

Evidencia citogenética de células tumorales circulantes en sangre periférica de mujeres venezolanas con cáncer de mama

Jenny Cañizalez, Alicia Rojas-Atencio*, Karelis Urdaneta,
Marisol Soto, Raquel Atencio, Francisco Álvarez y Richard González

Instituto de Investigaciones Genéticas, Facultad de Medicina,
Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

Recibido: 08-05-12 Aceptado: 01-04-13

Resumen

La identificación de factores pronósticos en pacientes con cáncer de mama ha sido uno de los grandes retos del siglo pasado. Los mayores logros corresponden al conocimiento de la propiedad que tienen las células malignas de viajar a través de sangre periférica (SP) cuando este se torna invasivo. Por otro lado, las células cancerosas han mostrado casi en su totalidad la presencia de anomalías cromosómicas. El objetivo fue identificar células malignas circulantes en SP, provenientes de cáncer de mama invasivo e *in situ*, utilizando técnicas citogenéticas. Se analizaron 60 muestras de sangre periférica y de tejido tumoral mamario, reportados histológicamente como carcinoma invasivo o *in situ*, mediante técnicas citogenéticas. Se detectaron anomalías cromosómicas en el 86,66% de las muestras de cáncer (Ca) invasivo y 73,33% en Ca *in situ*; de éstas, 76,66% y 80% de los cánceres invasivos e *in situ* respectivamente resultaron coincidentes con las anomalías encontradas en el tejido tumoral, sugiriendo que las técnicas citogenéticas pudieran ser usadas como una herramienta adicional para el diagnóstico de cáncer invasivo, sobre todo cuando estamos en presencia de un probable carcinoma *in situ* en el cual pudieran estar ocurriendo micrometástasis, lo que modificaría el pronóstico y la escogencia del tratamiento adecuado.

Palabras clave: células tumorales circulantes, citogenética, cáncer de mama.

Cytogenetic evidence of circulating tumor cells in peripheral blood of Venezuelan women with breast cancer

Abstract

The identification of prognostic factors in patients with breast cancer has been one of the great challenges of the last century. One of the greatest achievement has been the knowledge of the property that malignant cells have to travel through peripheral blood (PB) when the tumor becomes invasive. On the other hand, almost all cancer cells have shown the presence of chromosomal abnormalities. The objective was to identify malignant cells circulating in PB, from invasive

Autor para la correspondencia: arojasa26@gmail.com

and in situ breast cancer, using cytogenetic techniques. Sixty samples of peripheral blood and tumor tissue from breast carcinoma, reported histologically as invasive or in situ by cytogenetic techniques, were analyzed. Chromosomal abnormalities were detected in 86.66% of the samples of invasive cancer (ca) and 73.33% of in situ ca, of these 76.66% and 80% of invasive and in situ cancers were respectively coincident with the anomalies found in tumor tissue, suggesting that cytogenetic techniques could be used as an additional tool for diagnosis of invasive cancer, especially when we are dealing with a probable carcinoma in situ, in which micrometastases might be occurring. This would alter the prognosis and the choosing of the appropriate treatment.

Keywords: circulating tumors cells, cytogenetic, breast cancer.

Introducción

El cáncer femenino de mama representa la segunda causa de mortalidad, después del cáncer cérvico-uterino en mujeres latinoamericanas (1) y la primera en mujeres en el mundo (2). Muchos avances se han hecho en cuanto a la identificación de factores pronósticos que permitan abordar de una manera rápida y segura el manejo del paciente con cáncer de mama (3-4). La identificación de anomalías cromosómicas en tejido tumoral mamario, ha progresado en la última década a tal punto que se han establecido grupos pronósticos dependiendo del tipo de anomalía encontrada y se han hecho señalamientos sobre los tipos de alteraciones relacionados con inicio o progresión tumoral (5-6). Se sabe que las células tumorales viajan a través del torrente circulatorio para originar metástasis a distancia, pudiendo ser identificadas en médula ósea, ganglios linfáticos y más recientemente en sangre periférica (7). La metástasis es la mayor causa de muerte relacionada con el cáncer en pacientes con malignidades epiteliales sólidas, tal como carcinomas de mama, próstata y colorrectal (8). El paso de células tumorales provenientes de un tumor principal o primario hacia el torrente circulatorio pueden ser considerados como un paso o etapa inicial en la cascada de la metástasis que lleva eventualmente a la manifestación clínica de ésta (9).

