



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO
MARCADORES TUMORALES: PRESENTE
Y FUTURO

Autor: Laura Lavín de Juan

D.N.I.: 50553767C

Tutor: Margarita Fernández García de Castro

Convocatoria: Junio del 2015

ÍNDICE

RESUMEN Y ABSTRACT.....	pág 2
INTRODUCCIÓN.....	pág 2
OBJETIVOS.....	pág 4
MATERIAL Y MÉTODOS.....	pág 4
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	pág 5
1. MARCADORES TUMORALES: PRESENTE.....	pág 5
1.1. Marcadores tumorales en cáncer colorrectal.....	pág 6
1.2. Marcadores tumorales en cáncer de pulmón.....	pág 8
1.3. Marcadores tumorales en cáncer de mama.....	pág 10
1.4. Marcadores tumorales en cáncer de próstata.....	pág 12
1.5. Marcadores tumorales en cáncer de vejiga.....	pág 13
1.6. Marcadores tumorales en cáncer de ovario.....	pág 14
2. MARCADORES TUMORALES: PERSPECTIVAS FUTURAS.....	pág 15
2.1. Micro RNAs como marcadores tumorales.....	pág 15
2.2. Análisis del DNA circulante: biopsias líquidas.....	pág 17
CONCLUSIONES.....	pág 20
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	pág 20

MARCADORES TUMORALES: PRESENTE Y FUTURO

RESUMEN

El cáncer es la segunda enfermedad no transmisible que más muertes produce al año a nivel mundial. A pesar de los avances de las últimas décadas, aún existe un amplio margen de mejora en el diagnóstico, pronóstico y monitorización de la enfermedad, así como en la detección de recidivas. Los marcadores tumorales juegan un importante papel en estos aspectos, empleándose en la actualidad una veintena de ellos en la práctica clínica. Sin embargo, estas moléculas presentan ciertas limitaciones que están llevando a los investigadores a estudiar nuevas posibilidades, como la utilidad del material genético circulante como marcador tumoral más preciso. En este trabajo se realizó una revisión bibliográfica sobre los marcadores empleados en la actualidad en cánceres comunes en nuestro país y sobre algunos de aquéllos que podrían, en un futuro cercano, constituir una herramienta para incrementar las tasas de curación de esta enfermedad.

ABSTRACT

Cancer is the second non-communicable disease that causes more deaths worldwide annually. Despite the advances of recent decades, there is still ample room for improvement in the diagnosis, prognosis and monitoring of disease, as well as in detecting recurrences. Tumor markers play an important role in these areas, and twenty of them are used in clinical practice nowadays. However, these molecules have limitations that are leading the researchers to study new possibilities such as the utility of circulating genetic material as a more accurate tumor marker.

This paper presents a literature review on the markers used currently in common cancers in our country and some of those that could, in the near future, be a tool for increasing cure rates of this disease.

INTRODUCCIÓN

Desde la aparición de los antibióticos y con el implacable avance de los tratamientos para las enfermedades infecciosas, en el siglo XXI las enfermedades no transmisibles suponen la principal causa de muerte en los países de ingresos medios y altos¹.

Después de las enfermedades cardiovasculares, el cáncer es la enfermedad no transmisible o crónica de mayor impacto mundial, suponiendo un 14% de las muertes que se producen cada año en todo el planeta (más del 20% de las muertes anuales en los países desarrollados)².

Además, la OMS prevé que el número de nuevos casos de cáncer aumente aproximadamente un 70% en los próximos 20 años.

Para atajar esta alarmante situación son de vital importancia las actuaciones encaminadas a reducir los factores de riesgo de la enfermedad, pero no menos relevantes son el diagnóstico precoz y la rápida detección de recidivas. Ambos incrementan enormemente las posibilidades de que el tratamiento resulte eficaz y por tanto contribuyen a aumentar la supervivencia del paciente y mejorar su calidad de vida³. A pesar de los progresos en este campo, todavía hay muchos cánceres que se diagnostican cuando el proceso metastásico ya se ha iniciado, lo que empeora drásticamente el pronóstico¹⁰. En los últimos años, gracias a los múltiples estudios científicos, se ha podido comprender mejor esta enfermedad, y con los métodos diagnósticos (biopsias, endoscopias, aspiraciones de médula ósea, análisis de sangre y de esputo, técnicas de imagen, etc.) se está consiguiendo detectar y controlar de manera cada vez más eficaz⁸. No obstante, todavía queda mucho camino por delante para combatir el cáncer, por lo que sigue habiendo un gran número de líneas de investigación abiertas sobre el tema. Una de las más importantes actualmente es la que estudia los marcadores tumorales y sus múltiples aplicaciones, en la cual se centrará este trabajo.

Concepto de cáncer

Cuando hablamos de cáncer nos referimos a células que han abandonado el protocolo que controla la multiplicación y proliferan permanentemente formando masas celulares con capacidad diseminativa que denominamos tumores malignos.

Ya desde la aparición de las formas de vida pluricelulares, millones de años atrás, comenzaron a gestarse las primeras rutas biológicas que más tarde conducirían al cáncer. La pluricelularidad implica algunas deficiencias moleculares que permiten el desarrollo de los procesos tumorales: cierta falta de fiabilidad en la replicación y reparación del DNA, complejas redes de señalización intra e intercelulares susceptibles de sufrir alteraciones y el mantenimiento en nuestros órganos y tejidos de un número de células con potencial proliferativo e invasivo elevado⁶.

Aunque las enzimas que replican el ADN son sumamente exactas y existen mecanismos de control para que el proceso de división se realice sin errores, hay ocasiones en las que este mecanismo se ve superado por mutaciones que producen cambios en el material genético impidiendo el recambio celular natural.

En respuesta al daño en el DNA, las células activan una red de señalización basada en las quinasas muy conservada y compleja, conocida generalmente como respuesta al

