

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MMP-2 E TGF β -RI EM CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES DE PACIENTES COM CÂNCER DE PÂNCREAS E SUA CORRELAÇÃO COM EVOLUÇÃO CLÍNICA

Evaluating MMP-2 and TGF β -RI expression in circulating tumor cells of pancreatic cancer patients and their correlation with clinical evolution

José Luiz **GASPARINI-JUNIOR**¹, Marcello Ferretti **FANELLI**¹, Emne Ali **ABDALLAH**¹, Ludmilla Thomé Domingos **CHINEN**¹

Como citar este artigo: Gasparini-Junior JL, Fanelli MF, Abdallah EA, Chinen LTD. Avaliação da expressão de MMP-2 e TGF β -RI em células tumorais circulantes de pacientes com câncer de pâncreas e sua correlação com evolução clínica. ABCD Arq Bras Cir Dig. 2019;32(2):e1433. DOI: /10.1590/0102-672020190001e1433

Trabalho realizado no ¹A.C. Camargo Cancer Center, Centro Internacional de Pesquisa, São Paulo, SP, Brasil.

DESCRIPTORIOS - Células neoplásicas circulantes. Neoplasias pancreáticas. Transição epitelial-mesenquimal.

Correspondência:

José Luiz Gasparini-Junior
E-mail: jose.gasparini@accamargo.org.br, josegasparinijr@gmail.com

Fonte de financiamento: Suporte Financeiro: registro #12/01273-8, Fundação de Apoio a Pesquisa de São Paulo (FAPESP)

Conflito de interesse: não há

Recebido para publicação: 01/07/2018

Aceito para publicação: 16/01/2019

HEADINGS - Neoplastic cells, circulating. Pancreatic neoplasms. Epithelial-mesenchymal transition.

RESUMO - Racional: A metástase é comum no diagnóstico de câncer de pâncreas; presença de marcadores de transição epitélio-mesenquimal nas células tumorais circulantes (CTCs) podem sugerir pior prognóstico. **Objetivo:** Correlacionar o número de CTCs no sangue periférico de pacientes com tumor de pâncreas localmente avançado ou metastático e expressão de proteínas envolvidas na transição epitélio-mesenquimal (TEM) nas CTCs com características clínicas, sobrevida livre de progressão (SLP) e global (SG). **Método:** Estudo prospectivo realizado por meio de coletas de sangue periférico em três tempos distintos. As CTCs foram quantificadas pelo sistema ISET e analisadas por imunocitoquímica. Proteínas envolvidas na TEM (vimentina, TGF β -RI e MMP2) foram analisadas em todas as CTCs. **Resultados:** Foram incluídos 21 pacientes. A mediana de CTCs detectadas foi de 22, 20 e 8 CTCs/8 ml de sangue no *baseline*, primeiro e segundo *seguimentos*, respectivamente. Na correlação entre número de CTCs e as características clínicas levantadas, SLP, SG não houve correlação estatisticamente significativa. Nos marcadores de TEM não houve diferença de SLP e SG entre os grupos que apresentaram e não apresentaram marcação. **Conclusão:** As CTCs não se mostraram relevantes na comparação dos achados clínicos, SLP e SG em pacientes com câncer de pâncreas. No entretanto, pode ser que para a análise de marcador seja útil, como observado pelas curvas separadas de expressão de MMP-2 e TGF β -RI nas CTCs.

ABSTRACT - Background: Metastasis is common in the diagnosis of pancreatic cancer, and the presence of epithelial-mesenchymal transition markers in circulating tumor cells may suggest worse prognosis. **Aim:** To correlate the number of circulating tumor cells (CTCs) in the peripheral blood of patients with a locally advanced or metastatic pancreatic tumor and the protein expression involved in epithelial-mesenchymal transition (EMT) in CTCs with clinical characteristics, progression-free survival (PFS) and overall survival (OS). **Method:** This was a prospective study conducted using peripheral blood samples collected at three different times. CTCs were quantified by the ISET test and analyzed by immunocytochemistry. Proteins involved in EMT (vimentin, TGF β -RI and MMP2) were analyzed in all CTCs. **Results:** Twenty-one patients were included. Median CTCs detected were 22, 20 and 8 CTCs/8 ml blood at baseline, first and second follow-up, respectively. No statistically significant correlation was found in correlating the number of CTCs and the evaluated clinical characteristics, PFS, or OS. There was no difference in PFS and OS among the EMT markers in the groups with and without markers. **Conclusion:** CTC analysis was not relevant in this sample for comparing clinical findings, PFS and OS in patients with pancreatic cancer. However, marker analysis in CTCs could be useful for the MMP-2 and/or TGF β -RI expression, as observed by the separate PFS curve.