Los modelos de metástasis indican que las células tumorales se extienden desde los tumores primarios vía la circulación (sangre y vasos linfáticos) a otros órganos, y por in-

vasión local hacia el hígado y hacia los órganos vecinos. Por tanto, parece ser que existe una muy fuerte asociación entre la aparición de células tumorales en la sangre y el desarrollo de metástasis (10). La identificación de micrometástasis en sangre periférica es una herramienta que se está comenzando a utilizar con este fin. Anormalidades citogenéticas en linfocitos de sangre periférica de pacientes con este tipo de cáncer han sido reportadas, tales como: cromosomas diminutos y condensación prematura del cromosoma (11-12). El objetivo de este trabajo fue, identificar las alteraciones cromosómicas en sangre periférica y tejido tumoral de pacientes referidos al Instituto de Investigaciones Genéticas de la Universidad del Zulia (LUZ), de los hospitales públicos y privados de la región, con diagnóstico de carcinoma mamario para establecer la relación con la presencia células tumorales circulantes en sangre periférica.

Materiales y métodos

Se recibieron en el instituto de Investigaciones Genéticas de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia, 60 muestras de tejido tumoral y sangre periférica, tomadas conjuntamente, de pacientes referidos por el oncólogo con diagnóstico de cáncer de mama *in situ* e invasivo, referidos de los hospitales públicos y privados de la región, para ser analizados desde el punto de vista citogenético, 30 de las cuales correspondieron a Ca *in situ* y 30 a Ca invasivo. Se realizaron técnicas de cultivo corto, para sangre

periférica y tejido tumoral (13, 14), y la colocación con bandas G mediante la utilización del colorante de Wright, (15). Se consideró como célula tumoral circulante aquella que presentara cariotipo anormal. Los cariotipos fueron analizados mediante la utilización del programa computarizado Leica Chantal y los mismos fueron descritos de acuerdo a la versión referida en el ISCN de 2.005 (16). Los datos fueron analizados estadísticamente mediante la utilización de la prueba de χ^2 .

Resultados

Las edades de las pacientes estuvieron comprendidas entre 23 y 86 años, con un promedio de 47,4 y 57,3 años en invasivo e *in situ* respectivamente. Se analizaron al menos 20 metafases en los casos de tejidos y entre 50 y 100 metafases en los casos de sangre periférica. En Ca invasivo, se encontró que el 86,66% de los pacientes presentaron anomalías cromosómicas en el tejido tumoral y de ellas, el 73,33% presentó anomalías cromosómicas en sangre periférica. Al compararlas con las encontradas en el tejido tumoral se encontró que en el 86,36% de los casos eran coincidentes con las encontradas en el tejido tumoral ($p > 0.01$) (tabla 1). Por otro lado, cuando se analizaron las muestras de Ca *in situ*, el 76,66% de los casos presentaron anomalías cromosómicas en el tejido tumoral y 33,33% en sangre periférica. Cuando se compararon las anomalías cromosómicas presentes en sangre periférica con las encontradas en el tejido tumoral, el 80% resultaron coincidentes ($p > 0.01$) (tabla 2).