daño en el DNA, para conservar la integridad genómica. Este proceso incluye la detección del daño en el material genético, acumulación de factores de reparación del DNA y finalmente reparación de la lesión. En caso de que el daño sea demasiado elevado, la respuesta al daño en el DNA inducirá una muerte celular programada (apoptosis) en las células afectadas⁵. Fundamentalmente, el proceso de oncogénesis está determinado por dos tipos de genes: los proto-oncogenes y los genes supresores de tumores. Los primeros están implicados en el control de los procesos de proliferación y diferenciación celular. La ocurrencia de una mutación en ellos puede resultar en oncogenes codificantes de proteínas que desencadenan señales positivas de proliferación, lo que hará que las células se mantengan estimuladas para sufrir continuas divisiones originando el tumor. Los productos proteicos de los segundos (también conocidos como anti-oncogenes) bloquean el proceso de división celular en presencia de daños en el DNA hasta que estos sean reparados, y en caso de que la reparación no sea posible, inician el proceso de apoptosis en la célula a fin de evitar que ésta transmita los errores genéticos a la descendencia. Cuando los productos de estos genes no son funcionales o están ausentes, la célula pierde esta protección y se desarrollan tumores malignos⁷. Una vez se ha producido una de estas alteraciones en la primera célula, ésta comienza una división incontrolada, pueden irse adquiriendo nuevas mutaciones, y todo ello desemboca en un cáncer. Todos estos genes mutados y los productos de su expresión pueden ser considerados marcadores tumorales, de ese tumor en ese paciente en concreto. A partir de ese momento, es fundamental una detección lo más temprana posible para iniciar el tratamiento frente a la enfermedad antes de que se propague a otros órganos y tejidos del organismo. Además, resulta de suma importancia la instauración del tratamiento más óptimo en cada paciente, haciendo un seguimiento del mismo, y la evaluación de los riesgos de recidivas. En todo ello jugarán un importante papel los marcadores tumorales.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es el estudio de los marcadores tumorales empleados actualmente en los tipos de cáncer más frecuentes en nuestro país y de aquéllos que podrían utilizarse en un futuro.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó una revisión bibliográfica, manejándose un total de 50 artículos en inglés y 20 páginas web, seleccionándose finalmente 41 referencias que se reflejan en la bibliografía. La mayoría de los artículos seleccionados datan de los años 2013-2015.

Los buscadores empleados fueron PubMed, Scielo y las páginas web del NCI (National Cancer Institute), ASCO (American Society of Clinical Oncology), British Journal of Cancer y SEOM (Sociedad Española de Oncología Médica).

Las palabras clave de la búsqueda fueron: cancer, tumor marker, serum tumor marker, cancer diagnosis, oncogenesis, miRNA, biomarker, liquid biopsy.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Marcadores tumorales: presente

Los marcadores tumorales son sustancias secretadas bien por células cancerosas o bien por células sanas en respuesta al cáncer. En su mayoría son de naturaleza proteica, y se encuentran aumentadas en caso de que exista un tumor. Engloban una amplia variedad de sustancias como proteínas citoplasmáticas, enzimas, hormonas, antígenos oncofetales, receptores y oncogenes. Son apreciables en fluidos corporales (marcadores tumorales humorales) o bien en tejidos (marcadores tumorales tisulares), por lo que son de utilidad en la detección, diagnóstico y manejo de múltiples tipos de cáncer⁴.

En la actualidad existen cientos de marcadores tumorales descritos, pero sólo una veintena de ellos se utiliza de manera ordinaria en la práctica clínica. La mayoría se emplea como un complemento de otras técnicas de diagnóstico, puesto que establecer un diagnóstico basado únicamente en los niveles de marcadores tumorales llevaría a error debido a la falta de especificidad de los mismos. Actualmente, a pesar de que es indiscutible la utilidad clínica de estos biomarcadores, ninguno de ellos reúne todas las características del marcador tumoral ideal. (Tabla 1)

Características	Observaciones
Alta especificidad	Detectable sólo en un tipo de tumor
Alta sensibilidad	Indetectable en estado fisiológico y tumores benignos
Largo tiempo de permanencia	Suficiente para la alteración del curso natural de la enfermedad
Correlación niveles-grado tumor	Utilidad en el diagnóstico y la predicción
Muestras fáciles de obtener	Aceptabilidad por la población diana
Ensayos sencillos y baratos	Aplicables como test de <i>screening</i>
Vida media corta	Permite frecuentes monitorizaciones en serie

Tabla 1. Características del marcador tumoral ideal.

Los usos clínicos de los marcadores pueden clasificarse en cuatro grupos:

- Detección temprana del tumor
- Confirmación del diagnóstico
- Pronóstico y predicción de la respuesta terapéutica

- Monitorización de la enfermedad y recurrencia

Probablemente la monitorización de la enfermedad sea el uso clínico más común que se da a los marcadores tumorales sanguíneos: una tendencia al alza en los niveles serológicos pueden indicar una recurrencia de la enfermedad antes de que ésta sea clínica o radiológicamente detectable¹².

En España, según datos calculados por la SEOM (Sociedad Española de Oncología Médica), más de 220.000 personas serán diagnosticadas de cáncer en el año 2015, siendo el tipo de cáncer con mayor incidencia el cáncer colorrectal seguido del de mama y próstata⁴¹. (Gráfico 1).

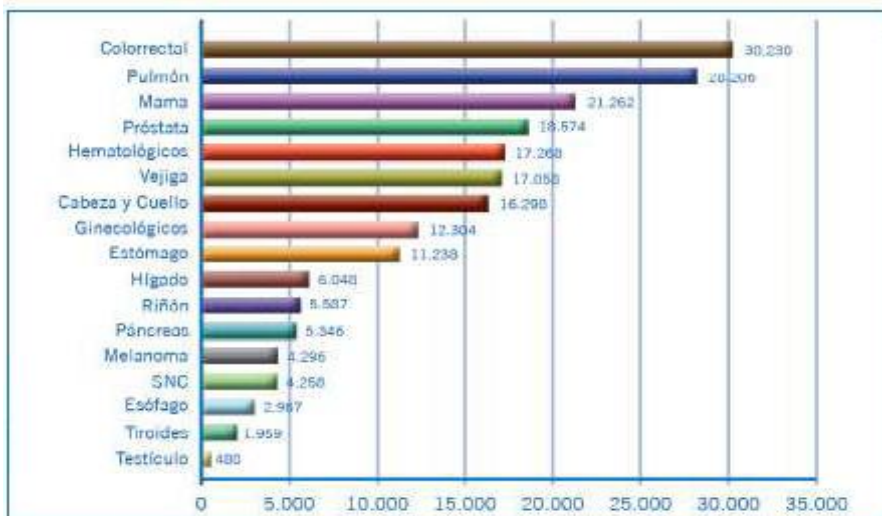


Gráfico 1. Incidencia del cáncer en España por tipo de tumor. Estimación para el 2015.

A continuación se analizarán algunos de los marcadores más utilizados actualmente en diversos tipos de cáncer frecuentes en nuestro país, tanto en el diagnóstico como en la monitorización, pronóstico y búsqueda de recidivas.

1.1. Marcadores tumorales en el cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal es uno de los cánceres con más posibilidades potenciales de cura, pero aún es el cuarto cáncer que más muertes produce en todo el mundo²¹.

Aproximadamente en uno de cada tres afectados la enfermedad resulta mortal. La razón por la que no se observa una recuperación en una proporción tan alta de pacientes con cáncer de colon es la detección tardía, muchas veces cuando ya se ha producido una diseminación de células cancerosas a otras zonas del cuerpo.

Actualmente la técnica de diagnóstico más comúnmente aplicada y de mayor eficacia es la sigmoidoscopia y la colonoscopia. La sensibilidad y especificidad de este método alcanzan el 92%. A pesar de ser numerosas sus ventajas, la endoscopia es una técnica invasiva, causa incomodidad en los pacientes y presenta riesgos de perforación y

sangrado del intestino grueso. Todo esto hace que el paciente a menudo posponga y evite este examen médico, con el riesgo que ello conlleva. Para facilitar y mejorar el diagnóstico y monitorización de la enfermedad se emplean varios marcadores tumorales.

