

## DETECCION MOLECULAR DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN MELANOMA Y OTROS TUMORES SOLIDOS

VALERIA VAZQUEZ, LAURA L. OTERO, VIVIANA E. LAURENT, MARIANO R. GABRI,  
DANIEL E. GOMEZ, DANIEL F. ALONSO

*Laboratorio de Oncología Molecular, Departamento de Ciencia y Tecnología,  
Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires*

**Resumen** La disponibilidad de métodos altamente sensibles y específicos para la detección de enfermedad mínima residual en pacientes con tumores sólidos podría tener importantes consecuencias pronósticas y terapéuticas. Uno de los métodos más usados para la detección molecular de células cancerosas es la técnica de RT-PCR, que permite la amplificación de secuencias de ARNm específicas de distintos tejidos. La misma fue aplicada por primera vez en la detección de células tumorales circulantes en sangre periférica de pacientes con melanoma avanzado, poco tiempo después fue adaptada para la búsqueda de enfermedad mínima residual en otros tumores sólidos. El objetivo de la presente revisión es evaluar la información publicada desde el primer estudio sobre este tema en 1991 y analizar el valor clínico de los hallazgos obtenidos. Se discute también la importancia del manejo de la muestra y de la estandarización de los procedimientos de RT-PCR.

**Palabras clave:** ARNm, transcripción reversa, reacción en cadena de la polimerasa, tirosinasa, melanoma, cáncer

**Abstract** *Molecular detection of minimal residual disease in melanoma and solid tumors.* The availability of highly sensitive and specific methods for the detection of minimal residual disease in patients with solid tumors may have important prognostic and therapeutic implications. One of the most widely used methods for the molecular detection of cancer cells is the RT-PCR technique, which leads to the amplification of tissue-specific mRNA. It was firstly applied in the detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with advanced melanoma; and soon it was adapted for the detection of minimal residual disease in other solid tumors. The aim of the present review is to evaluate the published data since the first study in 1991 and to analyze the clinical value of the findings obtained. The importance of sample handling and standardization of RT-PCR procedures is also discussed.

**Key words:** mRNA, reverse transcription, polymerase chain reaction, tyrosinase, melanoma, cancer

A pesar de los avances terapéuticos logrados en oncología durante las últimas décadas, muchos pacientes mueren a causa de cáncer metastásico, incluso sin haber presentado signos de enfermedad clínicamente detectable luego del tratamiento. En estos pacientes, la recurrencia se origina a partir de residuos tumorales microscópicos que constituyen la denominada enfermedad mínima residual. Esta no se detecta mediante técnicas de imagen convencionales, requiriéndose la aplicación de métodos citométricos o moleculares<sup>1</sup>. La enfermedad

mínima residual puede ser detectada en diferentes compartimientos corporales, incluyendo la sangre periférica, la médula ósea y los ganglios linfáticos<sup>2-4</sup>.

Los métodos moleculares utilizados en la detección de la enfermedad mínima residual incluyen técnicas derivadas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)<sup>1</sup>, la cual permite detectar secuencias particulares de ácidos nucleicos, ya sea desoxirribonucleico (ADN) o ribonucleico (ARN). Esta técnica amplifica geométricamente la secuencia de interés y es capaz de poner de manifiesto la presencia de ácidos nucleicos, aun cuando éstos se encuentren en cantidades mínimas. Para llevar a cabo la detección es indispensable contar con secuencias marcadoras específicas, cuya expresión se asocie a determinadas variantes de cáncer. De tal forma, es posible detectar las células tumorales que porten la correspondiente secuencia.

Recibido: 22-V-2008

Aceptado: 5-VIII-2008

**Dirección postal:** Dr. Daniel Alonso, Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes, R. Sáenz Peña 352, 1876 Bernal, Buenos Aires, Argentina

Fax: (54-11) 4365-7132

e-mail: dfalonso@unq.edu.ar

## Marcadores tumorales y enfermedad residual

Los marcadores tumorales –o “biomarcadores”– son moléculas producidas tanto por el organismo en respuesta al crecimiento tumoral como por el propio tejido transformado<sup>5</sup>. Algunos marcadores son específicos de una variante tumoral, mientras que otros pueden encontrarse en varios tipos de cáncer. Los marcadores tumorales no son capaces de asegurar el diagnóstico de procesos neoplásicos por sí mismos, ya que obviamente el diagnóstico certero de la enfermedad depende, en última instancia de un apropiado estudio histopatológico a partir de material biopsico. Sin embargo, proveen una información muy útil, contribuyendo a diagnosticar precozmente la enfermedad, establecer el pronóstico, predecir la res-

puesta al tratamiento o detectar la recurrencia, por citar algunos ejemplos<sup>6-12</sup>. La Tabla 1 presenta una clasificación detallada de los marcadores tumorales de acuerdo con el tipo de información que brinda cada uno.

En el caso de la detección de la enfermedad mínima residual, los biomarcadores aplicables a este objetivo podrían incluirse en la categoría de marcadores de pronóstico. Ayudan a prever en forma anticipada la recurrencia del tumor o la supervivencia del enfermo –sin importar el tipo de terapia utilizada–, constituyendo un indicio del grado de agresividad o progresión de la enfermedad<sup>5</sup>.

Existe más de una manera de abordar la elección del marcador a utilizar en la detección molecular. Una de ellas es la búsqueda de moléculas que se expresen en la

TABLA 1.– Clasificación de los marcadores tumorales

Tipo	Utilidad	Ejemplo
Marcadores de detección temprana	Se aplican para la identificación de nuevos casos de cáncer. La mayoría no son aptos para pesquisas en la población general, pero algunos pueden ser útiles en individuos con una fuerte historia familiar de algún cáncer particular.	PSA en cáncer de próstata <sup>6</sup> .
Marcadores de riesgo	Se basan en la identificación de mutaciones germinales heredadas en genes involucrados en tumorigénesis. En su mayoría se trata de genes supresores tumorales o genes que codifican para moléculas que mantienen la estabilidad del genoma.	Mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 en cáncer de mama <sup>7</sup> .
Marcadores diagnósticos	Se utilizan en casos de pacientes con síntomas para establecer el origen de un tumor indiferenciado, ayudando a definir la estirpe celular que dio origen a la enfermedad.	CA-125 en cáncer de ovario <sup>8</sup> .
Marcadores de estadificación	Una vez diagnosticada la enfermedad, ayudan a determinar si la misma ha avanzado y si las células cancerosas han invadido otros tejidos y órganos.	Niveles de CA19-9 en ciertos casos de cáncer de páncreas <sup>9</sup> .
Marcadores pronósticos	Contribuyen a valorar la agresividad tumoral o determinar el comportamiento del tumor. Estos biomarcadores ofrecen información sobre la futura evolución clínica del paciente al momento del diagnóstico o de la extirpación quirúrgica.	Expresión aberrante de CD117 en casos de mieloma múltiple <sup>10</sup> .
Marcadores predictivos	Establecen la probabilidad de respuesta a algún tipo de tratamiento y pueden ser útiles para monitorear su efectividad.	Expresión de receptores de estrógeno en la terapia hormonal en cáncer de mama <sup>11</sup> .
Marcadores de recurrencia	Permiten monitorear la recurrencia de la enfermedad. Si el tratamiento disminuye los niveles del marcador, su aumento posterior denota la recurrencia. Si permanece elevado, es probable que el tumor no se haya removido completamente.	CEA en cáncer colorrectal, luego de la resección quirúrgica <sup>12</sup> .