INTRODUÇÃO

O adenocarcinoma pancreático é doença de alta agressividade. É a oitava causa de morte por câncer em homens e a nona em mulheres no mundo¹⁵. Apesar destes números alarmantes, nos últimos 80 anos não houve variações bruscas na taxa de mortalidade nos EUA, mostrando que o manejo e o tratamento do câncer de pâncreas ainda continuam sendo um desafio até os dias de hoje^{9,16}.

A disseminação do câncer pode ocorrer por meio das células tumorais circulantes (CTC)¹⁹. Em diversos tumores metastáticos, como mama e colorretal, o valor prognóstico das CTCs foi comprovado, demonstrando que quanto maior o número de CTC piores são as sobrevidas livre de progressão (SLP) e global (SG) dos pacientes^{3,12}.

Células tumorais podem propagar-se invadindo os vasos sanguíneos vizinhos ou usando os capilares formados dentro do tumor. Nas duas formas, há indução de transição epitélio-mesenquimal (TEM)⁷. O mecanismo molecular da TEM na progressão tumoral e na resistência a drogas citotóxicas ainda não é completamente entendido. Acredita-se que diversos fatores de transcrição (TWIST, SNAIL, SLUG, ZEB1 e ZEB2) e vias de sinalização (Wnt, TGF- β , Hedgehog, Notch e NF-KB) estão envolvidos na

indução da TEM. Dentre essas vias de sinalização, o TGF- β (Transforming Growth Factor-Beta) tem importante papel na carcinogênese pancreática nos estágios avançados da doença. O TGF- β promove migração, angiogênese e invasão tumoral, além de aumentar a atividade das metaloproteinases (MMPs). Em linhagens celulares de câncer de pâncreas já foi evidenciada a importância do TGF- β para a indução da TEM^{2,5,7,10,11,17}.

A degradação da matriz extracelular é um evento essencial para a infiltração e disseminação tumoral. As MMPs são um grupo de 20 proteases. Dentre elas, a alta expressão de MMP-2 ganha destaque no câncer pancreático por contribuir para o desenvolvimento e heterogeneidade deste tumor^{18,19}. Poucos pacientes descobrem o adenocarcinoma de pâncreas em estágio inicial e a resistência à droga citotóxica é um dos principais fatores para a progressão da doença.

Portanto, este trabalho teve como objetivo a correlação da contagem e expressão de genes da transição epitélio-mesenquimal (vimentina, TGF β -RI e MMP2) nas CTCs encontradas em sangue periférico de pacientes com adenocarcinoma de pâncreas localmente avançado ou metastático e correlacionar com sobrevida livre de progressão e global.

MÉTODOS

Pacientes

Este foi um estudo prospectivo, realizado no A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brasil e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta instituição (Registro CEP nº 1367/10). A amostra foi recrutada por conveniência consecutiva. Foram incluídos os pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de pâncreas localmente avançado ou metastático, comprovados radiologicamente por meio de tomografia computadorizada ou ressonância magnética, que estavam iniciando o tratamento sistêmico ou apresentaram progressão tumoral e que não realizaram nenhum procedimento cirúrgico quatro dias antes das coletas. Os dados clínicos levantados por meio do prontuário foram: gênero, idade, estadiamento tumoral, TNM, nível sérico de CA 19,9 e grau histológico. Os critérios RECIST 1.1⁶ foram considerados para determinar progressão.

Após assinar o termo de consentimento livre e esclarecido, foram realizadas três coletas de 8 ml de sangue periférico, do início do tratamento sistêmico e as outras duas com intervalo de 40 e 80 dias da primeira coleta. Este período entre as coletas foi proposto levando em consideração que o paciente realizaria dois ciclos de quimioterapia e não estaria na vigência de droga citotóxica na coleta subsequente por no mínimo uma semana. Na segunda e terceira coleta não foi considerado o ciclo de quimioterapia em que o paciente estava.

Coletas

As coletas de amostras de sangue (8 ml) foram realizadas em tubo de EDTA. Elas foram armazenadas em temperatura ambiente por até 4 h sob homogeneização e processadas no sistema ISET® (Rarecells Diagnostics, Paris, França), de acordo com as instruções do fabricante.

