

CA15.3 sérico y proliferación celular en carcinomas ductales infiltrantes de mama

A. RUIBAL^a, A. SÁNCHEZ SALMÓN^a, M. GARRIDO^a, A. BOGDAN CIOBOTARU^a Y J.I. ARIAS^b

^aServicio de Medicina Nuclear. Hospital Clínico Universitario. Facultad de Medicina. Santiago de Compostela. España.

^bServicio de Cirugía General. Hospital Monte del Naranco. Oviedo. España.

Resumen.—*Objetivo.* Estudiar la posible correlación entre las concentraciones séricas preoperatorias de CA15.3 y la proliferación celular medida por la fase de síntesis (FS) en carcinomas ductales infiltrantes de mama (CDI).

Material y métodos. El grupo estudio incluyó 79 pacientes de edades comprendidas entre los 39 y 86 años ($64,8 \pm 11,8$). La ploidía y FS fueron determinadas por citometría de flujo en muestras en fresco (Fascam. Beckton Dickinson. EE.UU.).

Resultados. Tomando como dintel de positividad para la FS el valor de 7 %, que representa la mediana obtenida previamente en un grupo de 321 CDI (i: 0,8-51,2; $9,3 \pm 7,9$; percentiles 25 y 75; 4,3 y 11,8 %), observamos que las concentraciones del marcador fueron mayores ($p: 0,015$) en los casos con menor proliferación celular. Esto mismo se constató al valorar cualitativamente (> 30 U/ml) el marcador. Asimismo, las concentraciones de CA15.3 aumentaron significativamente ($p = 0,007$) al pasar la FS de $< 4,3\%$ a FS comprendida entre 4,3 y 7,1 %, para luego descender ($p = 0,010$) en los casos con FS entre 7,11 y 11,8 % y no modificarse cuando aquella fue $> 11,8\%$. Este mismo comportamiento lo observamos en los tumores sin afectación axilar.

Conclusiones. a) La liberación del CA15.3 ocurre cuando la FS se incrementa hasta alcanzar el valor del 7,1 %, para luego ir disminuyendo aunque aquella aumente, y b) este mismo comportamiento del marcador con la fase S se constató cuantitativamente en los tumores aneuploides y sin afectación axilar.

PALABRAS CLAVE: CA15.3 sérico, proliferación celular, fase S, carcinoma ductal infiltrante, mama.

PREOPERATIVE CA15.3 SERUM LEVELS AND CELLULAR PROLIFERATION IN PATIENTS HAVING INFILTRATING DUCTAL CARCINOMAS OF THE BREAST

Abstract.—*Objective.* To study the possible correlations between the preoperative CA15.3 serum levels and the cellular proliferation, measured by S-phase (SP), in patients having infiltrating ductal carcinomas (IDC) of the breast

Material and methods. The study group included 79 patients with an age ranged between 39 and 86 yrs ($64,8 \pm 11,8$).

Ploidy and S-phase were measured by cytometry (Fascam. Beckton Dickinson. USA) in fresh samples

Results: Using as cut-off for SP the value of 7%, which represents the median obtained previously in 321 patients with IDC (r: 0,8-51,2; $9,3 \pm 7,9$; percentiles 25 y 75; 4,3 y 11,8 %), we can observed that the antigenic levels were higher ($p:0,015$) in the tumors with low SP. These same behavior was noted when 30U/ml was used as cut-off for CA15.3. Likewise, the levels of the tumor marker increased significantly ($p:0,007$) when the SP moved from $< 4,3\%$ to 7,1 %, to decrease later ($p:0,010$) when the SP value was comprised between 7,11 % and 11,8 %. The same behavior of this tumor marker in relation to the SP was noted in tumors without axillary involvement tumors, as well as in aneuploid carcinomas.

Conclusion: a) Release of CA15.3 happens when SP increases to rise the 7,1 % value, to decrease later although that goes on increasing, and b) The same behaviour of this marker with the S-phase was observed in tumors without axillary involvement, as well as in aneuploid carcinomas.

KEY WORDS: serum CA15.3, cellular proliferation, S-phase, infiltrating ductal carcinoma, breast.