- **Antígeno carcinoembriogénico (CEA).** Es el marcador más frecuentemente examinado cuando se sospecha de un tumor en el tracto gastrointestinal. Desafortunadamente, el aumento de la concentración de CEA en plasma (>5 ug/mL) raramente se produce en estadios iniciales del tumor, por lo que suele emplearse para determinar el pronóstico (que será desfavorable si los niveles preoperatorios de CEA son altos) y evaluar la respuesta al tratamiento. Sin embargo, aunque la sensibilidad del CEA para el cáncer colorrectal es buena, su especificidad y validez no son suficientes para el diagnóstico temprano. Sus principales inconvenientes son la liberación de CEA a la sangre en enfermedades inflamatorias como hepatitis, EPOC o pancreatitis; y que en el 15% de los tumores del intestino grueso no hay incremento de CEA.

- **Antígeno carbohidrato 19-9 (CA 19-9).** Es una glicoproteína de alto peso molecular empleada en el diagnóstico de cáncer hepático, pancreático y colorrectal. En este último, la estimación simultánea de CEA y CA 19-9 incrementa la sensibilidad diagnóstica, y se utiliza como un factor pronóstico preoperatorio en la evaluación del estadio del tumor y la tasa de supervivencia.

- **TPS (antígeno polipeptídico específico tisular).** Consta de una cadena polipeptídica que se forma en las fases S y G2 del ciclo celular y se libera de las células tras la mitosis. Se emplea en diagnóstico y monitorización de la quimioterapia en cánceres del tracto gastrointestinal. La concentración sérica de TPS está estrechamente ligada a la proliferación celular del tumor, y su límite superior es de 90 U/L. La estimación de niveles de TPS podría realizarse en estadios tempranos de la enfermedad, pues se ha visto que éstos se elevan en el 60-80% de pacientes con cáncer colorrectal. Existen estudios en los que se relaciona la concentración de TPS en sangre incrementada con un tiempo de supervivencia reducido. Algunos autores proponen la utilización de TPS en lugar del CEA para la monitorización de la enfermedad²³.

- **Glicoproteína 72 asociada a tumores (TAG-72).** Esta molécula es producida por células endoteliales, renales, de los conductos biliares y del epitelio gástrico. Su sensibilidad diagnóstica como marcador del cáncer colorrectal es del 28-67%, por lo que se recomienda combinar sus mediciones con las de otros marcadores como el CEA.

- Exoglicosidasas lisosomales como marcadores potenciales del cáncer colorrectal.

Recientemente ha habido varios estudios encaminados a la aplicación de las exoglicosidasas lisosomales como marcadores en el cáncer colorrectal, incluyendo la α -manosidasa, β -galactosidasa, N-acetil- β -D-hexosaminidasa, sus isoenzimas A y B y la catepsina D^{23, 24}. En el desarrollo del cáncer colorrectal, los macrófagos, mastocitos y neutrófilos participan en la transformación de las células tumorales. Las exoglicosidasas liberadas por los macrófagos ayudan al desarrollo y diseminación del tumor, y se ha detectado una actividad incrementada de dichas enzimas en suero y orina de los enfermos. La ventaja del test de medición de exoglicosidasas es su bajo coste además de su simplicidad y repetibilidad, y aunque su especificidad es limitada se está planteando como herramienta de diagnóstico²⁵.

1.2. Marcadores tumorales en cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es una de las causas de mortalidad relacionada con el cáncer más común en el mundo, siendo responsable de 1,4 millones de muertes al año. Resulta sorprendente en este tipo de cáncer la baja supervivencia que presenta, puesto que sólo el 10-15% de los pacientes continúan con vida 5 años después de ser diagnosticados. Este hecho se explica fundamentalmente por una detección tardía, en el 80% de los casos cuando el tumor ya se ha diseminado y por tanto los tratamientos resultan mucho menos efectivos. Otro de los grandes problemas de la enfermedad es la alta tasa de recurrencia, que se produce en el 50% de los casos, y generalmente en lugares distantes. Esto indica que a menudo la presencia de enfermedad micrometastásica no se detecta con las técnicas tradicionales.

En este tipo de cáncer resulta de vital importancia establecer qué pacientes requieren una quimioterapia adyuvante, y para ello además del estadio patológico del tumor es necesaria la medición de marcadores para un diagnóstico eficaz¹⁶. Para predecir la respuesta terapéutica en pacientes con cáncer de pulmón se analizan de manera rutinaria las mutaciones genéticas del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y las reordenaciones genéticas de la quinasa de linfoma anaplásico (ALK). Ambos son marcadores tumorales tisulares.

- Gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Este gen codifica una tirosina quinasa transmembrana. Las mutaciones en los exones 18-21 del dominio intracelular, deleciones en el exón 19 y la presencia del punto de mutación L858R en el exón 21 están presentes en el 90% de los genes EGFR mutados. Se asocian con una

buena respuesta a la terapia con el inhibidor EGFR-tirosina quinasa en cáncer de pulmón de células no pequeñas.

- **Gen de la quinasa del linfoma anaplásico (ALK).** La reordenación de este gen resulta de una inversión en el cromosoma 2p. Ocurre aproximadamente en el 4% de pacientes con adenocarcinoma de pulmón, habitualmente jóvenes, no fumadores y con una enfermedad clínicamente avanzada. La detección de esta alteración orienta hacia una terapia con crizotinib (inhibidor de receptores de tirosina quinasa).

En el cáncer de pulmón también resultan de utilidad los marcadores serológicos, siendo los más estudiados proteínas circulantes: el antígeno carcinoembrionario (CEA) y el fragmento sérico de la citoqueratina 19 (CYFRA 21-1). El principal uso potencial de estos marcadores es la detección del cáncer de pulmón en un estadio temprano.

- **CEA.** En los estadios tempranos del cáncer de pulmón de células no pequeñas presenta un valor pronóstico: múltiples estudios señalan que niveles elevados de CEA se relacionan con un mal pronóstico (menor supervivencia a los 5 años). Se realizan mediciones de este marcador antes y después de la cirugía de resección del tumor. La mayor supervivencia a los 5 años se ha encontrado en pacientes con niveles normalizados de CEA pre y post-operatorios, seguidos de aquellos cuyos niveles de CEA se redujeron tras la resección del tumor. Se ha visto que en los pacientes con CEA post operatorio elevado podría resultar beneficiosa una quimioterapia adyuvante¹⁸. El principal problema que presenta este marcador es que en individuos fumadores sanos se expresa en mayor medida, lo que podría reducir su uso clínico. Tampoco se conoce bien cómo afectan enfermedades inflamatorias coexistentes en las medidas de CEA.