PSA: prostate-specific antigen; CEA: carcinoembryonic antigen.

estirpe celular de la cual proviene el tumor primario, y que no se encuentren normalmente en el compartimiento tisular de donde se toma la muestra. De este modo, la presencia del marcador sólo puede provenir de células diseminadas a partir del tumor. Este es el enfoque predominante para los marcadores utilizados en la detección de células circulantes en tumores sólidos. Resulta fundamental que el marcador se exprese independientemente del grado de diferenciación de las células tumorales, sobre todo si se pretende detectar la enfermedad mínima residual en los estadios más avanzados. Otra alternativa para escoger un marcador tumoral es optar por moléculas que no sólo se expresen en tumores poco diferenciados sino que, además, su presencia aporte ventajas adaptativas a las células tumorales. Esta condición podría proporcionar una mayor confiabilidad al marcador, considerando la inestabilidad genética y fenotípica propia de las poblaciones transformadas.

La presencia de células malignas en la sangre periférica es un fenómeno fundamental durante el desarrollo de la diseminación a distancia de los tumores sólidos<sup>4, 13</sup>. Por lo tanto, la posibilidad de detectar células metastásicas con métodos confiables de base molecular podría representar una herramienta pronóstica de gran valor en pacientes oncológicos. En los últimos años, la importancia adjudicada a estas herramientas se ha reflejado en una considerable cantidad de trabajos desarrollados en la búsqueda de marcadores tumorales altamente sensibles y específicos, buena parte en melanoma metastásico<sup>14-45</sup>. El comportamiento agresivo del melanoma ha sido atribuido a características fenotípicas propias del linaje celular de la estirpe melánica, sugiriendo que ciertos factores presentes antes de la transformación neoplásica tendrían un papel central en la propensión a generar metástasis, aun a partir de cargas tumorales muy bajas<sup>46</sup>. De tal forma que el melanoma es un modelo atractivo en el desarrollo de biomarcadores para la detección de enfermedad residual, atendiendo a su tendencia a diseminarse rápidamente y a la identificación inequívoca mediante métodos moleculares del linaje celular involucrado.

Los marcadores tumorales basados en la técnica molecular de transcripción reversa seguida de PCR anidada (RT-PCR anidada) son los más difundidos para la detección de enfermedad mínima residual. En términos sencillos, la técnica consiste en la retrotranscripción de una secuencia específica de ARN mensajero de interés a "copia" de ADN y, a partir de esta copia se efectúan, dos rondas sucesivas de amplificación por PCR. La corta vida media del ARN mensajero y su inestabilidad fuera de la célula, permiten suponer que una detección positiva de la secuencia debería provenir de una célula íntegra y probablemente viable.

## Detección molecular en melanoma

La relevancia clínica de la detección de enfermedad mínima residual en tumores sólidos a partir de muestras de sangre periférica todavía se encuentra en debate. Como se comentó más arriba, el mayor caudal de experiencia se ha obtenido en el estudio de pacientes con melanoma avanzado. Muchos grupos de investigadores abocados al estudio de marcadores pronósticos en pacientes con melanoma han obtenido resultados satisfactorios<sup>14-17, 19-21, 23-26, 28-30, 34, 35, 37-45</sup>, aunque en otros trabajos no se ha podido arribar a hallazgos similares<sup>18, 22, 27, 31-33, 36</sup>. Estas contradicciones han retrasado el posicionamiento de la detección molecular de enfermedad mínima residual en el uso clínico, tanto en melanoma como en otros tumores sólidos.

Smith y col.<sup>47</sup> fueron los primeros en desarrollar un método de detección de células de melanoma en sangre utilizando la técnica de RT-PCR anidada. Mediante la misma lograron detectar la presencia del ARN mensajero transcrito a partir del gen de la tirosinasa, el cual se expresa activamente en células de melanoma y es un marcador robusto del linaje melanocítico<sup>48</sup>. El producto proteico de este gen es una enzima que participa directamente en el proceso de melanogénesis. Se sabe que la tirosinasa se expresa en los estadios avanzados de la enfermedad y se la ha detectado incluso en pacientes con melanoma amelanótico<sup>49</sup>.

Luego de este estudio pionero en melanoma, continuaron numerosos trabajos orientados, entre otros objetivos, a aumentar la especificidad y sensibilidad de la técnica<sup>14, 15, 50</sup>, definir otros marcadores útiles<sup>14, 15, 25, 28, 50</sup>, correlacionar el resultado obtenido con el estadio de la enfermedad<sup>48, 51-53</sup> y comprobar el valor pronóstico de los resultados obtenidos en muestras de sangre de pacientes<sup>14, 15, 18, 20, 23, 28, 30, 34-36, 50, 54, 55</sup>.

Con la intención de aumentar la especificidad y sensibilidad de la detección molecular, se ensayaron técnicas de RT-PCR o RT-PCR anidada seguidas de *Southern blots*, aplicando sondas específicas para detectar el producto amplificado<sup>15, 50</sup>. No obstante, la utilización de esta técnica no aportó mayores beneficios a la detección molecular y, para algunos marcadores, la especificidad fue menor<sup>50</sup>. De tal forma que, siempre ha prevalecido el método de la RT-PCR anidada y, más recientemente, técnicas similares cuantitativas aplicando la denominada RT-PCR en tiempo real, que permite estimar el número inicial de copias del transcrito presentes en la muestra<sup>56</sup>.

A medida que se fue extendiendo la aplicación de técnicas de detección molecular, surgieron trabajos centrados en la correlación de los resultados con el estadio de la enfermedad. Si bien se han registrado hallazgos contrapuestos, las variaciones aplicadas a la técnica de RT-

PCR –aun usando la misma secuencia marcadora– dificultan la comparación de resultados. Adicionalmente, los primeros trabajos se realizaron en pocos pacientes y ninguno aportó análisis estadísticos definitivos para validar los resultados<sup>51-53</sup>.

