriole GL, Roobol MJ, Schröder FH, Vickers AJ.** Risk-based prostate cancer screening. *Eur Urol* 2012; 61:652-661.
20. **Morote Robles J.** Cuantificación de la isoforma compleja del antígeno prostático específico (PSAc). Un nuevo reto en la era PSA. *Med Clin (Bare)* 2004; 122:256-258.
21. **Murray ML, Cerrato F, Bennett RL, Jarvik GP.** Follow-up of carriers of BRCA1 and BRCA2 variants of unknown significance: variant reclassification and surgical decisions. *Genet Med* 2011; 13:998-1005.

22. Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer* 2011; 12: 68-78.
23. Rodríguez, Rauh-Hain JA, Shoni M, Berkowitz RS, Muto MG, Feltmate C, Schorge JO, Del Carmen MG, Matulonis UA, Horowitz NS. Changes in serum CA-125 can predict optimal cytoreduction to no gross residual disease in patients with advanced stage ovarian cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Gynecol Oncol* 2012; 125:362-366.
24. Díaz-Padilla I, Razak AR, Minig L, Bernardini MQ, María Del Campo J. Prognostic and predictive value of CA-125 in the primary treatment of epithelial ovarian cancer: potentials and pitfalls. *Clin Transl Oncol* 2012; 14:15-20.
25. Castellanos E, Berlin J, Cardin DB. Current treatment options for pancreatic carcinoma. *Curr Oncol Rep* 2011; 13:195-205.
26. Satoi S, Yanagimoto H, Toyokawa H, Inoue K, Wada K, Yamamoto T, Hirooka S, Yamaki S, Yui R, Mergental H, Kwon AH. Selective use of staging laparoscopy based on carbohydrate antigen 19-9 level and tumor size in patients with radiographically defined potentially or borderline resectable pancreatic cancer. *Pancreas* 2011; 40:426-432.
27. Bataille R, Jégo G, Robillard N, Barillé-Nion S, Harousseau JL, Moreau P, Amiot M, Pellat-Deceunynck C. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica* 2006; 91:1234-1240.
28. Gupta R, Bhaskar A, Kumar L, Sharma A, Jain P. Flow cytometric immunophenotyping and minimal residual disease analysis in multiple myeloma. *Am J Clin Pathol* 2009; 132: 728-732.
29. Secreto G, Meneghini E, Venturelli E, Cogliati P, Agresti R, Ferraris C, Gion M, Zancan M, Fabricio AS, Berrino F, Cavalleri A, Micheli A. Circulating sex hormones and tumor characteristics in postmenopausal breast cancer patients. A cross-sectional study. *Int J Biol Markers* 2011; 26:241-246.
30. Amir E, Miller N, Geddie W, Freedman O, Kassam F, Simmons C, Oldfield M, Dranitsaris G, Tomlinson G, Laupacis A, Tannock IF, Clemons M. Prospective study evaluating the impact of tissue confirmation of metastatic disease in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 2012; 30:587-592.
31. van Dongen JJ, Szczepański T, de Bruijn MA, van den Beemd MW, de Bruin-Versteeg S, Wijkhuijs JM, Tibbe GJ, van Gastel-Mol EJ, Groeneveld K, Hooijkaas H. Detection of minimal residual disease in acute leukemia patients. *Cytokines Mol Ther* 1996; 2:121-133.
32. Cleophas TJ, Droogendijk J, van Ouwkerk BM. Validating diagnostic tests, correct and incorrect methods, new developments. *Curr Clin Pharmacol* 2008; 3: 70-76.
33. Moll R, Franke WW, Schiller DI, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982; 31: 11-24.
34. de Silva Rudland S, Platt-Higgins A, Winstanley JH, Jones NJ, Barraclough R, West C, Carroll J, Rudland PS. Statistical association of basal cell keratins with metastasis-inducing proteins in a prognostically unfavorable group of sporadic breast cancers. *Am J Pathol* 2011; 179: 1061-1072.
35. Bayrak R, Yenidünya S, Haltas H. Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in colorectal adenocarcinomas. *Pathol Res Pract* 2011; 207:156-160.
36. Makino A, Serra S, Chetty R. Composite adenocarcinoma and large cell neuroendocrine carcinoma of the rectum. *Virchows Arch* 2006; 448:644-647.