- **CYFRA 21-1.** Las citoqueratinas son proteínas filamentosas expresadas por las células epiteliales. Las citoqueratinas 7, 8, 18 y 19 son las que más frecuentemente se asocian a carcinomas, pudiéndose detectar en plasma sus complejos de degradación. Los fragmentos de la citoqueratina 19 se liberan a la sangre a causa de la necrosis de las células tumorales. Su medición es de utilidad para determinar el pronóstico. Se realiza en pacientes diagnosticados de la enfermedad por primera vez, previamente al tratamiento, siendo niveles séricos elevados un indicativo de mal pronóstico y menor tasa de supervivencia a los 5 años.

Varios estudios han comprobado que el valor pronóstico de los valores combinados de CEA y CYFRA previos al tratamiento es mayor que el de las mediciones por separado.

1.3. Marcadores tumorales en el cáncer de mama

Según los informes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) del año 2012, el cáncer de mama es la principal causa de muerte entre las mujeres, constituyendo el 23% de las muertes por cáncer. En torno a una de cada ocho mujeres y uno de cada mil hombres desarrollará cáncer de mama durante el curso de su vida. Es necesario señalar que ninguno de los marcadores tumorales conocidos en la actualidad para este tipo de cáncer permite el diagnóstico en los estadios tempranos⁹.

Los biomarcadores tisulares de mayor relevancia clínica son los siguientes:

-Receptores hormonales. Los receptores estrogénicos (ER) y de progesterona (PR) se consideran marcadores predictivos y de pronóstico. ER- α y PR se miden a fin de identificar a aquellos pacientes que pueden responder a un tratamiento hormonal, y también presentan utilidad en combinación con otros factores (estadio y grado del tumor, número de nódulos linfáticos con metástasis) para determinar el pronóstico a corto plazo en pacientes diagnosticados por primera vez. La medición de estos receptores suele realizarse por unión de ligando, ELISA o inmunohistoquímica.

- Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). Proteína que se mide en pacientes con cáncer de mama invasivo (especialmente en los que presentan afectación de los nódulos linfáticos) con la finalidad de seleccionar los pacientes en los que la terapia con trastuzumab (anticuerpo contra el receptor HER2) y la quimioterapia basada en antraciclinas pueden resultar beneficiosas. HER2 se detecta en el tejido tumoral por análisis inmunohistoquímico y FISH (hibridación fluorescente in situ).

-Uroquinasa activadora de plasminógeno (uPA) e inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1). Son útiles en la identificación de pacientes sin afectación de nódulos linfáticos, los cuales no requieren una quimioterapia adyuvante. En dichos pacientes, niveles bajos de uPA y PAI-1 indican un bajo riesgo de recidiva. La técnica de medición de estas moléculas es ELISA⁹.

Los marcadores genéticos más significativos en el cáncer de mama a día de hoy son **BRCA1** y **BRCA2**. Estos genes producen proteínas supresoras de tumores que ayudan a reparar el DNA dañado. La presencia de mutaciones en ellos constituye una fuerte evidencia para desarrollar cáncer de mama, indicando un 40-80% de posibilidades de sufrir la enfermedad. Estos marcadores se utilizan para identificar individuos que tienen un alto riesgo de desarrollar cáncer de mama y ovario⁹.

En cuanto a los marcadores serológicos o humorales, son útiles para ayudar en el diagnóstico precoz, determinar el pronóstico, predecir la respuesta y la posible

resistencia a terapias específicas, vigilancia tras la primera intervención quirúrgica y monitorizar la terapia en pacientes con enfermedad avanzada¹⁰. Los más comúnmente empleados son las proteínas de la familia de la mucina 1 (MUC-1): **CA 15-3**, **CA 27-29**, **MCA** y **CA 549**. Como todos ellos tienen sensibilidad y especificidad similar para el diagnóstico, la combinación de más de un antígeno MUC-1 no confiere ninguna ventaja adicional. Por ello, el protocolo recomendado es la combinación de un marcador MUC-1 con el antígeno carcinoembrionario (CEA)⁹.

Generalmente se combina el antígeno carbohidrato 15-3 (glucoproteína de alto peso molecular que se encuentra en las células epiteliales) con el CEA. CA 15-3 puede ser detectado en suero a través del método radioinmunométrico, empleando dos anticuerpos monoclonales (115D8 y DF3)¹⁰. Se consideran niveles elevados aquellos que superan las 30U/mL¹¹. Actualmente, la aplicación clínica más importante de esta molécula es la monitorización de la terapia en los pacientes con un cáncer de mama avanzado no evaluable por métodos clínicos o radiológicos. También tiene valor como marcador para determinar la respuesta al tratamiento¹². No suele emplearse en el diagnóstico precoz, puesto que se encuentra en niveles sanguíneos muy bajos en los primeros estadios de la enfermedad que se incrementan con el tamaño del tumor, la afectación de los ganglios linfáticos y especialmente con la presencia de metástasis¹³.

La mayor limitación del CA 15-3 es que en un 25% - 30% de los enfermos no se secreta, mientras que sí se ve incrementado en otras situaciones, incluyendo neoplasias en pulmón, páncreas, ovario, y colon así como en cirrosis, hepatitis y en trastornos mamarios benignos. Los niveles de CA 15-3 observados en patologías no cancerosas tienden a mantenerse estables a lo largo del tiempo, mientras que en los casos de cáncer aumentan progresivamente¹⁴.

En lo que respecta al **CEA**, se trata de una glucoproteína oncofetal que aparece sobreexpresada en varios adenocarcinomas, en algunas enfermedades inflamatorias y en fumadores. Sus mediciones se realizan por radioinmunoanálisis. En el cáncer de mama el CEA se ha relacionado con la extensión de la enfermedad y el pronóstico¹⁵.

Aunque estos marcadores por sí solos ofrecen gran cantidad de información clínicamente relevante, recientemente se ha visto que su combinación con técnicas de imagen novedosas como el PET/CT (tomografía de emisión de positrones/tomografía computerizada) se consiguen aún mejores resultados en la detección de metástasis y recidivas⁴⁰.

1.4. Marcadores tumorales en el cáncer de próstata

El cáncer de próstata es el cáncer más común y la segunda causa de muerte relacionada con el cáncer en los hombres. La prostatectomía radical es la primera opción terapéutica para tumores avanzados y clínicamente localizados.