Discusión

Básicamente todas las decisiones acerca del tratamiento del cáncer de mama se establecen en base al conocimiento de los riesgos y del beneficio de la terapia, surgiendo dos preguntas importantes para el tratamiento de estos pacientes: ¿cuál es el riesgo de recurrencia o muerte? y ¿cuál es la expectativa del beneficio de la terapia? Basados en estas dos preguntas se han identificado cier-

to parámetro pronósticos que han permitido clasificar los grados de recurrencia de estos pacientes en bajo, moderado o alto (3, 11, 17, 18). La investigación de las alteraciones cromosómicas mediante técnicas citogenéticas en el cáncer de mama ha sido fructífera, particularmente en las últimas décadas, ya que ha permitido importantes avances en el entendimiento del fenómeno de la transformación maligna y ha conducido al descubrimiento de alteraciones citogenéticas útiles en el diagnóstico y el establecimiento del pronóstico en este tipo de cáncer, lo que hace posible vislumbrar perspectivas alentadoras para su prevención y tratamiento (9,12,19). La detección de células tumorales circulantes en sangre periférica habla a favor de una diseminación hematogena en el desarrollo de una enfermedad metastásica, cuando las barreras defensivas hematogenas se alteran y las células tumorales pasan al torrente sanguíneo. Su presencia en la sangre, por lo tanto, indica una situación avanzada de la enfermedad y suele ir asociada a una mala evolución clínica del paciente (20). En el grupo de pacientes con cáncer de mama invasivo se observó en sangre periférica 73,33% de anomalías cromosómicas tanto de tipo estructurales como numéricas, de las cuales el 86,63% coincidieron con las presentes en el tejido tumoral, resultando estadísticamente significativo; esto puede ser el resultado de diseminación primaria del tumor. Las células tumorales entran a la circulación y pueden ser destruidas por muchas de las células del sistema inmunológico. Sin embargo, un muy elevado porcentaje de estas células eventualmente sobrevivirá y exitosamente se extravasará, causando una gran extensión de la enfermedad, llamada micrometástasis (13, 21, 22).

Por otro lado 7 mujeres con cáncer invasivo y 2 con cáncer *in situ*, presentaron en ambos tejidos anomalías cromosómicas diferentes en el cariotipo; la identificación y la evolución de estas aberraciones tienen aplicación creciente en la clínica para el establecimiento del diagnóstico y el pronóstico de esta micrometástasis. Sin embargo,

Tabla 1
Resultados citogenéticos. Tejido tumoral y sangre periférica en tumores invasivos de mama

Tipo de tumor	Edad	Anomalías tejido tumoral	Sangre periférica
Ductal Invasivo	55	35~45, XX, -3,-4,-8,-13,-15,-22, [7],	46,XX[50]
Ductal Invasivo	72	46,XX[13]	46,XX[50]
Ductal Invasivo	38	No creció	47,XX, t(15q;11q),+del(11p)[2], 46,XX[47]
Ductal Invasivo	48	31~45,X,-X,-1,-2,-3,-5,-6,-9,- 8,-12,-14,-17,-18,-20[9], 46,XX[11]	46,XX,t(11q,11q)[2] 46,XX[42]
Lobulillar Invasivo	40	48~49,XX,+6,+9,+mar,+ X,+dim[4],46,XX[9]	46,XX,ins(3q;16q)[3],46,XX[35]
Lobulillar Invasivo	38	47,XX,+mar[2],46,XX, del(12p)[5],46,XX[7]	46,XX,del12p[2],46,XX
Ductal Invasivo	55	47,XX,+mar[5],46,XX[10]	47,XX,+mar[3],46,XX[42]
Ductal Invasivo	43	No creció	46,XX[50]
Ductal Invasivo	67	35~41,XX,-4,-6,-10,-11,-14,-18,- 19,-21[8],45,X[4],46,XX[8]	46,XX[50]
Ductal Invasivo	59	47,XX,+r[4],45,XX'-1[2],46,XX[14]	47,XX,+r,[3]46,XX[41]
Ductal Invasivo	42	46,XX del(1p)[3],45,X[4],46,XX[13]	45,X[2],46,XX[50]
Ductal Invasivo	49	43~47,XX,-6,-8,-13,-14,-15,-16,- 17,-19,+mar[5],46,XX[14]	44,XX,-8,-21,-2,+mar[4],46,XX[43]
Ductal Invasivo	52	39~52,XX,-X,-1,-4,-7,-9,-11,-13,-15, ,21,+1,+2,+5,+9,+13[9] 46,XX[11]	43,XX,-4,-9,-11,[2],46,XX[47]
Ductal Invasivo	46	44~45,XX,-3,-10,-15,-19,- 22,+1,+3,+mar,+del(5p)[6] 46,XX,del(10p)[2],46,XX[12]	46,XX[50]
Ductal Invasivo	51	No creció	Tripoliploid[2],39,XX,-3,-6,-6,-8, -13,-14,-20[1],46,XX[49]
Ductal Invasivo	23	45,XX,-2,-4,-7-11+3mar[3]/46,XX[8]	46,XX[30]