Se introdujo también el estudio de más de un marcador para fortalecer el diagnóstico de enfermedad mínima residual en melanoma. Al respecto, Kulik y col.<sup>48</sup> no encontraron correlación estadística entre los marcadores moleculares y el estadio de la enfermedad. De todas maneras, se encontró que la frecuencia de detección positiva en los ensayos con dos marcadores fue mayor que utilizando sólo el marcador de referencia, la tirosinasa. Estos resultados abrieron algunas expectativas con respecto a la utilidad de técnicas de tipo «multimarcador» en la detección de la enfermedad mínima residual.

### Evaluación como marcadores de pronóstico

Uno de los primeros trabajos que posicionó a la tirosinasa como marcador pronóstico, fue el de Battayani y col.<sup>15</sup>, con resultados en 93 pacientes que mostraban su asociación a la progresión de la enfermedad. Por su parte, Hoon y col.<sup>14</sup> realizaron un análisis de cuatro marcadores de melanoma (tirosinasa, p97, MUC-18 y MAGE-3) sobre un total de 119 pacientes y encontraron una correlación significativa entre el número de marcadores positivos, el estadio y la progresión de la enfermedad. Sin embargo, cabe aclarar que se ha informado que los marcadores MAGE-3 y MUC-18 poseen una baja especificidad<sup>25, 57</sup>. Sarantou y col.<sup>50</sup> ampliaron el trabajo de Hoon y col.<sup>14</sup> estudiando otros marcadores (Trp-1, Trp-2, Pmel17 y MART-1/Melan-A), además de tirosinasa, y concluyeron nuevamente que la sensibilidad del ensayo aumentaba utilizando más de uno. Este resultado fue explicado por la heterogeneidad tumoral, que afectaría el nivel de expresión génica correspondiente a los distintos marcadores.

Siguiendo esta línea de ensayos con múltiples marcadores y aportando un análisis estadístico consistente, Palmieri y col.<sup>25</sup> arribaron a conclusiones diferentes respecto de Hoon y col.<sup>28</sup>. Informaron una correlación significativa con el estadio de la enfermedad sólo para el marcador tirosinasa<sup>25, 28</sup>. No pudieron demostrar la utilidad del resto de los marcadores evaluados en la progresión tumoral, ya sea individualmente o combinados entre sí. Más aún, obtuvieron resultados falsos positivos para los marcadores p97, MART-1 y MUC-18<sup>25</sup>. Esta especificidad limitada de ciertos marcadores complica la adopción de un criterio uniforme al aplicarse múltiples marcadores para la detección de células tumorales circulantes y limita la adjudicación de un significado clínico.

A este panorama complejo se suman otras variables que dificultan aún más las comparaciones de los resulta-

dos obtenidos en los distintos estudios realizados. En este sentido, pueden diferir los estadios de la enfermedad analizados en cada trabajo, el tratamiento recibido por los pacientes, la utilización de uno o más marcadores o la periodicidad de muestreo durante el seguimiento, entre otras variables. A modo de resumen, en la Tabla 2 se lista una selección de trabajos realizados sobre melanoma, en los que se incluyeron 20 pacientes o más.

Por otra parte, podrían existir otros factores que influyen en la validación de la técnica para su uso clínico. Por ejemplo, Hasselmann y col.<sup>58</sup> sugirieron que existe la posibilidad de que células tumorales apoptóticas constituyan una fuente de ARN circulante y que este ácido nucleico se encuentre protegido de las RNAsas del suero dentro de los cuerpos apoptóticos. Esta información indica que no siempre que se detecte un marcador tumoral en sangre es posible inferir que proviene de células circulantes capaces de originar metástasis.

### Optimización y estandarización de técnicas moleculares

Otro punto muy relevante que se relaciona con la dispersión de resultados que arrojan los distintos trabajos de detección molecular, es la falta de controles de calidad en las técnicas empleadas. Para investigar la consistencia de los estudios, el grupo de melanoma de la EORTC (*European Organization for Research and Treatment of Cancer*) presentó una serie de recomendaciones para los ensayos clínicos, especialmente en lo referido al control riguroso del procesamiento para RT-PCR<sup>59</sup>. Todos los pasos del manejo de la muestra hasta completarse la retrotranscripción, con la consecuente síntesis del ADN copia, parecen contribuir a la heterogeneidad de los resultados. En cambio, la amplificación por PCR se muestra como proceso robusto. Así, debe concluirse que la calidad del ARN obtenido de la muestra se convierte en un elemento clave de esta técnica.

Recientemente, completamos la optimización de un nuevo diseño de secuencias para el marcador tirosinasa utilizando *software* de última generación para el diseño de cebadores para la RT-PCR anidada<sup>45</sup>. Como resultado del diseño optimizado fue posible identificar cantidades mínimas del mensajero de tirosinasa, requiriéndose menos de 1.5 pg de ARN total de una estirpe melánica, menor al total contenido en una sola célula cancerosa humana. Incluso, la sensibilidad del nuevo diseño fue superior a la del protocolo original de Smith y col.<sup>45, 47</sup>, tomado como referencia en la mayoría de los ensayos en muestras humanas publicados hasta la fecha.

Más allá de cumplirse las recomendaciones de la EORTC sobre el procesamiento del ARN<sup>59</sup>, desarrollamos además una serie de estudios en un modelo xenogénico para valorar el desempeño *in vivo* de la téc-

TABLA 2.— Selección de trabajos destacados sobre la detección molecular en sangre en pacientes con melanoma