37. Roh JH, Srivastava A, Lauwers GY, An J, Jang KT, Park CK, Sohn TS, Kim S, Kim KM. Micropapillary carcinoma of stomach: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 11 cases. *Am J Surg Pathol* 2010; 34:1139-1146.
38. Lee SE, Jang JY, Kim MA, Kim SW. Clinical implications of immunohistochemically

- demonstrated lymph node micrometastasis in resectable pancreatic cancer. *J Korean Med Sci* 2011; 26:881-885.
39. **Chen Y, Cui T, Yang L, Mireskandari M, Knoesel T, Zhang Q, Pacyna-Gengelbach M, Petersen I.** The diagnostic value of cytokeratin 5/6, 14, 17, and 18 expression in human non-small cell lung cancer. *Oncology* 2011; 80: 333-340.
 40. **Fernández-Aceñero MJ, Córdova S, Manzarbeitia F, Medina C.** Immunohistochemical profile of urothelial and small cell carcinomas of the bladder. *Pathol Oncol Res* 2011; 17: 519-523.
 41. **Klatte T, Said JW, Seligson DB, Rao PN, de Martino M, Shuch B, Zomorodian N, Kabbinavar FF, Belldegrun AS, Pantuck AJ.** Pathological, immunohistochemical and cytogenetic features of papillary renal cell carcinoma with clear cell features. *J Urol* 2011; 185:30-35.
 42. **Krag DN, Kusminsky R, Manna E, Ambaye A, Weaver DL, Harlow SP, Covelli M, Stanley MA, McCahill L, Ittleman F, Leavitt B, Krag M.** The detection of isolated tumor cells in bone marrow comparing bright-field immunocytochemistry and multicolor immunofluorescence. *Ann Surg Oncol* 2005; 1:753-760.
 43. **Braun S, Pantel K.** Immunocytochemical detection and characterization of individual micrometastatic tumor cells. *Methods Mol Med* 2001; 57:67-73.
 44. **Horstmann O, Füzesi L, Markus PM, Werner C, Becker H.** Significance of isolated tumor cells in lymph nodes among gastric cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130:733-740.
 45. **Brown M, Wittner C.** Flow cytometry: Principles and clinical applications in hematology. *Clin Chem* 2000; 46: 1221-1229.
 46. **Jaroszeski M, Radcliff G.** Fundamentals of flow cytometry. *Mol Biotechnol* 1999; 11: 37-53.
 47. **Radcliff G, Jaroszeski M.** Basics of flow cytometry. *Methods Mol Biol* 1998; 91: 1-24.
 48. **de Moraes AC, Licínio MA, Zampirolo JA, Liedke SC, Del Moral JA, Machado MJ, Bazzo ML, da Silva MC.** Evaluation of multidrug resistance in 46 newly diagnosed patients with acute leukemia. *Hematology*. 2012; 17:59-65.
 49. **Böttcher S, Ritgen M, Fischer K, Stilgenbauer S, Busch RM, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Bühler A, Zenz T, Wenger MK, Mendila M, Wendtner CM, Eichhorst BF, Döhner H, Hallek MJ, Kneba M.** Minimal residual disease quantification is an independent predictor of progression-free and overall survival in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate analysis from the randomized GCLLSG CLL8 trial. *J Clin Oncol* 2012; 30: 980-988.
 50. **Ogata K.** Diagnostic flow cytometry for low-grade myelodysplastic syndromes. *Hematol Oncol* 2008; 26: 193-198.
 51. **Al-Mawali A, Gillis D, Lewis I.** The role of multiparameter flow cytometry for detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Am J Clin Pathol* 2009; 131: 16-26.
 52. **Dworzak MN, Gaipa G, Schumich A, Maglia O, Ratei R, Veltroni M, Husak Z, Basso G, Karawajew L, Gadner H, Biondi A.** Modulation of antigen expression in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia during induction therapy is partly transient: evidence for a drug-induced regulatory phenomenon. Results of the AIEOP-BFM-ALL-FLOW-MRD-Study Group. *Cytometry B Clin Cytom* 2010; 78:147-153.
 53. **Pui CH, Raimondi S, Head D, Schell M, Rivera J, Mirro J, Crist W, Behm F.** Characterization of childhood acute leukemia with multiple myeloid and lymphoid markers and diagnosis at relapse. *Blood* 1991; 78: 1327-1337.