El antígeno prostático específico (PSA) es el marcador serológico más ampliamente utilizado en la detección temprana de este tipo de cáncer. Se trata de una serina proteasa tipo calicreína secretada por las células epiteliales de la próstata y codificada por un gen andrógeno dependiente. Su cometido es licuar el semen humano gracias a su acción proteolítica. Una pequeña parte del PSA pasa a la circulación sanguínea de hombres enfermos. A pesar de que su determinación ha conducido a una reducción significativa en la mortalidad del cáncer de próstata, y de que constituye una herramienta de diagnóstico y pronóstico eficaz, existen ciertas limitaciones en la medición del PSA. Destacan la baja especificidad en la determinación de la presencia de esta molécula (puesto que también aumenta con la edad y en prostatitis e hiperplasia benigna de próstata) y la incapacidad de discernir entre un cáncer clínicamente significativo y otro que no lo sea²⁰. El establecimiento de un límite de 4ug/L conduce a un alto número de falsos positivos y a más de un 75% de biopsias innecesarias. Se ha comprobado que existe una sobredetección, y por tanto un sobretratamiento del cáncer de próstata, que se estima en más del 50% de los casos.

Para mejorar la selección de pacientes en los que se requiere una biopsia de próstata se han empleado diversos derivados del PSA, como el PSA libre, porcentaje de PSA libre, densidad y velocidad del PSA. Sin embargo, estos parámetros no ayudan en la determinación de la presencia y agresividad del cáncer de próstata, ni por tanto en dilucidar en qué pacientes es necesaria una biopsia.

El precursor del PSA (proPSA) es una de las formas identificadas del PSA libre y es considerado un candidato a marcador serológico del cáncer de próstata prometedor y más específico. La isoforma más frecuente de esta molécula en zonas periféricas al tumor es la p2PSA. Los derivados más estudiados del p2PSA sérico son %p2PSA y PHI (índice de salud prostática), los cuales han mostrado un gran potencial en el incremento de la precisión diagnóstica. Ofrecen una mayor especificidad y reducen las biopsias innecesarias en la detección del cáncer de próstata, manteniendo además una alta sensibilidad. Los cálculos preoperatorios del %p2PSA y PHI permiten conocer si el tipo de cáncer del paciente es agresivo o no, y en consecuencia decidir la mejor opción terapéutica para cada individuo¹⁹.

1.5. Marcadores tumorales en el cáncer de vejiga

El cáncer de vejiga es el sexto cáncer de mayor incidencia en España, y presenta una tasa de recurrencia y mortalidad alta. El 50-70% de los tumores no músculo invasivos (que son los más frecuentes) recurren a pesar de la terapia transuretral e intravesical, por lo que requieren una vigilancia de por vida. En consecuencia, tiene el coste más alto desde el diagnóstico hasta la muerte de todos los cánceres, lo que hace muy necesario un marcador tumoral adecuado que pueda ser de utilidad en el diagnóstico y seguimiento de pacientes con historia de cáncer de vejiga.

A día de hoy el diagnóstico y la vigilancia post-tratamiento se basan en la citología urinaria y la cistoscopia. Además, resulta relevante la medición de niveles de ciertos marcadores tumorales presentes en la orina²⁶.

Hasta la fecha, los marcadores tumorales aprobados por la FDA para el diagnóstico y seguimiento de esta enfermedad son los siguientes:

- **BTA (antígeno del cáncer de vejiga) stat.** Es un test cualitativo con un resultado inmediato que identifica en orina la proteína relacionada con el factor H del complemento. Esta proteína es producida únicamente por la línea de células humanas de la vejiga. El test BTA TRAK proporciona una determinación cuantitativa de la misma. Ambos tests tienen sensibilidades comparables a la de la citología urinaria para los tumores de estadios avanzados y mejor sensibilidad que ésta en estadios iniciales²⁸.

- **NMP22 (proteína del aparato mitótico nuclear).** Forma parte de la familia de las proteínas de la matriz nuclear. Presenta mayor sensibilidad y similar especificidad que la citología urinaria, con un coste sensiblemente menor. No obstante, al liberarse en el proceso de apoptosis de las células uroteriales, los procesos inflamatorios e infecciosos benignos pueden propiciar falsos positivos. Sus niveles se miden por inmunoensayo²⁸.

- **UroVysion.** Este test emplea la técnica FISH (hibridación fluorescente in situ) para identificar anomalías cromosómicas en los cromosomas 3, 7, 17 y 9p21. Presenta mayor sensibilidad que la citología urinaria en todos los estadios del tumor, pero su especificidad es algo menor. En los últimos años ha ganado bastante popularidad ya que ha mostrado superioridad frente a la citología urinaria en la detección del cáncer de vejiga en su estadio más inicial y en la monitorización de pacientes tratados con el bacilo de Calmette-Guérin intravesical²⁷.

A pesar de que la detección y el seguimiento de cáncer de vejiga empleando marcadores tumorales parecen ser prometedores, en el presente no se utilizan por sí solos.

1.6. Marcadores tumorales en el cáncer de ovario

El cáncer de ovario constituye la cuarta causa de muerte femenina por cáncer a nivel mundial. Aunque es considerado el cáncer ginecológico más letal, es curable si se detecta a tiempo y es tratado. Generalmente tiene un mal pronóstico porque su detección temprana es difícil y en los casos recurrentes a menudo presenta resistencia a los fármacos³⁰. La morbilidad y mortalidad de esta enfermedad es alta en todo el mundo, por lo que se necesitan nuevos métodos de diagnóstico y pronóstico²⁹.

El marcador tumoral serológico más utilizado actualmente es el antígeno carcinogénico 125 (**CA 125**), que es una glicoproteína de alto peso molecular producida por las células mesoteliales que bordean las cavidades peritoneal, pleural y pericardial. Se emplea en la detección temprana, monitorización y pronóstico de la enfermedad. Más del 80% de los cánceres de ovario epiteliales expresan niveles elevados de CA 125 en suero (>35U/mL), aunque este porcentaje se reduce al 50-60% cuando nos referimos a un tumor en estadio I, es decir, localizado en el ovario. Otro problema propio de este marcador es su especificidad, ya que puede verse aumentado en condiciones ginecológicas y patológicas benignas, así como en otros tipos de cáncer.

Debido a su limitada sensibilidad y especificidad, el CA 125 suele combinarse con otros marcadores tumorales, como la proteína 4 del epidídimo humano (**HE4**). Esta proteína pertenece a la familia de las seroproteínas ácidas nucleares de cuatro enlaces disulfuro. Se expresa en bajas dosis en los epitelios de los tejidos respiratorio y reproductivo (incluyendo el ovárico), y en altos niveles en el tejido de cáncer ovárico. Utilizado como único marcador, HE4 es el marcador tumoral más sensible para detectar el cáncer de ovario, especialmente en estadio I.

La sensibilidad más alta, con una especificidad del 95%, se obtiene al combinar ambos marcadores. Las concentraciones de HE4 se correlacionan además con la respuesta clínica al tratamiento y con la gravedad de las recidivas²⁹.