Referencia	Nº de Pacientes	Estadios incluidos	Marcadores moleculares estudiados <sup>A</sup>	Detección de melanoma en sangre <sup>B</sup> %	Asociación con la progresión tumoral
Hoon et al. <sup>14</sup>	119	Todos	Tyr, MAGE-3, MUC-18, p97	91	Sí
Mellado et al. <sup>16</sup>	91	Todos	Tyr	59	Sí
Kunter et al. <sup>17</sup>	64	Todos	Tyr	14	Sí
Reinhold et al. <sup>18</sup>	65	Todos	Tyr	9	No
Curry et al. <sup>19</sup>	123	I, II, III	Tyr, MART1	46	Sí
Ghossein et al. <sup>20</sup>	73	II, III, IV	Tyr	12	Sí
Curry et al. <sup>21</sup>	186	I, II, III	Tyr, MART1	68	Sí
Hanekom et al. <sup>22</sup>	143	I, II	Tyr	7	No
Mellado et al. <sup>23</sup>	57	I, II, III	Tyr	17	Sí
Schittek et al. <sup>24</sup>	225	Todos	Tyr, MART1	32	Sí
Palmieri et al. <sup>25</sup>	235	Todos	Tyr, MART1, MUC-18, p97	20	Sí
Proebstle et al. <sup>26</sup>	212	Todos	Tyr	22	Sí
Aubin et al. <sup>27</sup>	39	I, II, III	Tyr	8	No
Hoon et al. <sup>28</sup>	46	II, III, IV	Tyr, MAGE-3, MUC-18, p97	93	Sí
Schrader et al. <sup>29</sup>	31	IV	Tyr, MART1, Trp-1, Trp-2, MAGE-3	23	Sí
Osella-Abate et al. <sup>30</sup>	186	Todos	Tyr	36	Sí
Brownbridge et al. <sup>31</sup>	299	Todos	Tyr, MART1	51	No
Waldmann et al. <sup>32</sup>	20	IV	Tyr	40	No
Strohal et al. <sup>33</sup>	77	Todos	Tyr, MART1	21	No
Gogas et al. <sup>34</sup>	60	II, III	Tyr	70	Sí
Osella-Abate et al. <sup>35</sup>	155	Todos	Tyr	49	Sí
Palmieri et al. <sup>36</sup>	200	Todos	Tyr, MART1, p97	81	No
Reynolds et al. <sup>37</sup>	118	II, III, IV	Tyr, gp100, MART1, MAGE-3	47	Sí
Osella-Abate et al. <sup>38</sup>	110	III	Tyr	49	Sí
Wascher et al. <sup>39</sup>	30	III	Tyr, MART1, uMAG-A	37	Sí
Mocellin et al. <sup>40</sup>	40	II, III	Tyr, MART1	70	Sí
Voit et al. <sup>41</sup>	111	II, III	Tyr	32	Sí
Schmidt et al. <sup>42</sup>	85	IV	Tyr, MART1	39	Sí
Domingo-Domenech et al. <sup>43</sup>	106	II, III, IV	Tyr	36	Sí
Gabri et al. <sup>45</sup>	25	III, IV	Tyr	64	Sí

<sup>A</sup>Secuencias estudiadas por RT-PCR a partir de muestras de sangre periférica. <sup>B</sup>Porcentual de casos positivos para la detección de uno o varios marcadores de melanoma en circulación. Tyr: tirosinase; MAGE: melanoma-associated antigen; MUC: transmembrane glycoprotein tumor antigen; MART: melanoma-associated antigen recognized by T-cells; Trp: tirosinase-related protein; uMAG-A: universal melanoma antigen gene-A.

nica en la detección del melanoma<sup>45</sup>. Fue posible detectar expresión de tirosinasa en la sangre de ratones atímicos portadores de tumores subcutáneos inducidos con células SKmel de melanoma humano, y esta expresión aumentó luego de la manipulación de los tumores. También informamos por primera vez la cinética del marcador luego de que las células cancerosas acceden al torrente circulatorio. Se comprobó que la expresión decae 6 horas después de la inyección endovenosa de células SKmel, sugiriendo que ese sería el lapso durante el cual las células de melanoma se mantienen viables en la circulación<sup>45</sup>.

## Metaanálisis

En un intento por unificar la experiencia ganada en los trabajos de detección molecular de diferentes grupos y conseguir, a su vez, un análisis con mayor poder estadístico que involucre a un gran caudal de pacientes con melanoma, se han conducido estudios de metaanálisis. El metaanálisis se basa en integrar de manera estructurada y sistemática los datos obtenidos previamente en varios estudios clínicos similares. Tsao y col.<sup>60</sup> realizaron un análisis de 23 trabajos que incluyó un total de 1799 pacientes, determinando que existe una falla en identifi-

car a más de la mitad de los pacientes con enfermedad metastásica conocida, lo cual sugiere limitaciones para su uso en el ámbito clínico.

Por su parte, Quagliano y col.<sup>61</sup> encontraron que la mayoría de los trabajos analizados coincide en que la determinación basal de tirosinasa, tomada antes del inicio del tratamiento, no estaría relacionada con el curso clínico de la enfermedad. Con respecto a la sensibilidad del sistema de detección, encontraron que la misma fue menor cuando se asoció con un período de seguimiento corto. También observaron una mayor sensibilidad en los trabajos en los que se realizó un mayor número de determinaciones por paciente y que todos los pacientes estudiados con dos muestras consecutivas positivas desarrollaron progresión visceral de la enfermedad.

Mocellin y col.<sup>62</sup> realizaron un importante estudio de metaanálisis sobre 53 publicaciones que incluyeron un total de 5433 pacientes. Los resultados conseguidos con este trabajo avalaron la hipótesis de que la identificación de marcadores de células tumorales circulantes podría implicar un parámetro pronóstico útil para el seguimiento clínico de los pacientes con melanoma. Más aún, el metaanálisis del conjunto de datos confirmó que la detección molecular de células de melanoma en sangre representa un riesgo significativo, tanto para la sobrevida libre de enfermedad como para la sobrevida global.

Se ha postulado que la especificidad de la técnica de detección podría estar relacionada al estadio de la enfermedad, puesto que dos de los trabajos que informaron una alta especificidad incluyeron sólo pacientes con melanoma en estadio III<sup>20,36</sup>. Considerando esto, el ARN de tirosinasa sería un marcador potencialmente útil, al menos en pacientes en estadio III libres de enfermedad, si se realizan determinaciones periódicas cada 2 o 3 meses durante el seguimiento clínico.

### **Detección molecular en otras variantes de tumores sólidos**

Luego del trabajo pionero de detección de enfermedad mínima residual en pacientes con melanoma, se intentaron estrategias similares en diferentes tipos de tumores sólidos. En el trabajo de Corradini y col.<sup>63</sup> se estudió un panel de posibles marcadores para la detección de enfermedad mínima residual en pacientes con cáncer de mama, observándose que las secuencias de mspina y mamaglobina ofrecen una sensibilidad y especificidad apropiada, aunque los autores concuerdan en que se requiere evidencia clínica para determinar la utilidad de estos marcadores en relación al pronóstico y el seguimiento del tratamiento. Por su parte, Soria y col.<sup>64</sup> notificaron la detección del transcrito correspondiente a la enzima telomerasa en muestras de pacientes con esta misma enfermedad. Para ello utilizaron dos métodos di-

ferentes que combinan las técnicas de PCR y ELISA, no encontrando la presencia del marcador en las muestras de voluntarios sanos.

En otros trabajos fue posible detectar secuencias del antígeno carcinoembrionario en muestras de sangre, médula ósea y ganglios linfáticos de pacientes con carcinoma mamario<sup>65,66</sup>. Si bien no se informaron resultados positivos en lesiones benignas, se acepta que dicho marcador es inespecífico. De hecho, se conoce su presencia en muestras de pacientes con carcinoma gástrico, colorrectal y pancreático<sup>65-70</sup> y otros investigadores lo encontraron en la médula ósea y ganglios linfáticos de individuos sanos<sup>71,72</sup>. En el estudio de Wu y col.<sup>67</sup>, se evaluó la expresión de telomerasa en la detección de enfermedad mínima residual en pacientes con carcinoma gástrico, pero no se encontró una correlación significativa entre su presencia y los parámetros clínicos de la enfermedad. En cambio, la secuencia del antígeno carcinoembrionario se asoció en este trabajo a un riesgo significativamente mayor de progresión cuando fue encontrada en las células circulantes<sup>67</sup>.