Tabla 1 (Continuación)

Tipo de tumor	Edad	Anomalías tejido tumoral	Sangre periférica
Ductal Invasivo	36	47~48,XX,+1,+1,+mar[3],46,XX[4]	46,XX,del(5p)[1],48,XX,+1,+1[2],46,XX[32]
Ductal Invasivo	43	46,XX,del(4p)(p15)[3],49,XX,+1,+2mar[2] 46,XX[5]	47,XX,+mar,+4[2],46,XX[44]
Ductal Invasivo	48	39~45,X,-X,-1,-2,-3,-5,-8, -12-15,-19,-21,-22,[5], 46,XX[18]	46,XX[50]
Lobulillar Invasivo	50	39~45,X,-X,-4,-8,-11,-12,- 14[9], 46,XX[11]	46,XX[50]
Lobulillar Invasivo	72	Tetraploidía[2],46,XX[18]	Tetraploidia[3], 44,XX,-5, 21[2] 46,XX[50]
Ductal Invasivo	49	45~47,XX,-1,+8,+12,+19[4] 46,XX[14]	Tetraploidia[2], 44,XX,-21,-5,[2] 46, XX[48]
Ductal Invasivo	35	43~45,X,-X,-4,-4,-8,-9,-10,- 17,-19,-21[4], 46,XX[16]	43~45, X,-X,-2,-8,-10,-17,-19,-21 / 46,XX[50]
Ductal Invasivo	74	No creció	46,XX[50]
Ductal Invasivo	55	32~45,XX,-3,-3,-5,-6,-9,-14,-16,-17,-18,- 20[7] 46,XX+ t(20q;1q)[3],46,XX[10]	42~45,XX,-1,-9,-14,-17,-16[3] 46,XX,del (9q) [2], 46,XX [35]
Ductal Invasivo	43	46,XXdel (4p)(p15) [3]/49,XX,+1,+2mar[2] /46,XX[5]	47,XX,+mar,+4[2]/46,XX[24] /46,XX[5]
Ductal Invasivo	36	47~48,XX,+1,+1,+mar[3]/46,XX[4]	46,XX,del(5p)[1]/46,XX[32]
Ductal Invasivo	50	44,XX,-36,-6,-7,-8,+2mar[3]/46,XX[5]	47~49,XX,+2,+3,+6,+8,+mar[3]/ 46,XX[22]
Ductal Invasivo	23	45,XX,-2,-4,-7,-11,+3mar[3]/46,XX[8]	46,XX[80]
Ductal Invasivo	30	48,XX,+1,+2[3]/46,XX[9],46,XX[13]	46,XX[72]
Ductal Invasivo	63	47,XX,+ mar[3],46,XX[15]	46,XX,t(14q,9p)[2], 46, XX[42]
Ductal Invasivo	86	35~46,XX,-2,-4,-5,-8,-12,-13,-17,-19 [8]	43~46,XX -7-13-14 / 47,XX+mar
Ductal Invasivo	45a	46,XX[20]	46,XX, del 16p[5], 46, XX[38]

Tabla 2
Resultados citogenéticos en tejido y sangre periférica de cáncer de mama in situ