2. MARCADORES TUMORALES: PERSPECTIVAS FUTURAS

Los marcadores tumorales ya se han convertido en una herramienta eficaz para el diagnóstico, seguimiento y detección de recidivas en muchos tipos de cáncer. Sin embargo, sus limitaciones llevan a los científicos a continuar investigando para identificar nuevas moléculas que constituyan marcadores de mayor utilidad terapéutica, con una especificidad y sensibilidad más altas y que se asemejen lo máximo posible al marcador tumoral ideal. Incluso hay muchos proyectos de investigación encaminados a la búsqueda de marcadores tumorales que permitan hacer un seguimiento personalizado

ya que corresponden a moléculas presentes en un tipo de cáncer en un paciente determinado. De los resultados de todos estos proyectos hay muchas conclusiones posibles planteadas, pero en el presente trabajo me voy a centrar solamente en la descripción del material genético circulante por su gran novedad y posible relevancia.

2.1. Micro RNAs como marcadores tumorales

Los microRNAs (miRNAs) son RNAs no codificantes de 21-25 nucleótidos de longitud que regulan la expresión genética a nivel post-transcripcional de forma negativa, es decir, interaccionan con sus RNAs mensajeros diana produciendo su degradación o inhibiendo la translación. Se ha visto que los niveles de expresión de muchos miRNAs (miRNAs oncológicos) están alterados cuando hay un cáncer, por lo que presentan gran potencial como marcadores tumorales. Estos miRNAs oncológicos pueden detectarse en circulación además de en tejido tumoral, lo que supone una gran ventaja. Tienen también capacidad para establecer subclasificaciones de tumores y monitorizar los efectos de las terapias.

Está bien establecido que los miRNAs son reguladores críticos de la expresión global de RNA en procesos biológicos normales y anormales, incluyendo el cáncer. La desregulación de miRNAs se asocia a la iniciación del tumor, la resistencia a fármacos y a la aparición de metástasis.

Por lo tanto, las estrategias terapéuticas basadas en modular los niveles de expresión de los miRNAs e identificar sus RNAs diana constituyen logros prometedores en el tratamiento del cáncer. Recientemente se ha establecido que los miRNAs son secretados por exosomas y están presentes en varios fluidos corporales. Resulta de gran interés la diferencia entre las cantidades de miRNA circulantes entre pacientes con cáncer e individuos sanos³⁷.

Varios estudios han sugerido que los miRNAs están implicados en la iniciación del tumor a través de la regulación de las propiedades de las células cancerosas, incluyendo la habilidad de auto renovación, tumorigenicidad y resistencia a los fármacos.

Un solo miRNA es capaz de manipular la expresión genética de múltiples genes, iniciando rutas de señalización y modificando las mismas. Es por ello que estas pequeñas moléculas pueden regular procesos celulares fundamentales como son la proliferación celular, apoptosis, diferenciación y migración. Estas capacidades les dotan de un alto potencial para funcionar como oncogenes y también como genes supresores de tumores, según los RNAs mensajeros diana que tengan.

Durante los últimos años han emergido aplicaciones clave de los miRNAs circulantes, entre las que se incluyen:

- Detección temprana. Distinción de individuos sanos y diferenciación entre cáncer y otras patologías. Por ejemplo existen miRNAs (miR-29a y miR-92a) que permiten distinguir pacientes sanos de pacientes con cáncer de pulmón, y el cáncer de pulmón del cáncer de estómago y otras patologías. En cáncer de páncreas también se han encontrado miRNAs específicos.
- Seguimiento post-operatorio y evaluación de la quimioterapia adyuvante. Se utiliza el miR-195 en el cáncer de mama y el miRNA-106 en cáncer gástrico. En el cáncer de mama se ha estudiado la medición de la desregulación del miR-29a, miR-181a y miR-652 sangre, ofreciendo resultados prometedores³⁸.
- Valoración del pronóstico. Los niveles de los miRNAs miR-1, miR-30d, miR-486 y miR-499 se asociaron a la supervivencia en enfermos de cáncer de pulmón. En el pronóstico del cáncer colorrectal se emplean miR-21 y miR-106a. Se han investigado el clúster miR-143/145 como marcador útil en el pronóstico y la estimación de la supervivencia en cáncer de vejiga³⁶.

La expresión aumentada de miRNAs en un amplio rango de patologías y su significado en la carcinogénesis ha empujado a los investigadores a centrarse en la perfilación de los miRNAs en diferentes tipos de tumores. Una ventaja clave con respecto a su potencial como biomarcadores es su estabilidad: los miRNAs libres en los fluidos corporales son estables incluso tras varios ciclos de congelación-descongelación y almacenamiento prolongado. También pueden preservarse bien en tejido fijado con parafina o formol durante varios años, lo que ofrece enormes posibilidades de realizar análisis moleculares retrospectivos en estudios con muestras grandes³⁹.

2.2. Análisis del DNA circulante: biopsia líquida

En 1948 se describió la presencia de DNA fragmentado en el torrente sanguíneo. La utilidad clínica de este DNA circulante en suero y plasma ha sido objeto de investigación desde que en la década de los noventa se detectaron fragmentos del gen RAS mutado y alteraciones de los microsatélites en el DNA circulante de pacientes con cáncer. Se comprobó que este DNA está presente en la sangre a niveles estables que pueden sufrir incrementos drásticos en caso de daño celular o necrosis. En general, las concentraciones de DNA circulante se encuentran más elevadas en pacientes con cáncer que en individuos sanos, y son aún mayores en caso de metástasis. Esto se explica porque a medida que el tumor aumenta en volumen, se incrementa también el recambio

celular, y por tanto el número de células apoptóticas o necróticas que liberan fragmentos de DNA. Una fracción de estos fragmentos proceden directamente del tumor: entre un 0,01% y más del 90% según su estadio y la historia clínica del paciente.

En el campo de la oncología, la detección del DNA circulante procedente de tumores (ctDNA) ha supuesto un desafío por tres razones principales: la discriminación de este ctDNA del DNA circulante normal; la presencia de ctDNA en ocasiones en concentraciones extremadamente bajas; y la cuantificación adecuada del número de fragmentos mutados en la muestra.

En los últimos años, nuestra habilidad para analizar DNA circulante ha aumentado rápidamente, gracias al desarrollo de tecnologías que hacen posible la detección de alelos mutantes con gran precisión y especificidad.

La distinción entre ctDNA y DNA circulante normal se basa en la presencia de mutaciones en el primero. Habitualmente éstas son sustituciones en pares de bases que sólo se dan en las células precancerosas o cancerosas del individuo, hecho que permite clasificar el ctDNA como marcador tumoral.

Con las nuevas tecnologías genómicas digitales y la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) actualizada con otras técnicas que utilizan secuenciación de próxima generación (NGS) se ha conseguido detectar mutaciones puntuales, y actualmente múltiples genes de interés pueden ser analizados en una muestra.

Esta capacidad de detectar y cuantificar ctDNA ha abierto las puertas a una gran cantidad de aplicaciones clínicas que no son posibles con la secuenciación de rutina del tejido tumoral o con otros marcadores tumorales serológicos^{32,33,34}.