Por otra parte, varios grupos han detectado células tumorales circulantes en la sangre periférica de pacientes con cáncer de próstata –tanto localizado como metastático– usando la técnica de RT-PCR aplicada al ARN mensajero del antígeno específico prostático<sup>73-75</sup>. Desafortunadamente, una proporción significativa de pacientes con enfermedad metastásica fue negativa para la presencia de este marcador.

La detección de marcadores en sangre periférica mediante la técnica de RT-PCR fue realizada en otros tipos de tumores sólidos epiteliales. Así, fue posible detectar la secuencia de  $\alpha$ -fetoproteína en pacientes con carcinoma hepatocelular<sup>76-78</sup>, aunque este hallazgo posee un valor limitado puesto que también se ha encontrado este marcador en pacientes con enfermedades hepáticas no neoplásicas, como cirrosis y hepatitis crónica<sup>77,79</sup>. El uso de la secuencia de albúmina rindió resultados aún menos específicos que  $\alpha$ -fetoproteína, estando presente en la gran mayoría de los voluntarios sanos<sup>77,80</sup>. Se postuló que la presencia del transcrito de la telomerasa podría ser un marcador útil para la detección temprana de progresión del hepatocarcinoma, habiéndose encontrado más tarde resultados alentadores al respecto<sup>81,82</sup>. Para el caso del cáncer de cuello uterino, ha sido posible hallar la presencia del ARN mensajero del antígeno de carcinoma de células escamosas y del transcrito correspondiente al gen de la oncoproteína E6 del papilomavirus humano 16<sup>83,84</sup>.

Las secuencias marcadoras de tiroglobulina y peroxidasa tiroidea han sido evidenciadas en muestras de carcinoma tiroideo y nódulos tiroideos benignos, sin detectarse en la mayoría de las muestras de individuos sanos. Incluso, se ha encontrado una correlación significativa entre su presencia en sangre periférica y el diag-

nóstico de carcinoma tiroideo. Resta, sin embargo, evaluar el significado pronóstico de esta determinación molecular<sup>85</sup>.

Con respecto a tumores sólidos no epiteliales, se ha ensayado la detección molecular de células tumorales circulantes en pacientes pediátricos con neuroblastoma. Ha sido posible detectar el ARN mensajero de la enzima tirosina hidroxilasa en sangre periférica y médula ósea, tanto en pacientes con enfermedad confinada al órgano como con metástasis linfáticas<sup>86</sup>. También pudo evidenciarse la presencia de secuencias del antígeno GAGE en el 50% de las muestras de sangre periférica de pacientes con neuroblastoma diseminado, aunque el significado clínico de estos resultados es todavía incierto<sup>87</sup>. Adicionalmente, se han detectado falsos positivos en sangre de controles utilizando dicho marcador<sup>88</sup>. Otra secuencia de mucho interés en neuroblastoma es el transcrito de la enzima gangliósido GD2 sintasa. La misma mostró una alta especificidad, no siendo detectada en muestras normales de médula ósea y sangre. Sin embargo, se expresaría en otros tipos de cáncer, como osteosarcoma, melanoma, retinoblastoma y algunos tumores de cerebro<sup>89, 90</sup>.

### Perspectivas en detección molecular

La detección molecular de enfermedad mínima residual implica el uso de marcadores pronósticos, específicos para cada tipo de cáncer. La utilización de dichos marcadores requiere la aplicación de una técnica optimizada, altamente sensible y específica. Los resultados falsos negativos se encuentran estrechamente ligados a la sensibilidad del sistema, aunque también pueden deberse a la liberación intermitente de células tumorales circulantes hacia la sangre y a la inestabilidad genética de las células malignas. En estas situaciones, la imposibilidad de detectar la presencia de enfermedad mínima residual no permitiría conocer el mayor riesgo de progresión. Si bien en la actualidad no existe una gran variedad de alternativas terapéuticas para el melanoma avanzado, con un resultado falso negativo igualmente se perdería un signo de alerta para prever la progresión.

Una manera de lidiar con las limitaciones en la sensibilidad, es realizar un seguimiento periódico, obteniendo varias muestras de cada paciente. Con respecto al estudio de múltiples marcadores, hay que tener especial cuidado puesto que distintos trabajos en pacientes con melanoma informaron una muy baja especificidad para algunas secuencias. Al respecto, la tirosinasa se muestra como el más robusto para ser utilizado como único marcador, atendiendo a los datos de sensibilidad y especificidad obtenidos en varios estudios.

La consistencia de las técnicas de detección molecular parece ser un factor central para establecer el valor pro-

nóstico de las distintas secuencias marcadoras en la enfermedad mínima residual. Deberían adoptarse como rutina protocolos estandarizados, previamente optimizados y validados mediante estudios *in vitro* sobre líneas celulares de referencia<sup>59</sup>. Además, deberían incluirse controles estrictos en cada muestra procesada, como el de integridad del ARN a través de genes testigo de expresión constitutiva (como la actina o la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), para arrojar resultados confiables y comparables entre los distintos ensayos<sup>45, 47</sup>. Al respecto, estas variables no pueden ser aseguradas simplemente bajo la forma de un *kit* comercial, sino que dependen de las buenas prácticas de cada laboratorio, aun cuando la metodología ya se encuentre validada en la literatura.

La experiencia acumulada en la detección de melanoma residual seguramente será de gran utilidad para evitar inconsistencias en el desarrollo de sistemas de detección de células cancerosas circulantes en otros tipos de tumores sólidos prevalentes. El cáncer residual parece ser el objetivo de nuevas terapias con compuestos más selectivos y vacunas oncológicas, apuntando a pacientes portadores de enfermedad localmente avanzada al diagnóstico y con alto riesgo de recurrencia<sup>91</sup>. En este contexto, la detección molecular mediante RT-PCR ha arrojado el mejor desempeño como marcador de pronóstico en el mismo perfil de pacientes. Es probable que pueda ser de utilidad como marcador de recurrencia e incluso como marcador predictivo, ayudando a establecer la probabilidad de respuesta al tratamiento<sup>92</sup>. Por otra parte, la misma técnica de RT-PCR ha comenzado a adaptarse para detectar células cancerosas en otras muestras o fluidos del paciente —además de la sangre— como es el caso del ganglio centinela<sup>93</sup>.

Aunque la información disponible en melanoma es interesante, de todas formas resta mucha investigación clínica prospectiva para definir las secuencias marcadoras más apropiadas para distintos tipos tumorales, considerando el estadio de la enfermedad y los resultados del tratamiento.