INTRODUCCIÓN

El CA15.3 (MUC1) es un marcador tumoral ampliamente utilizado desde hace años en la clínica diaria¹. Si bien su principal aplicación radica en el seguimiento del cáncer de mama², pueden observarse elevaciones séricas del mismo en otros tumores³, situaciones no malignas⁴ y tras acciones farmacológicas⁵. Asimismo, puede detectarse no sólo en la sangre, sino en otros líquidos biológicos, entre los que podemos citar los de quistes de la mama⁶. En los tumores mamarios, sus concentraciones séricas preoperatorias se relacionan con el tamaño del tumor, la afectación ganglionar axilar, metástasis a distancia y grado histológico⁷⁻⁹ y se comportan, además y tras análisis multivariado, como un factor pronóstico independiente del intervalo libre de enfermedad, tanto en el grupo considerado globalmente, como en los tumores con axila positiva¹⁰. Su relación con la hormo-

Recibido: 29-05-07.

Aceptado: 19-07-07.

Correspondencia:

A. RUIBAL.
Servicio de Medicina Nuclear.
Hospital Clínico Universitario.
15706 Santiago de Compostela. España.
Correo electrónico: alvaro.ruibal.morell@sergas.es

nodependencia no es unánime. También el CA15.3 sérico es un indicador de una peor respuesta a la quimioterapia, y junto a la invasión linfovascular y la expresión del oncogen *erbB2*, se comporta como un factor pronóstico en los cánceres de mama localmente avanzados¹¹.

La MUC1, mucina epitelial polimórfica humana, es una proteína transmembrana altamente glucosilada, con funciones protectoras, que se sobreexpresa de un modo aberrante en muchos tumores, entre ellos en un alto porcentaje de los de origen mamario. Por ello es considerada un antígeno asociado a tumores. Se comporta como una oncoproteína y su mayor expresión celular se correlaciona con la agresividad de los tumores y con una menor supervivencia. También parece ejercer un importante papel en la transición hiperplasia ductal-carcinoma *in situ*¹². A nivel biológico se ha visto que muchas de sus acciones se llevan a cabo mediante mecanismos bioquímicos relacionados con su dominio citoplasmático. Así, interviene en la proliferación, apoptosis, invasión y transcripción celular, correlacionándose directamente con los genes del factor de necrosis tumoral (TNF), quinasa serina/treonina RAF1 y la metaloproteasa de matriz 2 (MMP2). A nivel proteico se relaciona con el gen *c-myc* y la AKt fosforilada^{13,14}. Su fragmento C-terminal interacciona con el receptor de estrógenos alfa, siendo este hecho estimulado por el estradiol, lo que induce el crecimiento y supervivencia de las células tumorales¹⁵. Asimismo, inhibe la agregación celular mediada por la caderina E y la acción citotóxica de las células K¹⁶⁻¹⁸. Algunas variantes modulan la localización de ciertos receptores de factores de crecimiento, lo que conlleva una respuesta diferente a estímulos externos¹⁹.

Continuando nuestra línea de trabajo⁸, y dado lo anteriormente expuesto, hemos querido analizar en mujeres afectas de carcinoma ductal infiltrante de mama el comportamiento del CA15.3 sérico en función de la proliferación celular del tumor primitivo, medido por la fase de síntesis celular (FS).

MATERIAL Y MÉTODOS

El grupo de estudio incluyó 79 pacientes afectas de carcinomas ductales infiltrantes de mama, sin tratamientos previos y de edades comprendidas entre los 39 y 86 años ($64,8 \pm 11,8$; mediana 66), en las que pudimos realizar una determinación sérica preoperatoria