Ventajas de la biopsia líquida frente a la biopsia tisular

El análisis de tejido tumoral, aunque actualmente es el estándar en la práctica clínica, presenta inconvenientes tales como alto coste y ser una técnica invasiva que causa incomodidad, en ocasiones es difícil de obtener y no está libre de complicaciones. Otro problema de las biopsias tisulares es la heterogeneidad celular dentro del propio tumor, puesto que la muestra variará sustancialmente según la zona biopsiada. Todas estas dificultades podrían ser subsanadas empleando la biopsia líquida.

La sensibilidad de esta técnica depende del estadio del tumor así como el nivel de micrometástasis, alcanzando el 100% en los tumores de estadio IV. La sensibilidad está técnicamente limitada por la tasa de error de la DNA polimerasa, establecida en el 0,01%. Por tanto, si la muestra contiene menos de este porcentaje de ctDNA se considera negativa³³.

Monitorización de la enfermedad y detección de recidivas

Existen claras ventajas en la medición del ctDNA como marcador de la dinámica del tumor sobre los marcadores tumorales o los estudios de imagen. En primer lugar, tiene una vida media muy corta (de unas 2 horas), lo que permite la evaluación de cambios en el tumor en horas en lugar de en semanas o meses. Además, es enormemente específico puesto que sólo puede encontrarse en sangre cuando hay un cáncer en el organismo, no viéndose elevado en otras situaciones patológicas como sucedía con otros marcadores serológicos.

Numerosos estudios en cáncer de mama, colon, ovario y melanoma han demostrado que se produce un rápido incremento de ctDNA sanguíneo con la progresión de la enfermedad y la correspondiente disminución de los niveles tras un tratamiento exitoso. Las aplicaciones clínicas potenciales de esta tecnología incluyen la monitorización de la respuesta del tumor a la terapia y la predicción de la respuesta al tratamiento en tiempo real que permite la modificación del régimen de tratamiento en cuestión de horas. Estas indicaciones aún deben ser evaluadas en ensayos clínicos.

Otra posibilidad que ofrece el análisis del ctDNA es la detección de enfermedad mínima residual tras la cirugía o terapia curativa, determinándose un perfil de mutación del tejido tumoral retirado de cada paciente que más tarde se emplearía en la identificación de ctDNA. En caso de existir enfermedad mínima residual habría que tratar al paciente con quimioterapia adicional para prevenir recurrencias. Su gran sensibilidad podría hacer posible la detección de niveles de ctDNA muy bajos liberados de depósitos micrometastásicos no detectables por imagen ni por otras modalidades diagnósticas^{34,35}.

Monitorización de resistencia molecular

El surgimiento de resistencias clínicas a terapias antineoplásicas antes efectivas se debe a la adquisición de alteraciones moleculares en genes o rutas que rigen su mecanismo de acción. Estudios recientes han revelado que las biopsias líquidas pueden ser eficazmente empleadas para monitorizar el surgimiento de múltiples clones de resistencia durante el curso del tratamiento. Por ejemplo, se ha visto que las mutaciones en el dominio ABL quinasa están implicadas en la adquisición de resistencia al imatinib (fármaco inhibidor de la tirosina quinasa). Más recientemente se ha definido el mecanismo de adquisición de resistencia frente a terapias anti-EGFR en cáncer de pulmón y colorrectal, que se basa en una mutación en el residuo 790 del gen EGFR y pudo detectarse en DNA circulante. Los marcadores genéticos de resistencia pueden rastrearse de manera no invasiva durante el curso de la terapia en cáncer de mama, ovario y pulmón.

La comprensión de los mecanismos de la resistencia adquirida a los agentes seleccionados a nivel molecular puede emplearse para planear tratamientos combinados con fármacos que supriman la expansión de los clones responsables de la mayoría de los fallos de la terapia. Este conocimiento podría resultar en la adopción temprana de terapias alternativas antes de que la resistencia clínica sea detectada³⁴.

Utilidad del DNA circulante en el diagnóstico

Los cambios en la secuencia de DNA, como inserciones o deleciones puntuales, son la clase de variantes más frecuentes asociadas con el desarrollo de tumores sólidos y eventos oncogénicos, como las mutaciones en KRAS, EGFR y BRAF. Estas y otras alteraciones se han detectado con éxito en la circulación de pacientes con cáncer.

Técnicas como el análisis personalizado de terminaciones reordenadas (PARE) y el cariotipo digital utilizando NGS permiten la detección de reordenamientos, amplificaciones y aneuploidías específicas de tumor en la circulación. Lo más destacable en este aspecto es que sería posible llevar a cabo estas técnicas con muestras de sangre, sin necesidad de examinar el tejido tumoral.

Varios estudios han demostrado que los cambios en la metilación presentes en el genoma del tumor también están presentes en los fragmentos de DNA detectados en circulación. Se han adaptado varios procedimientos para detectar fragmentos metilados del DNA extraído del plasma. Éstos presentan el mismo grado de metilación que el tumor en sí, el cual correspondería además con el nivel de carga tumoral. La especificidad general de la medición de DNA metilado es baja comparada con las alteraciones genómicas, probablemente porque la metilación no es un proceso exclusivo del cáncer, sino que también depende de otros factores. Un hecho de gran interés es que se ha visto que a pesar de su baja especificidad, la sensibilidad del ctDNA metilado es mayor en estadios iniciales de la enfermedad, ya que la metilación del DNA es a menudo un evento temprano en la carcinogénesis. Esta característica de la metilación del DNA en el cáncer posee un gran potencial y podría explotarse a fin de constituir una herramienta de cribado para la detección temprana de malignidades^{32,35}.

En conclusión, las biopsias líquidas pueden mejorar la efectividad de la oncología de precisión, con beneficios potenciales tanto para pacientes como sistemas de salud. La investigación sobre biopsias líquidas se ha visto enormemente desarrollada en los últimos 5 años. Sin embargo, ninguno de los numerosos estudios que se han realizado al respecto han demostrado una evidencia definitiva acerca de cómo el análisis del ctDNA sería clínicamente relevante o aplicable. Existe una necesidad de estudios clínicos

controlados, que incluyan un mayor número de pacientes en los cuales las biopsias líquidas se estén empleando para dirigir cuestiones clínicamente relevantes.

CONCLUSIONES

1. En la actualidad se emplean múltiples marcadores tumorales en la práctica clínica que resultan de gran utilidad en el diagnóstico, pronóstico y monitorización del cáncer.
2. Generalmente constituyen una herramienta de apoyo a las técnicas tradicionales, sin haberlas llegado a desbancar.
3. El principal problema de los marcadores tumorales es que presentan limitaciones difíciles de solventar, destacando la baja especificidad.
4. El análisis del material genético circulante (miRNAs y DNA tumoral) solventaría estas limitaciones, presentando potencial para sustituir las biopsias tisulares tradicionales y conseguir un diagnóstico precoz de múltiples tumores.