**Agradecimientos:** Valeria Vázquez es Becaria en el marco del convenio I+D entre Universidad Nacional de Quilmes y Laboratorio ELEA SACIFyA, Laura Otero es Becaria de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PID 0343/03) y Viviana Laurent es Becaria *St. Baldricks* de la Fundación Flexer. Mariano Gabri, Daniel Gomez y Daniel Alonso son miembros de la Carrera del Investigador Científico del CONICET.

### Bibliografía

1. Mocellin S, Keilholz U, Rossi CO, Nitti D. Circulating tumor cells: the 'leukemic phase' of solid cancers. *Trends Mol Med* 2006; 12: 130-9.
2. 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: 2609-15.

- 3.. Lacroix J and Doeberitz MK. Technical aspects of minimal residual disease detection in carcinoma patients. *Semin Surg Oncol* 2001; 20: 252-64.
- 4.. Pantel K and Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 448-56.
5. National Cancer Institute. U.S. National Institutes of Health. Tumor Markers: Questions and answers. En: <http://www.cancer.gov>; consultado el 22/08/2007.
6. Carter HB. Prostate cancers in men with low PSA levels - Must we find them? *N Engl J Med* 2004; 350: 292-4.
7. Bergthorsson JT, Ejlersen B, Olsen JH, et al. BRCA1 and BRCA2 mutation status and cancer family history of Danish women affected with multifocal or bilateral breast cancer at a young age. *J Med Genet* 2001; 38: 361-8.
8. Zhu W, Michael CW. WT1, monoclonal CEA, TTF1, and CA125 antibodies in the differential diagnosis of lung, breast, and ovarian adenocarcinomas in serous effusions. *Diagn Cytopathol* 2007; 35: 370-5.
9. Ferrone CR, Finkelstein DM, Thayer SP, Muzikansky A, Fernandez-del Castillo C, Warshaw L. Perioperative CA19-9 levels can predict stage and survival in patients with resectable pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 2897-902.
10. Bataille R, Pellat-Deceunynck C, Robillard N, Avet-Loiseau H, Harousseau JL, Moreau P. CD117 (c-kit) is aberrantly expressed in a subset of MGUS and multiple myeloma with unexpectedly good prognosis. *Leuk Res* 2008; 32: 379-82.
11. Duffy MJ. Predictive markers in breast and other cancers: a review. *Clin Chem* 2005; 51: 494-503.
12. Locker GY, Hamilton S, Harris J, et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5313-27.
13. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 453-8.
14. Hoon DS, Wang Y, Dale PS, et al. Detection of occult melanoma cells in blood with a multiple-marker polymerase chain reaction assay. *J Clin Oncol* 1995; 13: 2109-16.
15. Battayani Z, Grob JJ, Xerri L, et al. Polymerase chain reaction detection of circulating melanocytes as a prognostic marker in patients with melanoma. *Arch Dermatol* 1995; 131: 443-7.
16. Mellado B, Colomer D, Castel, et al. Detection of circulating neoplastic cells by reverse-transcriptase polymerase chain reaction in malignant melanoma: association with clinical stage and prognosis. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2091-7.
17. Kunter U, Buer J, Probst M, et al. Peripheral blood tyrosinase messenger RNA detection and survival in malignant melanoma *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 590-4.
18. Reinhold U, Lüdtker-Handjery HC, Schnautz S, Kreysel HW, Abken H. The analysis of tyrosinase-specific mRNA in blood samples of melanoma patients by RT-PCR is not a useful test for metastatic tumor progression. *J Invest Dermatol* 1997; 108: 166-9.
19. Curry BJ, Myers K, Hersey P. Polymerase chain reaction detection of melanoma cells in the circulation: relation to clinical stage, surgical treatment, and recurrence from melanoma. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1760-9.
20. Ghossein RA, Coit D, Brennan M, et al. Prognostic significance of peripheral blood and bone marrow tyrosinase messenger RNA in malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 419-28.
21. Curry BJ, Myers K, Hersey P. MART-1 is expressed less frequently on circulating melanoma cells in patients who develop distant compared with locoregional metastases. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2562-71.
22. Hanekom GS, Stubbings HM, Johnson CA, Kidson SH. The detection of circulating melanoma cells correlates with tumour thickness and ulceration but is not predictive of metastasis for patients with primary melanoma. *Melanoma Res* 1999; 9: 465-73.
23. Mellado B, Gutierrez L, Castel T, et al. Prognostic significance of the detection of circulating malignant cells by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in long-term clinically disease-free melanoma patients. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1843-8.
24. Schittek B, Bodingbauer Y, Ellwanger U, Blaheta HJ, Garbe C. Amplification of MelanA messenger RNA in addition to tyrosinase increases sensitivity of melanoma cell detection in peripheral blood and is associated with the clinical stage and prognosis of malignant melanoma. *Br J Dermatol* 1999; 141: 30-6.
25. Palmieri G, Strazzullo M, Ascierto PA, Satriano SM, Daponte A, Castello G. Polymerase chain reaction-based detection of circulating melanoma cells as an effective marker of tumor progression. *J Clin Oncol* 1999; 17: 304-11.
26. Proebstle TM, Jiang W, Hogel J, Keilholz U, Weber L, Voit C. Correlation of positive RT-PCR for tyrosinase in peripheral blood of malignant melanoma patients with clinical stage, survival and other risk factors. *Br J Cancer* 2000; 82: 118-23.
27. Aubin F, Chtourou M, Teyssier JR, et al. The detection of tyrosinase mRNA in the peripheral blood of stage I melanoma patients is not of clinical relevance in predicting metastasis risk and survival. *Melanoma Res* 2000; 10: 113-8.
28. Hoon DS, Bostick P, Kuo C, et al. Molecular markers in blood as surrogate prognostic indicators of melanoma recurrence. *Cancer Res* 2000; 60: 2253-7.
29. Schrader AJ, Probst-Kepper M, Grosse J, et al. Molecular and prognostic classification of advanced melanoma: a multi-marker microcontamination assay of peripheral blood stem cells. *Melanoma Res* 2000; 10: 355-62.
30. Osella Abate S, Savoia P, Cambieri I, Salomone B, Quaglino P, Bernengo MG. Role of RT-PCR tyrosinase detection in the monitoring of patients with advanced metastatic melanoma. *Melanoma Res* 2000; 10: 545-55.
31. Brownbridge GG, Gold J, Edward M, Mackie RM. Evaluation of the use of tyrosinase-specific and melanA/MART-1-specific reverse transcriptase-coupled-polymerase chain reaction to detect melanoma cells in peripheral blood samples from 299 patients with malignant melanoma. *Br J Dermatol* 2001; 144: 279-87.
32. Waldmann V, Wacker J, Deichmann M, Jackel A, Bock M, Naher H. Prognosis of metastatic melanoma: no correlation of tyrosinase mRNA in bone marrow and survival time. *Recent Results Cancer Res* 2001; 158: 118-25.
33. Strohal R, Mosser R, Kittler H. MART-1/Melan-A and tyrosinase transcripts in peripheral blood of melanoma patients: PCR analyses and follow-up testing in relation to clinical stage and disease progression. *Melanoma Res* 2001; 11: 543-8.
34. Gogas H, Kefala G, Bafaloukos D, et al. Prognostic significance of the sequential detection of circulating melanoma cells by RT-PCR in high-risk melanoma patients receiving adjuvant interferon. *Br J Cancer* 2002; 87: 181-6.
35. Osella-Abate S, Quaglino P, Savoia P, Leporati C, Comessatti A, Bernengo MG. VEGF-165 serum levels and tyrosinase expression in melanoma patients:



- correlation with the clinical course. *Melanoma Res* 2002; 12: 325-34.
36. Palmieri G, Ascierto PA, Perrone F, et al. Prognostic value of circulating melanoma cells detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 2003; 21: 767-73.
  37. Reynolds SR, Albrecht J, Shapiro RL, et al. Changes in the presence of multiple markers of circulating melanoma cells correlate with clinical outcome in patients with melanoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1497-502.
  38. Osella-Abate S, Savoia P, Quaglino P, et al. Tyrosinase expression in the peripheral blood of stage III melanoma patients is associated with a poor prognosis: a clinical follow-up study of 110 patients. *Br J Cancer* 2003; 89: 1457-62.
  39. Wascher RA, Morton DL, Kuo C, et al. Molecular tumor markers in the blood: early prediction of disease outcome in melanoma patients treated with a melanoma vaccine. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2558-63.
  40. Mocellin S, Del Fiore P, Guarnieri L, et al. Molecular detection of circulating tumor cells is an independent prognostic factor in patients with high-risk cutaneous melanoma. *Int J Cancer* 2004; 111: 741-5.
  41. Voit C, Kron M, Rademaker J, et al. Molecular staging in stage II and III melanoma patients and its effect on long-term survival. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1218-27.
  42. Schmidt H, Sorensen BS, Fode K, Nexø E, von der Maase H. Tyrosinase messenger RNA in peripheral blood is related to poor survival in patients with metastatic melanoma following interleukin-2-based immunotherapy. *Melanoma Res* 2005; 15: 409-16.
  43. Domingo-Domenech J, Molina R, Castel T, et al. Serum protein s-100 predicts clinical outcome in patients with melanoma treated with adjuvant interferon-comparison with tyrosinase rt-PCR. *Oncology* 2005; 68: 341-9.
  44. Quaglino P, Osella-Abate S, Cappello N, et al. Prognostic relevance of baseline and sequential peripheral blood tyrosinase expression in 200 consecutive advanced metastatic melanoma patients. *Melanoma Res* 2006; 17: 75-82.
  45. Gabri MG, Vázquez V, Girón S, et al. Molecular detection of circulating tyrosinase mRNA: optimization in a preclinical xenograft mouse melanoma model and further evaluation in samples from advanced melanoma patients. *Int J Mol Med* 2008; 21: 555-9.
  46. Gupta PB, Kuperwasser C, Brunet JP, et al. The melanocyte differentiation program predisposes to metastasis after neoplastic transformation. *Nat Genet* 2005; 37: 1047-54.
  47. Smith B, Selby P, Southgate J, Pittman K, Bradley C, Blair GE. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet* 1991; 338: 1227-9.
  48. Kulik J, Nowecki ZI, Rutkowski P, et al. Kulik Detection of circulating melanoma cells in peripheral blood by a two-marker RT-PCR assay. *Melanoma Res* 2001; 11: 65-73.
  49. Kaufmann O, Koch S, Burghardt J, Audring H, Dietel M. Tyrosinase, melan-A, and KBA62 as markers for the immunohistochemical identification of metastatic amelanotic melanomas on paraffin sections. *Mod Pathol* 1998; 11: 740-6.
  50. Sarantou T, Chi DDJ, Garrison DA, et al. Melanoma-associated antigens as messenger RNA detection markers for melanoma. *Cancer Res* 1997; 57: 1371-6.
  51. Brossart P, Keilholz U, Willhauck M, Scheibenbogen C, Möhler T, Hunstein W. Hematogenous spread of malignant melanoma cells in different stages of disease. *J Invest Dermatol* 1993; 101: 887-9.
  52. Pittman K, Burchill S, Smith B, et al. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction for expression of tyrosinase to identify malignant melanoma cells in peripheral blood. *Ann Oncol* 1996; 7: 297-301.
  53. Stevens GL, Scheer WD, Levine EA. Detection of tyrosinase mRNA from the blood of melanoma patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5: 293-6.
  54. Mellado B, Del Carmen Vela M, Colomer D, et al. Tyrosinase mRNA in blood of patients with melanoma treated with adjuvant interferon. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4032-9.
  55. Szenajch J, Jasinski B, Synowiec A, et al. Prognostic value of multiple reverse transcription-PCR tyrosinase testing for circulating neoplastic cells in malignant melanoma. *Clin Chem* 2003; 49: 1450-7.
  56. Koyanagi K, Kuo C, Nakagawa T, et al. Multimarker quantitative real-time PCR detection of circulating melanoma cells in peripheral blood: relation to disease stage in melanoma patients. *Clin Chem* 2005; 51: 981-8.
  57. Gaugler B, Van den Eynde B, van der Bruggen P, et al. Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 1994; 179: 921-30.
  58. Hasselmann DO, Rappl G, Tilgen W, Reinhold U. Extracellular tyrosinase mRNA within apoptotic bodies is protected from degradation in human serum. *Clin Chem* 2001; 47: 1488-9.
  59. Lehmann F, Lacombe D, Therasse P, Eggermont AM. Integration of Translational Research in the European Organization for Research and Treatment of Cancer Research (EORTC) Clinical Trial Cooperative Group Mechanisms. *J Transl Med* 2003; 1: 2-5.
  60. Tsao H, Nadiminti U, Sober AJ, Bigby M. A meta-analysis of reverse transcriptase-polymerase chain reaction for tyrosinase mRNA as a marker for circulating tumor cells in cutaneous melanoma. *Arch Dermatol* 2001; 137: 325-30.
  61. Quaglino P, Savoia P, Fierro MT, Osella-Abate S, Bernengo MG. Clinical significance of sequential tyrosinase expression in the peripheral blood of disease-free melanoma patients: a review of literature data. *Melanoma Res* 2004; 14: S17-9.
  62. Mocellin S, Hoon D, Ambrosi A, Nitti D, Rossi CR. The prognostic value of circulating tumor cells in patients with melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 4605-13.
  63. Corradini P, Voena C, Astoffi M, et al. Maspin and mammaglobin genes are specific markers for RT-PCR detection of minimal residual disease in patients with breast cancer. *Ann Oncol* 2001; 12: 1693-8.
  64. Soria JC, Gauthier LR, Raymond E, et al. Molecular detection of telomerase-positive circulating epithelial cells in metastatic breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 971-5.
  65. Gerhard M, Juhl H, Kalthoff H, Schreiber HW, Wagener C, Neumaier M. Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 1994; 12: 725-9.
  66. Mori M, Mimori K, Ueo H, et al. Clinical significance of molecular detection of carcinoma cells in lymph nodes and peripheral blood by reverse transcription-polymerase chain reaction in patients with gastrointestinal or breast carcinomas. *J Clin Oncol* 1998; 16: 128-32.
  67. Wu CH, Lin SR, Hsieh JS, et al. Molecular detection of disseminated tumor cells in the peripheral blood of patients with gastric cancer: evaluation of their prognostic significance. *Dis Markers* 2006; 22:103-9.
  68. Funaki NO, Tanaka J, Kasamatsu T, et al. Identification