 54. **Matutes E, Pickl WF, Van't Veer M, Morilla R, Swansbury J, Strobl H, Attarbaschi A, Hopfinger G, Ashley S, Bene MC, Porwit A, Orfao A, Lemez P, Schabath R, Ludwig WD.** Mixed-phenotype acute leukemia: clinical and laboratory features and outcome in 100 patients defined according to the WHO 2008 classification. *Blood* 2011; 117: 3163-3171.

55. **Thompson SL, Compton DA.** Chromosomes and cancer cells. *Chromosome Res* 2011; 19: 433-444.
56. **Cheng K, Loeb L.** Genomic stability and instability: A working paradigm. *Curr Top Microbiol Immunol* 1997; 221: 5-18.
57. **Patel AS, Hawkins AL, Griffin CA.** Cytogenetics and cancer. *Curr Opin Oncol* 2000; 12: 62-67.
58. **Rønne M.** Chromosome preparation and high resolution banding (review). *In Vivo* 1990; 4: 337-365.
59. **Janssen A, van der Burg M, Szuhai K, Kops GJ, Medema RH.** Chromosome segregation errors as a cause of DNA damage and structural chromosome aberrations. *Science* 2011; 333:1895-1898.
60. **Oren H, Yilmaz S, Sercan Z, Demircioğlu F, Yüksel E, Irken G.** Isolated myeloid sarcoma development in an adolescent chronic myeloid leukemia patient with t(9;22)(q34; q11.2), +8, +14, +21, and der(1)(p36). *Cancer Genet Cytogenet.* 2008; 182: 43-45.
61. **Znoyko I, Stuart RK, Ellingham T, Winters J, Wolff DJ, Quigley DI.** Tetraploidy and 5q deletion in myelodysplastic syndrome: a case report. *Cancer Genet Cytogenet* 2008; 183: 64-68.
62. **Ponti G, Luppi G, Giacobbi F, Corradini G, Temperani P, Losi L, Ferrara L, Pagano M, Seidenari S, Tagliafico E, Torelli G, Conte P.** Cytogenetic abnormalities and clinical features in a patient cohort affected by three or more synchronous or metachronous primitive malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* 2010; 200: 1-7.
63. **Hyytinen E, Visakorpi T, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Isola JJ.** Improved technique for analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded tumors by fluorescence in situ hybridization. *Cytometry* 1994; 16:93-99.
64. **Oudard S., Arvelo, F., Miccoli L., Apiou F., Dutrillaux A.M., Poisson, M., Dutrillaux B., and Poupon M.F.** High glycolysis in gliomas despite low hexokinase transcription and activity correlated to chromosome 10 loss. *Br J Cancer* 1996; 74: 839-845.
65. **Bennour A, Bellâaj H, Ben Youssef Y, Elloumi M, Khelif A, Saad A, Sennana H.** Molecular cytogenetic characterization of Philadelphia-negative rearrangements in chronic myeloid leukemia patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011; 137: 1329-1336.
66. **Dimov ND, Medeiros LJ, Kantarjian HM, Cortes JE, Chang KS, Bueso-Ramos CE, Ravandi F.** Rapid and reliable confirmation of acute promyelocytic leukemia by immunofluorescence staining with an antipromyelocytic leukemia antibody: the M. D. Anderson Cancer Center experience of 349 patients. *Cancer* 2010; 116: 369-376.
67. **Gozzetti A, Le Beau MM.** Fluorescence in situ hybridization: uses and limitations. *Semin Hematol* 2000; 37: 320-333.
68. **Lai YY, Huang XJ.** Cytogenetic characteristics of B cell chronic lymphocytic leukemia in 275 Chinese patients by fluorescence in situ hybridization: a multicenter study. *Chin Med J (Engl)* 2011; 124: 2417-2422.
69. **Badawy T, El-Abd S, Zahra M, Eid M, Abdou S, El-Shazly S.** Quantitative measurement of telomerase reverse transcriptase mRNA and chromosomal analysis of urine by M-FISH in the diagnosis and follow-up of bladder cancer. *Mol Med Report* 2008; 1: 325-333.
70. **Carpenter NJ.** Molecular cytogenetics. *Semin Pediatr Neurol* 2001; 8(3):135-146.
71. **Reisenbichler ES, Horton D, Rasco M, Andea A, Hameed O.** Evaluation of dual immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization for HER2 on a single section. *Am J Clin Pathol* 2012; 137:102-110.