Tipo de tumor	Edad	Tejido	Sangre periférica
Ductal In situ	45	41~46,XX,-5,-7,-8,-9,-21[5],46,XX[7]	46,XX[25]
Ductal In situ	43	46,XX[13]	46,XX[20]
Lobulillar in situ	55	47,XX+11[2]/46,XX[7]	46,XX[30]
Ductal In situ	48	42~47,XX,-1,-2,-11,-15,+mar[4],46,XX[8]	46,XX[20]
Ductal In situ	39	45,X,-X[2],46,XX,t(1q;2q)[1],46,XX[14]	42~45X,-X,-1,-4,-1,-3[3],46,XX[22]
Ductal In situ	86	35~46,XX,-1,-4,-8,-12,-13,-17,-19,-22[6],46,XX[8]	45,XX,-17[1],46,XX[22]
Ductal In situ	68	43~46,XX,-3,-10,-11,[3],46,XX[6]	46,XX[25]
Lobulillar In situ	67	45,XX,-1,+mar[2],46,XX[9]	46,XX[30]
Lobulillar In situ	72	46,XX[11]	46,XX[50]
Ductal In situ	45	46,XX, ins(3q,16q)[3],46,XX[8]	46,XX,ins(3q;16q)[1],46,XX,-20,+dm[1],46;XX[32]
Ductal In situ	68	46,XX[13]	47,XX,+mar[1],46,XX,XX[30]
Ductal In situ	52	43,XX,-7,-11,-12,[5],46,XX[4]	46,XX[50]
Ductal In situ	52	47,XX,+mar,[2],46,XX[12]	47,XX,+mar[1]/46,XX[26]
Ductal In situ	45	42~45XX,-5,-9,-11,-17[15],46,XX[8]	46,XX[50]
Ductal In situ	55	48,XX,+1,+mar[2]46,XX[10]	46,XX[50]
Ductal In situ	62	Triploidia[3],46,XX[15]	46,XX[50]
Ductal In situ	43	44,XX,-20,-7[5],46,XX[13]	46,XX[65]
Ductal In situ	55	Tetraploidia[3]46,XX[18]	46,XX[58]
Ductal In situ	83	47,XX,+11[3],46,XX[12]	46,XX[72]
Ductal In situ	42	46,XX,t(1q;2q)[2],46,XX[18]	46,XX[68]
Ductal In situ	47	46,XX[20]	46,XX[80]
Ductal In situ	68	Tetraploidia [3],46,XX[16]	46,XX[56]
Ductal In situ	67	No creció	46,XX[70]
Ductal In situ	72	No creció	46,XX[80]

Tabla 2 (Continuación)

Tipo de tumor	Edad	Tejido	Sangre periférica
Lobulillar In situ	47	46,XX,t(4q;10q)[2],46,XX[13]	48,XX,+20,+dm[2],46,XX[47]
Ductal In situ	68	46,XX[20]	47,XX,+mar[2],46,XX, del(12p)[3], 46,XX[36]
Ductal In situ	56	47,XX,+mar[3],46,XX[14]	47,XX+mar[2],46,XX[48]
Ductal In situ	62	47,XX,+mar[2],46,XX[15]	45,X[3],45,XX,-17[1], 47,XX,+mar, 46,XX[49]
Ductal In situ	58	Hipodiploidia[5],46,XX[18]	46,XX[78]
Ductal In situ	49	46,XX,t(20q;1q)[3],46,XX[13]	Hipodiploidia[1],46,XX,del(9q)[1], 46,XX[36]

como se explica en un modelo de aneusomía de células circulantes en sangre periférica, que no representa un clon del tumor primario, consideramos varias posibilidades: (a) las células que están allí han sufrido cambios genéticos adicionales que permiten separarse del tumor primario; por ejemplo, pérdida de genes envueltos en la invasividad. (b) En algunas instancias, una porción de las células circulantes en sangre periférica pueden haber sido derivadas de metástasis que han sufrido cambios genéticos adicionales. Hasta ahora, no podemos excluir alguna de estas posibilidades (3, 23-25).