de CA15.3. Éste fue determinado mediante un método inmuno-radiométrico doble monoclonal de CIS. BioInternational (Francia). La ploidía y FS fueron determinadas por citometría de flujo en muestras en fresco (Fascam. Beckton Dickinson. EE.UU.). El tejido fue triturado con unas tijeras para obtener una dispersión celular, y luego filtrado a través de una malla con poros de 100A, con la finalidad de separar los núcleos del estroma tumoral. Los núcleos se resuspendieron en tampón citrato y se congelaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de realizarse la determinación por la técnica de Hedley. La tinción del DNA se realizó con yoduro de propidio con fluoresceína, que se une estequiométricamente a los ácidos nucleicos. Para evitar la unión con el ARN se añadió a la muestra ARNsas, y también un enzima proteolítico con la finalidad de romper las membranas celulares y las fibras del estroma. La lectura se verificó en un citómetro de flujo (Becton Dickinson, EE.UU.) y un programa (Cellfit) con varios modelos, utilizándose el RFITT y el POLY en nuestro caso. La cantidad de fluoresceína que emite el yoduro de propidio por célula es proporcional a la cantidad de ADN. Se consideró un patrón diploide cuando el contenido de ADN fue igual al del control normal (linfocitos) y patrón aneuploide cuando era diferente de aquél. Se obtuvo también el porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular, utilizando en nuestro estudio las de síntesis o fase S. Más detalles técnicos y analíticos han sido expuestos en otro estudio²⁰. Dado que los resultados obtenidos no seguían una distribución normal, hemos empleado tests estadísticos no paramétricos (Mann Whitney) y el del Chi cuadrado, con la corrección de Yates cuando fue necesaria para la comparación de proporciones. Una diferencia se consideró estadística cuando el valor de *p* fue inferior a 0,05.

RESULTADOS

Tal como se observa en la tabla 1 las concentraciones de CA15.3 sérico no difirieron estadísticamente entre los tumores diploides y aneuploides. Cuando analizamos la influencia de la fase de síntesis celular, tomando como dintel de positividad el valor de 7 % que representa la mediana obtenida previamente en un grupo de 321 carcinomas ductales infiltrantes (*i*: 0,8-51,2; $9,3 \pm 7,9$; percentiles 25 y 75; 4,3 y 11,8 %), pudimos observar que las concentraciones del CA15.3 sérico fueron mayores ($p = 0,015$) en los

casos con menor proliferación celular. Al considerar el dintel de positividad de 30 U/ml para el CA15.3 sérico, observamos el mismo comportamiento (tabla 2).

En un intento por profundizar en la fase de síntesis analizamos las concentraciones séricas del CA15.3 en función de los valores de aquélla. Tal como se puede observar en la tabla 3 las concentraciones del marcador tumoral se incrementaron significativamente ($p = 0,007$) en los tumores con FS entre el 4,3 y el 7,1 % frente a los de FS < 4,3 %, para luego disminuir ($p = 0,010$) en los casos con FS comprendida entre 7,11 y 11,8 % y no diferir cuando la fase de síntesis fue > 11,8 %. Este mismo comportamiento se constató cuantitativamente en los tumores aneuploides, y cualitativamente y cuantitativamente en los casos sin afectación ganglionar axilar (tabla 4).

DISCUSIÓN

En los últimos años empezamos a conocer algunas funciones biológicas de muchos marcadores tumorales séricos ampliamente utilizados en la clínica diaria. Uno de ellos es el CA15.3, que define la mucina MUC1, glucoproteína (50 % de hidratos de carbono) transmembrana, localizada en la superficie apical celular a quien protege y que se expresa anómalamente en muchos tumores. La MUC1 interviene en diferentes funciones biológicas y se relaciona, en ciertas líneas celulares de cáncer de mama, con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), de tal forma que la activación del receptor fosforila el dominio citoplasmático de la mucina y potencia su unión a la beta catenina. Otros factores que intervienen en la regulación de la MUC1 son la proteinquinasa C delta y la interleucina 7. Se ha visto que la MUC-1 actúa como un oncogén, favoreciendo la transformación tu-

Tabla 1
DISTRIBUCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS PREOPERATORIAS DE CA15.3 (U/mL) EN LOS CARCINOMAS DUCTALES INFILTRANTES DE MAMA CLASIFICADOS EN FUNCIÓN DE LA PLOIDÍA Y FASE DE SÍNTESIS CELULAR

Parámetro	N.º	Intervalo	Mediana	p
FS > 7	38	6,3-161	20,0	0,015
FS ≤ 7	41	10-106	23	
Diploide	33	6,3-10	23	ns
Aneuploide	46	8,34-161	20	

FS: fase de síntesis celular; ns: no significativo.