72. **Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F.** Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; 258: 818-821.
73. **Gebhart E.** Comparative genomic hybridization (CGH): ten years of substantial progress in human solid tumor molecular cytogenetics. *Cytogenet Genome Res* 2004; 104: 352-358.
74. **Sun YF, Yang XR, Zhou J, Qiu SJ, Fan J, Xu Y.** Circulating tumor cells: advances in

- detection methods, biological issues, and clinical relevance. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011; 137:1151-1173.
75. **Gebhart E, Liehr T.** Patterns of genomic imbalances in human solid tumors. *Int J Oncol* 2000; 16: 383-399.
76. **Zitzelsberger H, Lehmann L, Werner M, Bauchinger M.** Comparative genomic hybridisation for the analysis of chromosomal imbalances in solid tumours and haematological malignancies. *Histochem Cell Biol* 1997; 108: 403-417.
77. **Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR.** Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74: 5350-5354.
78. **Streit S, Michalski CW, Erkan M, Kleeff J, Friess H.** Northern blot analysis for detection and quantification of RNA in pancreatic cancer cells and tissues. *Nat Protoc* 2009; 4:37-43.
79. **Towbin H, Staehelin T, Gordon J.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 4350-4354
80. **Chen JT, Cheng YW, Chou MC, Sen-Lin T, Lai WW, Ho WL, Lee H.** The correlation between aberrant connexin 43 mRNA expression induced by promoter methylation and nodal micrometastasis in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4200-4204.
81. **Southern, E.M.** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98: 503-517.
82. **Wong IH, Chan AT, Johnson PJ.** Quantitative analysis of circulating tumor cells in peripheral blood of osteosarcoma patients using osteoblast-specific messenger RNA markers: a pilot study. *Clin Cancer Res* 2000; 6:2183-2188.
83. **Ma TS.** Applications and limitations of polymerase chain reaction amplification. *Chest* 108; 1995: 1393-1404.
84. **Niedergethmann M, Rexin M, Hildenbrand R, Knob S, Sturm JW, Richter A, Post S.** Prognostic implications of routine, immunohistochemical, and molecular staging in resectable pancreatic adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2002; 26: 1578-1587.
85. **Saloustrous E, Perraki M, Apostolaki S, Kallergi G, Xyrafas A, Kalbakis K, Agelaki S, Kalykaki A, Georgoulas V, Mavroudis D.** Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells during follow-up of patients with operable breast cancer: prognostic relevance for late relapse. *Breast Cancer Res* 2011; 13: 1-11
86. **van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F, Parreira A, Gameiro P, Díaz MG, Malec M, Langerak AW, San Miguel JF, Biondi A.** Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999; 13:1901-1928.
87. **Higuchi R, Fokler C, Dollinger G, Watson R.** Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology* 1993; 11: 1026-1030.
88. **Heid C, Stevens J, Livak K, Williams P.** Real-time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6: 986-994.
89. **Liu Z, Xie X, Qu S, Zheng Z, Wang Y.** Small breast epithelial mucin (SBEM) has the potential to be a marker for predicting hematogenous micrometastasis and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Clin Exp Metastasis* 2010; 27: 251-259.
90. **Valladares-Ayerbes M, Iglesias-Díaz P, Díaz-Prado S, Ayude D, Medina V, Haz M, Reboredo M, Antolín S, Calvo L, Antón-Aparicio LM.** Diagnostic accuracy of small breast epithelial mucin mRNA as a marker for bone marrow micrometastasis in breast cancer: a pilot study. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135:1185-1195.
91. **Bitisik O, Saip P, Saglam S, Derin D, Dalay N.** Mammaglobin and maspin transcripts in blood may reflect disease progression and the effect of therapy in breast cancer. *Genet Mol Res* 2010; 9:97-106.

92. **Elnifro E, Ashshi A, Cooper R, Klapper P.** Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 559-570.
93. **Shimizu Y, Takeuchi H, Sakakura Y, Saikawa Y, Nakahara T, Mukai M, Kitajima M, Kitagawa Y.** Molecular detection of sentinel node micrometastases in patients with clinical N0 gastric carcinoma with real-time multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *Ann Surg Oncol* 2012; 19:469-477.
94. **Janssen A, van der Burg M, Szuhai K, Kops GJ, Medema RH.** Chromosome segregation errors as a cause of DNA damage and structural chromosome aberrations. *Science* 2011; 333: 1895-1898.