Conclusión general global: A pesar de que se requiere un mayor número de estudios, podemos concluir que los marcadores tumorales en general, y las biopsias líquidas en particular pueden ser la clave para reducir drásticamente la mortalidad por cáncer a escala mundial, disminuyendo en un futuro cercano los efectos de la segunda enfermedad que más muertes produce anualmente en nuestros días.

Agradecimientos: Se agradece a la Dra. T. Caldes (Hospital Clínico S. Carlos) la información aportada sobre biopsia líquida.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/es/
2. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/es/index2.html
3. R. D. Neal y cols (2015) Is increased time to diagnosis and treatment in symptomatic cancer associated with poorer outcomes? Systematic review. *British Journal of Cancer* 112, S92.
4. www.cancer.gov/cancertopics/diagnosis-staging/diagnosis/tumor-markers-fact-sheet
5. Brinkmann K, Schell M, Hoppe T, Kashkar H. (2015) Regulation of the DNA damage response by ubiquitin conjugation. *Front Genet.* 2015 Mar 10;6:98
6. Carlos López-Otín (2009) Cáncer, genes y genomas. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina. Instituto Universitario de Oncología, Universidad de Oviedo.
7. Hernández MH (1999) Oncogenes y Cáncer. *Rev Cubana Oncol* 1999;15(2):131-9
bvs.sld.cu/revistas/onc/vol15_2_99/onc09299.pdf
8. Mandal A (2015) Cancer Diagnosis. *News Medical.* 2015.
9. Donepudi MS, et al. (2014) Breast Cancer Statistics and Markers. *Journal of Cancer Res Therap* (2014) 10(3): 506-511.
10. McShane LM, et al. (2005) REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK). *British Journal of Cancer* (2005)93, 387–391.
11. Arias E, et al. (2009) CA 15-3 elevado en el seguimiento de un paciente con neoplasias de mama y tiroides. Hospital General Docente "Dr. Juan Bruno Zayas Alfonso", Santiago de Cuba.
12. Sharma S (2009) Tumor markers in clinical practice: General principles and guidelines. *Indian J Med Paediatr Oncol.* 2009 Jan-Mar, 30(1): 1-8.
13. Pons-Anicet DMF, et al. (1987) Value of CA 15:3 in the follow-up of breast cancer patients. *British Journal of Cancer* (1987) 55, 567–569.
14. www.labtestsonline.es/tests/CA15_3.html?tab=3

15. Utrillas-Martínez AC, et al. (2003)¿Resultan útiles los marcadores tumorales CEA y CA 15.3 en el seguimiento del cáncer de mama? Revisión de 196 casos. *Cirugía Española*. 20:74(3).
16. Crosbie PA, et al. (2013) Prognostic and predictive biomarkers in early stage NSCLC: CTCs and serum/plasma markers. *Transl Lung Cancer Res*. 2013 Oct; 2(5): 382-397.
17. Roh MS, et al. (2014) Molecular Pathology of Lung Cancer: Current Status and Future Directions. *Tuberc Respir Dis*. 2014 Aug; 77(2): 49-54.
18. Kozu Y, et al. Prognostic Significance of Postoperative Serum Carcinoembryonic Antigen Levels in Patients With Completely Resected Pathological-stage I Non-small Cell Lung Cancer. *J Cardiothorac Surg* 2013;8:106
19. Huang YQ, et al. (2014) Clinical performance of serum [-2] proPSA derivatives, %p2PSA and PHI, in the detection and management of prostate cancer. *Am J Clin Exp Urol*. 2014;2(4): 343-350.
20. Esfahani M, et al. (2015) Biomarker for Evaluation of Prostate Cancer Prognosis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(7):2601-2611.
21. Dong Y, et al. (2014) MicroRNA Dysregulation as a prognostic Biomarker in Colorectal Cancer. *Cancer Manag Res*. 2014;6:405-422.
22. Swiderska M (2013) The diagnostics of Colorectal Cancer. *Contemp Oncol (Ponz)*. 2014; 18(1): 1-6.
23. Mishaeli M, et al. (2010) Initial TPS serum level as an indicator of relapse and survival in colorectal cancer. *Anticancer Res*. 1998;18:2101–6
24. Szajda SD, et al. (2009) N-acetylo-β-D-hexosaminidase and its isoenzymes A and B in Blood Serum and Urine, as a Potential Colon Cancer Markers. *Hepatogastroenterology*. 2009;56:1286–90.
25. Tanaka T, et al. (2010) Biomarkers for Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2010; 11(9): 3225.
26. Soudeh GF, et al. (2014) Bladder Cancer Biomarkers: Review and Update. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15 (6), 2395-2403
27. Smith LZ y Guzzo JT (2013) Urinary Markers for Bladder Cancer. *F1000PrimeRep*. 5:21.
28. Urinary Tumor Markers for Bladder Cancer (2014) BlueShield of North Carolina.
29. Banno K, et al. (2014) Application of MicroRNA in Diagnosis and Treatment of Ovarian Cancer. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:232817.
30. www.cibic.com.ar/medicos/he4-proteina-4-del-epididimo-humano
31. Moore RG, et al. (2010) Current state of biomarker development for clinical application in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2010 Feb; 116(2): 240-245.
32. Diaz AL and Bardelli A (2014) Liquid biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA. *Journal of Clin Oncol*. 2014: 32:6.
33. Siravegna G and Bardelli A (2014) Genotyping Cell-free Tumor DNA in the Blood to Detect Residual Disease and Drug Resistance. *Genome Biology*. 2014, 15:449.
34. White D, et al. (2014) A novel method for efficient and hands-free Purification of Circulating DNA from Human Plasma. *Promega* 2014.
35. Murtaza M, et al. (2014) Non-invasive Analysis of Acquired Resistance to Cancer Therapy by Sequencing of Plasma DNA. *Nature*. 2014, 12065.
36. Avgeris M, et al. (2015) Uncovering the clinical utility of miR-143, miR-145 and miR-224 for predicting the survival of bladder cancer patients following treatment. *Carcinogenesis*. 2015 May;36(5):528-37.
37. Yang C, et al. (2015) MicroRNAs: Emerging Novel Targets of Cancer Therapies. *Biomed Res Int*. 2015: 506323.
38. McDermott AM, et al. (2014) Identification and Validation of Oncologic miRNA Biomarkers for Luminal A-like Breast Cancer. *PLOS One*. 2014; 9(1): e87032.
39. Berger F, Reiser MF (2013) Micro-RNAs as Potential New Molecular Biomarkers in Oncology: Have They Reached Relevance for the Clinical Imaging Sciences? *Theranostics*. 2013; 3(12): 943-952.
40. Dong Y, et al. (2015) The Diagnostic Value of ¹⁸F-FDG PET/CT in Association with Serum Tumor Marker Assays in Breast Cancer Recurrence and Metastasis. *Biomed Res Int*. 2015.
41. www.seom.org