Tabla 2
CONCENTRACIONES DE CA15.3 SÉRICO PREOPERATORIO > 30 U/mL EN LOS CARCINOMAS DUCTALES INFILTRANTES DE MAMA CLASIFICADOS EN FUNCIÓN LA PLOIDÍA Y FASE S

Parámetro	> 30	p
FS > 7	5/38	0,005
FS ≤ 7	17/41	
Diploide	97/33	ns
Aneuploide	10/46	

FS: fase de síntesis celular; ns: no significativo.

moral, y sabemos que está involucrada en la regulación de la transcripción a través del factor NF-kappa B, así como en el bloqueo de la beta catenina²¹. En las células transformadas la MUC1 impide la diferenciación y función de las células dendríticas y favorece la ineficacia del sistema inmune. Su localización intracelular aberrante en las células tumorales se correlaciona con un peor pronóstico y una mayor agresividad tumoral. La sobreexpresión de las proteínas MUC1 se asocia con un mayor comportamiento metastático, y ello es consecuencia del patrón genético modulado por ciertos polimorfismos²². También estudios *in vi-*

Tabla 3
DISTRIBUCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS PREOPERATORIAS DE CA15.3 (U/mL) EN LOS CARCINOMAS DUCTALES INFILTRANTES DE MAMA CLASIFICADOS EN FUNCIÓN DE LOS VALORES DE FASE DE SÍNTESIS CELULAR

Fase S	N.º	Intervalo	Media ± DE	Mediana	> 30 (U/ml)	> 40 (U/ml)
< 4,3 %	21	10-37	21,0 ± 7,0 p = 0,007	22	1 p < 0,001	0 p = 0,005
4,3-7,1 %	20	10-106	38,5 ± 28,2 p = 0,010	31,5	11 p = 0,009	7 p = 0,074
7,11-11,8	13	9-54,8	21,6 ± 11,7 ns	25	1 ns	1 ns
> 11,8 %	23	6,3-161	25,3 ± 20	20	2	2

Fase S: fase de síntesis celular; DE: desviación estándar; ns: no significativo.

Tabla 4
CONCENTRACIONES DE CA15.3 SÉRICO Y PORCENTAJE DE POSITIVIDADES (DINTEL 30 U/ml) EN LOS CARCINOMAS DUCTALES INFILTRANTES DE MAMA CLASIFICADOS EN FUNCIÓN DE LA PLOIDÍA, FASE DE SÍNTESIS CELULAR Y AFECTACIÓN GANGLIONAR AXILAR

Parámetros	> 30 U/ml	p	Intervalo	Mediana	p
D + FS > 7 %	1/8	ns	6,3-54,8	23,5	ns
D + FS ≤ 7 %	5/23		10-106	23,0	
A + FS > 7 %	4/28	ns	8,3-161	17,0	0,023
A + FS ≤ 7 %	6/16		10-98	24,5	
N - /FS > 7 %	2/20	ns	6,3-42	20,0	0,022
N - /FS ≤ 7 %	7/21		10-45	25,0	
N + /FS > 7 %	3/18	ns	11-161	19,0	ns
N + /FS ≤ 7 %	5/20		10-106	23,0	

D: diploides; A: aneuploides; N-: sin afectación ganglionar axilar; N + : con afectación ganglionar axilar; FS: fase de síntesis celular.

tro han demostrado que el estradiol duplica la expresión de MUC1 en la línea de cáncer de mama hormono-dependiente MCF7, así como su pase al medio de cultivo en la misma proporción, mientras que el tamoxifen tuvo poco efecto inhibitorio. En las líneas hormonoindependientes, el PMA (forbol-12-miristato-13-acetato) también estimula la síntesis y liberación de la MUC1, siendo abolido este efecto por inhibidores específicos de la proteinquinasa C^{22,23}.

En nuestro estudio no se constataron diferencias en los valores séricos del CA15.3 cuando la ploidía (diploide frente a aneuploide) fue considerada, pero sí con la proliferación celular medida a través de la FS. En contra de lo que cabría esperar fueron los tumores menos proliferativos (FS < 7 %) los que mostraron mayores concentraciones del marcador, y lo mismo ocurrió cuando realizamos una valoración cualitativa, tomando como dintel el valor de 30 U/ml. Este hallazgo nos indujo a estudiar las concentraciones del CA15.3 en los tumores clasificados en función de la fase S, tomando como dinteles la mediana (7 %) y los percentiles 25 (4,3 %) y 75 (11,8 %) obtenidos previamente en un grupo de 321 carcinomas ductales infiltrantes de mama. Pudimos ver que las concentraciones de CA15.3 aumentaron significativamente cuando la fase S pasó de < 4,3 % a la comprendida entre 4,3 y 7,1 %, para luego descender cuando estuvo comprendida entre 7,1 y 11,8 y mantenerse en los casos > 11,8 %. Este mismo patrón de compor-