Cambios en el número de copias de los cromosomas o genes representan los primeros eventos en el desarrollo del carcinoma, teniendo relevancia clínica con respecto al pronóstico del paciente. Sin embargo, hay reportes de cambios genéticos en las células circulantes en sangre, explicando la heterogeneidad genética asociada al cáncer de mama (4, 21, 27). De las pacientes analizadas en nuestra muestra 27/36 (75%), se encontró la misma anomalía cromosómica tanto en la sangre venosa periférica como en el tejido tumoral, siendo un clon idéntico del tumor primario; se podría pensar que las células anormales encontradas en la sangre

periférica son células malignas derivadas de un tumor primario. Paterlini-Brechot (20) describe los pasos mediante los cuales las células malignas pasan del tejido tumoral a la sangre venosa para desarrollar micrometástasis. El crecimiento de las células tumorales suplente el oxígeno y activa la angiogénesis, la baja regulación de cadherinas epiteliales reduce la adhesión celular y permite la invasión de células tumorales resistentes a la apoptosis, las células tumorales con este fenotipo experimentan la transición de las células epiteliales a mesenquimales, ellas pierden progresivamente antígenos epiteliales y adquieren antígenos mesenquimales promoviendo la motilidad, posteriormente entran a los vasos sanguíneos por intravasación; estas células tumorales circulantes sufren apoptosis o se mantienen como células circulantes aisladas fuera del ciclo celular y no proliferan. Las células tumorales circulantes se extravasan a órganos; luego de la extravasación, las células tumorales circulantes permanecen como células tumorales solitarias (células tumorales diseminadas), o sufren una proliferación limitada (micrometástasis). Esta proliferación de células tumorales circulantes conduce a la metástasis y a la vía de reversión del fenotipo mesenquimal a epitelial y posteriormente a la angiogénesis.

La circulación de microémbolos representa una migración colectiva de células tumorales resistentes a la apoptosis, manteniendo la capacidad proliferativa. Las células tumorales metastásicas no pueden extravasarse; pero se detienen en los capilares y proliferan rompiendo las paredes de los mismos, originando la metástasis; así las células tumorales metastásicas mediarán un atajo hacia la metástasis (28-31).

Grinberg-Rashi y col. en 2010 (32), analizaron 20 pacientes usando citogenética molecular, y encontraron la presencia de células tumorales circulantes. Sin embargo no existe en la literatura revisada algún trabajo que analice estas alteraciones a través de citogenética convencional. El estudio cromosómico de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama es una técnica sencilla y ligeramente invasiva que permitirá evaluar estos pacientes de manera rápida y contar con un dato que resultará de mucha utilidad para la evaluación del riesgo de recurrencia y muerte en estas pacientes.