- of carcinoembryonic antigen mRNA in circulating peripheral blood of pancreatic carcinoma and gastric carcinoma patients. *Life Sci* 1996; 59: 2187-99.
69. Mori M, Mimori K, Ueo H et al. Molecular detection of circulating solid carcinoma cells in the peripheral blood: the concept of early systemic disease. *Int J Cancer* 1996; 68: 739-43.
  70. Liefers GJ, Cleton-Jansen AM, van de Velde CJ, et al. Micrometastases and survival in stage II colorectal cancer. *N Engl J Med* 1998; 339: 223-8.
  71. Bostick PJ, Hoon DS, Cote RJ. Detection of carcinoembryonic antigen messenger RNA in lymph nodes from patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 1998; 339: 1643-4.
  72. Zippelius A, Kufer P, Honold G, et al. Limitations of reverse-transcriptase polymerase chain reaction analyses for detection of micrometastatic epithelial cancer cells in bone marrow. *J Clin Oncol* 1997; 15: 2701-8.
  73. Ghossein RA, Scher HI, Gerald WL, et al. Detection of circulating tumor cells in patients with localized and metastatic prostatic carcinoma: clinical implications. *J Clin Oncol* 1995; 13: 1195-200.
  74. Israeli RS, Miller WH Jr, Su SL, et al. Sensitive nested reverse transcription polymerase chain reaction detection of circulating prostatic tumor cells: comparison of prostate-specific membrane antigen and prostate-specific antigen-based assays. *Cancer Res* 1994; 54: 6306-10.
  75. Katz AE, Olsson CA, Raffo AJ, et al. Molecular staging of prostate cancer with the use of an enhanced reverse transcriptase-PCR assay. *Urology* 1994; 43: 765-75.
  76. Komeda T, Fukuda Y, Sando T, et al. Sensitive detection of circulating hepatocellular carcinoma cells in peripheral venous blood. *Cancer* 1995; 75: 2214-9.
  77. Matsumura M, Niwa Y, Kato N, et al. Detection of alpha-fetoprotein mRNA, an indicator of hematogenous spreading hepatocellular carcinoma, in the circulation: a possible predictor of metastatic hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1994; 20: 1418-25.
  78. Kar S, Carr BI. Detection of liver cells in peripheral blood of patients with advanced-stage hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1995; 21: 403-7.
  79. Lemoine A, Le Bricon T, Salvucci M, et al. Prospective evaluation of circulating hepatocytes by alpha-fetoprotein mRNA in humans during liver surgery. *Ann Surg* 1997; 226: 43-50.
  80. Müller C, Petermann D, Pfeffel F, Oesterreicher C, Függer R. Lack of specificity of albumin-mRNA-positive cells as a marker of circulating hepatoma cells. *Hepatology* 1997; 25: 896-9.
  81. Cottliar ASH and Slavutsky IR. Telómeros y actividad de telomerasa: su participación en el envejecimiento y el desarrollo neoplásico. *Medicina (Buenos Aires)* 2001; 60: 335-42.
  82. Oya H, Sato Y, Yamamoto S, et al. Comparison between human-telomerase reverse transcriptase mRNA and alpha-fetoprotein mRNA as a predictive value for recurrence of hepatocellular carcinoma in living donor liver transplantation. *Transplant Proc* 2006; 38: 3636-9.
  83. Stenman J, Lintula S, Hotakainen K, Vartiainen J, Lehvälaiho H, Stenman UH. Detection of squamous-cell carcinoma antigen-expressing tumour cells in blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in cancer of the uterine cervix. *Int J Cancer* 1997; 74: 75-80.
  84. Pao CC, Hor JJ, Yang FP, Lin CY, Tseng CJ. Detection of human papillomavirus mRNA and cervical cancer cells in peripheral blood of cervical cancer patients with metastasis. *J Clin Oncol* 1997; 15: 1008-12.
  85. Tallini G, Ghossein RA, Emanuel J, et al. Detection of thyroglobulin, thyroid peroxidase, and RET/PTC1 mRNA transcripts in the peripheral blood of patients with thyroid disease. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1158-66.
  86. Miyajima Y, Kato K, Numata S, Kudo K, Horibe K. Detection of neuroblastoma cells in bone marrow and peripheral blood at diagnosis by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction for tyrosine hydroxylase mRNA. *Cancer* 1995; 75: 2757-61.
  87. Cheung IY and Cheung NK. Molecular detection of GAGE expression in peripheral blood and bone marrow: utility as a tumor marker for neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 821-6.
  88. Oltra S, Martínez F, Orellana C, et al. Minimal residual disease in neuroblastoma: to GAGE or not to GAGE. *Oncol Res* 2004; 14: 291-5.
  89. Lo Piccolo MS, Cheung NK, Cheung IY. GD2 synthase: a new molecular marker for detecting neuroblastoma. *Cancer* 2001; 92: 924-31.
  90. Hoon DS, Kuo CT, Wen S, et al. Ganglioside GM2/GD2 synthetase mRNA is a marker for detection of infrequent neuroblastoma cells in bone marrow. *Am J Pathol* 2001; 159: 493-500.
  91. Fernandez LE, Alonso DF, Gomez DE, Vazquez AM. Ganglioside-based vaccines and anti-idiotypic antibodies for active immunotherapy against cancer. *Expert Rev Vaccines* 2003; 2: 817-23.
  92. Sleijfer S, Gratama JW, Sieuwerts AM, Kraan J, Martens JW, Foekens JA. Circulating tumour cell detection on its way to routine diagnostic implementation? *Eur J Cancer* 2007; 43: 2645-50.
  93. Temple CL, Snell LJ, Power SM, et al. Clinical significance of the RT-PCR positive sentinel node in melanoma. *J Surg Oncol* 2007; 95: 546-54.