tamiento lo observamos al considerar la positividad del marcador (dintel 30 U/ml). Parece pues que la síntesis y liberación del marcador se produce cuando la proliferación celular se incrementa moderadamente, para luego reducirse conforme aquélla avanza. Otra posibilidad es que el CA15.3 fuera sintetizado, pero no liberando desde la superficie celular. Estos hechos no están en contradicción con lo observado por otros autores en carcinomas colorrectales²⁴, y en fibroblastos humanos, donde Oshimo S et al²⁵ observaron que la KL-6, una mucina MUC1, potenciaba la proliferación e inhibía la apoptosis de los mismos, lo cual es de gran interés fisiopatológico. Este comportamiento del CA15.3 sérico difirió del de la citoqueratina 19 (cyfra 21.1), ligado a la apoptosis celular como otras queratinas²⁶.

Hemos dicho anteriormente que no existían diferencias en las concentraciones séricas de CA15.3 entre tumores diploides y aneuploides. Cuando clasificamos los CDI en función de la ploidía y fase S, pudimos ver que, cuantitativamente, los tumores aneuploides con baja fase S (< 7 %) cursaban significativamente con mayores concentraciones del antígeno. Al considerar la afectación ganglionar axilar, vimos que en ausencia de ésta los tumores con fase S < 7 % cursaban cualitativamente y cuantitativamente con mayores concentraciones del marcador, mientras que en presencia de la afectación axilar no se evidenciaron diferencias, lo cual sugiere que las elevaciones del antígeno están ligadas a la diseminación regional, pero no a la proliferación celular. Este comportamiento del CA15.3 no se apreció con el antígeno carcinoembrionario (CEA) (datos no mostrados).

Nuestros resultados nos inducen a las siguientes consideraciones:

1. La liberación del CA15.3 ocurre cuando los porcentajes de la FS se incrementan hasta alcanzar el valor del 7,1 %, para luego ir disminuyendo aunque la proliferación siga aumentando.
2. Este mismo comportamiento del marcador en función de la fase S se constató en los tumores aneuploides y sin afectación ganglionar axilar.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ruibal A. El CA15.3, marcador del cáncer de mama. Med Clin (Barc). 1988;91:341-3.
2. Colomer R, Ruibal A, Genollá J, Rubio D, del Campo JM, Boda R, et al. Circulating CA15.3 levels in the postsurgical follow-up