Referencias bibliográficas

- ROBLES SILVIA, GALANIS E, R. *Re Pan Am/ Public Healt* 12: 141-143. 2002.
- CORDON C. *Am J Pathol* 147: 545-560. 1995.
- BIECHE I., LIDERAU R. *Genes Chrom and Cancer* 1995 .14:227-25.
- MUÑOZ A. <http://www.Farmaindustria.es/Farmaweb/7pb43811prod.nsf/0/Ba5E213878C846A1C125.2005>. Fecha de consulta 05-11-2012.
- PANDIS N., YUESHENG J., GURUNOVA L., PETERSON C., GEORGIA B., IDVALL I., JOHANSON B., CHRISTIAN I., MANDAHN N., MITELMAN F., HEIM S. *Genes Chrom Cancer* 12: 173-185 . 1995.
- ROJAS-ATENCIO A., GONZALEZ L., URDANETA K., SOTO-ALVAREZ M., PRIETO-CARRASQUERO M., FULCADO W., QUINTERO M., BOSCAN A., ALVAREZ-NAVA F. *Invest Clin* 40: 179-189.1999.
- AMIT H TRIVEDI, SHAMBHU R. *Clin Cancer Res* 8 : 2073-2084. 2002.
- BOZCUK H., USLU G., PESTERELI E., SAMUR M. *Breast Cancer Res* 68: 290-301. 2001.
- AMIT H TRIVEDI, SHAMBHU K, ROY, RASUMI K, PATEL, SONAL, H. BHACHECH, SONAL R. BAKSHI. *Cancer Genet Cytogenet* 110:138-139. 1999.
- ROA J.C., ARETXABALA-W S.U., MELO A., GASPAR J., ARAYA O., VILLASECA M., GUZMAN P, ROA I. *Rev Med Chile* 132: 1484-1498. 2004.
- BUERGER H., MOMMERS E., LITTMANN R., RAIHANATOU D., BRINKSCHMIDT C., POREMBA C. *Am J of Clin Pathol* 114: 854-859. 2000.
- FARAH AZIZI. *Cancer Genetcytogenet* 132: 169-170. 2002.
- PATRIARCA F., SACCO C., SPEROTTO A., GEROMIN A., DAMIANI D., FILI C., CERNO M. L. *Bone Marrow Transplant* 31: 789-794. 2003.
- MOORHEAD P, NOWELL P, MELLMAN W, BATTIPS D, HUNGERFORD D. *Exp Cell Res* 20 : 613-616. 1960.
- YUNIS J.J. *Hosp Prog* 46: 142-6. 1965.
- VERMA RAM S., ARVIND BABU. *Human Chromosomes Principles and Techniques*. McGraw-Hill, Inc.3 20-390. 1995.
- SHAFFER L., TOMMERUP N. *An International Systems for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN)*. (Ed. S. Kargel, published in collaboration with Cytogenetic and Genome Research). Reinhardt Druck (Switzerland). 59-110. 2005.
- HALL J.M., ANDERSON, LA CARTER C, KING. *Am J Human Genet.* 44: 557-584. 1989.
- MICHELLE L. *22 Annual Breast Cancer Symposium*. San Antonio USA, December 10. 1999.
- CASIMIR B., OBERHOFF C., SLIWINSKA K., NEUMANN R., SCHINDLER A., SEEBER S. *Breast Cancer Res* 69: 123-132. 2001.

21. PARTELINI-BRECHOT P., BENALI NAOUAL L. **Cancer Lett** 253: 180-204. 2007.
22. TANJA F., SAGALOWSKY A., CLIFFORD E., BEITSCH P., HOSSEIN S., EUHUS D. **Clin Cancer Res** 8: 2073-2084. 2002.
23. AGUADO M.J. **Conserjería de salud agencia de evaluación de tecnologías sanitarias de Andalucía, observatorio de tecnologías emergente**. AETSA. 2005.
24. CRISTOFANILLI M., BUDD T., ELLIS, ALINSON S., MATERA J., MILLER C., REUBEN J. **NE J of Med** 351: 781-791. 2004.
25. HEKIMIAN K., MEISEZAH S., TROMPELT K., RABENSTEIN C., PACHMANN K. **Oncology** ID 601810, 8 pages. 2012.
26. MEHES G., WITT A., KUBISTA E., AMBROS P. **Am J of Pathol** 159: 17-19. 2001.
27. HERNANDEZ M.C.. **Cancerologia** 46: 2007-2014. 2000.
28. OZBAS S., DAFYDD H., PURUSHOTHAM A. **Brithish J of Surgery** 90: 290-301. 2003.
29. ZIEGLSCHMID V., HOLLMANN C., BOCHER O. **Rev Clin Lab Sciences** 42: 155-196. 2005.
30. JIANG W.G., MARTIN T.A., MANSEL R.E. **Oncology Hematology** 43: 13-31. 2002.
31. SORIA C.J., GAUTHIER L.R. , RAYMOND E., GRANOTIER C., MORAT L., ARMAND J.P., BOUSSIN F.D., SABATIER L. **Clin Cancer Res** 5:971-975. 1999.
32. GRINBERG-RASHI H., CYTRON S., GELMAN-KOHAN Z., LITMANOVITCH T., AVIVI L. **Neoplasia** 12: 668-674. 2010.