95. **Hiraki M, Kitajima Y, Koga Y, Tanaka T, Nakamura J, Hashiguchi K, Noshiro H, Miyazaki K.** Aberrant gene methylation is a biomarker for the detection of cancer cells in peritoneal wash samples from advanced gastric cancer patients. *Ann Surg Oncol* 2011; 18: 3013-3019.
96. **Lane DP, Brown CJ, Verma C, Cheok CF.** New insights into p53 based therapy. *Discov Med* 2011; 12: 107-117.
97. **Mizoguchi M, Kuga D, Guan Y, Hata N, Nakamizo A, Yoshimoto K, Sasaki T.** Loss of heterozygosity analysis in malignant gliomas. *Brain Tumor Pathol* 2011; 28: 191-196.
98. **Kaur G, Masoud A, Raihan N, Radzi M, Khamizar W, Kam LS.** Mismatch repair genes expression defects & association with clinicopathological characteristics in colorectal carcinoma. *Indian J Med Res* 2011; 134:186-192.
99. **Ferrucci PF, Rabascio C, Gigli F, Corsini C, Giordano G, Bertolini F, Martinelli G.** A new comprehensive gene expression panel to study tumor micrometastasis in patients with high-risk breast cancer. *Int J Oncol* 2007; 30:955-962.
100. **Daniel-Cravioto A, Gonzalez-Bonilla CR, Mejia-Arangure JM, Perez-Saldivar ML, Fajardo-Gutierrez A, Jimenez-Hernandez E, Hernandez-Serrano M, Bekker-Mendez VC.** Genetic rearrangement MLL/AF4 is most frequent in children with acute lymphoblastic leukemias in Mexico City. *Leuk Lymphoma* 2009; 50: 1352-1360.
101. **García-Castillo H, Barros-Núñez P.** Detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombination in hematological malignancies: monitoring minimal residual disease. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2009; 9:124-135.
102. **Linden T, Furlan I, Schwarz S, Stoehr R, Niemeyer CM, Rossig C.** Sequential acquisition of IgH and TCR rearrangements during the preleukemic phase of acute lymphoblastic leukemia in an adolescent patient. *Pediatr Blood Cancer* 2011; 56: 301-303.
103. **Schena M, Shalon D, Davis R, Brown P.** Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270: 467-470.
104. **Weigelt B, Baehner FL, Reis-Filho JS.** The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *J Pathol* 2010; 220: 263-280.
105. **Clarke PA, te Poele R, Workman P.** Gene expression microarray technologies in the development of new therapeutic agents. *Eur J Cancer* 2004; 40:2560-2591.
106. **Aitman T.** DNA microarrays in medical practice. *BMJ* 2001; 323: 611-615.
107. **Coustan-Smith E, Song G, Clark C, Key L, Liu P, Mehrpooya M, Stow P, Su X, Shurtleff S, Pui CH, Downing JR, Campana D.** New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2011; 117:6267-6276.
108. **Zhang SN, Sun HH, Jin YM, Piao LZ, Jin DH, Lin ZH, Shen XH.** Identification of differentially expressed genes in gastric cancer by high density cDNA microarray. *Cancer Genet* 2012; 205: 147-155.
109. **Kolquist KA, Schultz RA, Slovak ML, McDaniel LD, Brown TC, Tubbs RR, Cook JR, Theil KS, Cawich V, Valentin C, Minier S, Neill NJ, Byerly S, Morton SA, Sahoo T, Ballif BC, Shaffer LG.** Evaluation of chronic lymphocytic leukemia by oligonucleotide-based microarray analysis

- uncovers novel aberrations not detected by FISH or cytogenetic analysis. *Mol Cytogenet* 2011; 4: 25-29.
110. **Abajo A, Bitarte N, Zarate R, Boni V, Lopez I, Gonzalez-Huarriz M, Rodríguez J, Bandres E, Garcia-Foncillas J.** Identification of colorectal cancer metastasis markers by an angiogenesis-related cytokine-antibody array. *World J Gastroenterol* 2012; 18:637-645.
111. **Kobierzycki C, Pula B, Wojnar A, Podhorska-Okolow M, Dziegiel P.** Tissue microarray technique in evaluation of proliferative activity in invasive ductal breast cancer. *Anticancer Res* 2012; 32: 773-777.