- of breast cancer patients and in non malignant diseases. *Breast Cancer Res Treat.* 1989;13:123-33.
3. Colomer R, Ruibal A, Genolla J, Salvador L. Circulating CA15.3 antigen levels in non-mammary malignancies. *Br J Cancer.* 1989;59:283-6.
 4. Ruibal A, Encabo G, Genollá J, Guarga A, Urrutia A, Colomer R. Serum CA15.3 levels in patients with general pathology and malignant diseases (excluding breast cancer). *Bull Cancer.* 1986;73:94-5.
 5. Pentheroudakis G, Malamou-Mitsi V, Briasoulis E, Damala K, Vassou A, Vartholomatos G, et al. The neutrophil, not the tumor: serum CA15-3 elevation as a result of granulocyte-colony stimulating factor induced neutrophil MUC1 overexpression and neutrophilia in patients with breast carcinoma receiving adjuvant chemotherapy. *Cancer.* 2004;101:1767-75.
 6. Vizoso F, Allende MT, Fueyo A, Vigal G, García Moran M, Ruibal A. CA15.3 behavior in cystic breast disease. *Int J Biol Markers.* 1989;4:181-2.
 7. Lumachi F, Basso SM, Brandes AA, Pagano D, Ermani M. Relationship between tumor markers CEA and CA15.3, TNM staging, estrogen receptor rate and MIB1 index in patients with pT1-2 breast cancer. *Anticancer Res.* 2004;24:3221-4.
 8. Ruibal A, Garrido M, Arias JI. Concentraciones séricas preoperatorias de CA15.3 y CEA y su correlación con los parámetros clínico-biológicos del cáncer de mama. *Rev Esp Med Nucl.* 2006;25:180-3.
 9. Molina R, Jo J, Filella X, Zanón G, Pahisa J, Nuñez M, et al. c-erbB-2 oncoprotein, CEA, and CA 15.3 in patients with breast cancer: prognostic value. *Breast Cancer Res Treat.* 1998;51:109-19.
 10. Martín A, Corte MD, Álvarez AM, Rodríguez JC, Andicoechea A, Bongera M, et al. Prognostic value of pre-operative serum CA15.3 levels in breast cancer. *Anticancer Res.* 2006;26:3965-71.
 11. Al-Azawi D, Kelly G, Myers E, McDermott EW, Hill AD, Duffy MJ, et al. CA15.3 is predictive of response and disease recurrence following treatment in locally advanced breast cancer. *BMV Cancer.* 2006;6:220.
 12. Moomers EC, Leonhart AM, von Mensdorff-Pouilly S, Schol DJ, Hilgers J, Meijer CJ, et al. Aberrant expression of MUC1 mucin in ductal hyperplasia, and ductal carcinoma in situ of the breast. *Int J Cancer.* 1999;84:466-9.
 13. Hatstrup CL, Gendler SJ. MUC1 Alters oncogenic events and transcription in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 2006;8:R37.
 14. Tsutsumida H, Swanson BJ, Singh PK, Caffrey TC, Kitajima S, Goto M, et al. RNA interference suppression of MUC1 reduces the growth rate and metastatic phenotype of human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2006;12:2976-87.
 15. Wei X, Xu H, Kufe D. MUC1 oncoprotein stabilizes and activates estrogen receptor alpha. *Mol Cell.* 2006;21:295-305.
 16. Wwsseling J, van der Valk SW, Vos HL, Sonnenberg A, Hilkens J. Episialin (MUC1) overexpression inhibits integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix components. *J Cell Biol.* 1995;129:255-65.
 17. Heuser C, Ganser M, Hombach A, Brand H, Denton G, Hanish FG, et al. An anti-MUC1 antibody-interleukin 2 fusion protein that activates resting NK cells to lysis of MUC1-positive tumor cells. *Br J Cancer.* 2003;89:1130-9.
 18. Doi M, Yokoyama A, Kondo K, Ohnishi H, Ishikawa N, Hattori N, et al. Anti-tumor effect of the anti-KL-6/MUC1 monoclonal antibody through exposure of surface molecules by MUC1 capping. *Cancer Sci.* 2006;97:420-9.
 19. Carraway KL 3rd, Funes M, Workman HC, Sweeney C. Contribution of membrana mucins to tumor progression through modulation of cellular growth signaling pathways. *Curr Top Dev Biol.* 2007;78:1-22.
 20. Ruibal A, Arias JI, del Río MC, Lapeña G, Schneider J, Tejerina A. Histological grade in breast cancer: association with clinical and biological features in a series of 229 patients. *Int J Biol Markers.* 2001;16:56-61.
 21. Thompson EJ, Shanmugam K, Hatstrup CL, Kotlarczyk KL, Gutiérrez A, Bradley JM, et al. Tyrosines in the MUC1 cytoplasmic tail modulate transcription via the extracellular signal-regulated kinase 1/2 and nuclear factor-kappa B pathways. *Mol Cancer Res.* 2006;4:489-97.
 22. Schmid BC, Buluwela L, Liu Q, Fasching B, Tong D, Stimpfl M, et al. Expression of MUC1 splice variants correlates with invasive growth of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat.* 2002;76:211-9.
 23. Porowska H, Paszkiewicz-Gadek A, Wolczynski S, Gindziński A. MUC1 expression in human breast cancer cells is altered by the factors affecting cell proliferation. *Neoplasma.* 2002;49:104-9.
 24. Kimura T, Tanaka S, Haruma K, Sumii K, Kajiyama G, Shimamoto F, et al. Clinical significance of MUC1 and E-cadherin expression, cellular proliferation and angiogenesis at the deepest invasive portion of colorectal cancer. *Int J Oncol.* 2000;16:55-64.
 25. Ohshimo S, Yokoyama A, Hattori N, Ishikawa N, Hirasawa Y, Kohno N. KL-6, a human MUC1 mucin, promotes proliferation and survival of lung fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;338:1845-52.
 26. Barak V, Goike H, Panaretakis KW, Einarsson R. Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. *Clin Biochem.* 2004;37:529-40.