Foi considerada CTC a célula que apresentasse os seguintes critérios: tamanho nuclear igual ou maior que 16 μ m, irregularidade do contorno nuclear, presença de citoplasma visível, alta proporção núcleo-citoplasma (>0,8) e marcação negativa para CD45¹⁴. As imagens obtidas dos resultados desta técnica foram feitas usando um microscópio de luz branca (Axioskop 40 -Carl Zeiss, Alemanha) acoplado a uma câmera digital (Sony Cyber-shot DSC- S75).

Avaliação da expressão proteica de genes de transição epitélio-mesenquimal

Foram realizados testes de imunocitoquímica (ICC) nas CTCs do baseline para verificar a expressão proteica de TEM. Para isto, foram utilizados marcadores mesenquimais:

vimentina (1:100, Dako, Dinamarca), MMP-2 (1:100, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) e TGF- β receptor I (TGF β -RI;1:100, Sigma-Aldrich, Estados Unidos).

Cada membrana do ISET apresenta 10 spots; cada spot foi cortado e colocado em placa de 24-wells. Após uma série de hidratação e banhos com tampões específicos e bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio, o primeiro anticorpo escolhido foi incubado por 1 h. Depois deste período, foi adicionado Dual Long System HRP (Envision™ Fix Dako) e realizada a coloração com DAB (Dako®). Após a coloração, foi colocado o segundo anticorpo escolhido, incubado por mais 1 h e adicionados Rabbit/mouse (Link) (Kit Envision™ sistem/AP) e AP Enzyme (Enhancer™). Para a coloração do segundo anticorpo, utilizou-se Permanet Red (Dako®). Quando secos, os spots foram colocados nas lâminas para leitura.

Para avaliação e distinção das CTCs de glóbulos brancos (leucócitos) contaminantes, além de análise citomorfológica, foi utilizada imunocitoquímica com dupla marcação (DAB+/Permanet Red; Dako®), usando um marcador de resistência a tratamento e o anti-CD45 (1:100; clone 2B11+PD7/26, Dako®), um marcador de superfície de leucócitos.

Controles positivos e negativos foram realizados para cada coloração ICC. Para controles, foram usados sangue do indivíduo saudável enriquecido com células de linhagem sugerida pelo fabricante de cada anticorpo. Os glóbulos brancos do indivíduo saudável foram utilizados como controle positivo para CD45. Para a reação negativa, foi utilizado um spot sem anticorpos.

Análise estatística

Para a análise estatística, categorizaram-se os valores das CTCs observadas em cada avaliação de acordo com a mediana. Teve-se que avaliar de acordo com a mediana porque não há ponto de corte seguro estabelecido para contagem de CTCs para o tumor de pâncreas por meio do método que foi usado (ISET). O teste Qui-Quadrado foi utilizado para associar as características demográficas e clínicas com as CTCs categorizadas (acima ou abaixo da mediana) em cada momento de avaliação. Com o teste de Kaplan-Meier obteve-se a estimativa do tempo mediano de sobrevida (global e livre de progressão). O teste Log-Rank foi utilizado para comparar os riscos de óbito/progressão de doença entre grupos. O nível de significância adotado foi o de 5% e o software IBM SPSS versão 17 foi utilizado nas análises.

RESULTADOS

Características basais da população estudada

Foram incluídos 21 pacientes com adenocarcinoma de pâncreas localmente avançado ou metastático, 10 homens (47,6%) e 11 mulheres (52,4%), com idade mediana de 67 anos (41-84 anos). O estágio IV da doença foi observado em 14 pacientes (66,7%) e o grau histológico predominante foi o moderadamente diferenciado, encontrado em oito pacientes (38,1%). O principal sítio de metástase foi o fígado (n=9, 42,9%). A estratégia terapêutica mais comum no momento da inclusão no estudo foi paliativa (n=17, 81%). As características basais dos pacientes podem ser vistas na Tabela 1.

Foram realizadas três coletas de CTCs com intervalo de 40 dias entre elas. A mediana de CTCs detectadas pelo sistema ISET no *baseline* foi de 22 CTCs/8 ml de sangue (0-194,4). No primeiro *follow-up* a mediana foi de 20 CTCs/8 ml de sangue (0-175) e, no segundo, foi encontrada a mediana de 8 CTCs/8 ml de sangue (0-84). Houve perda de uma amostra no *baseline* (falha na análise), seis perdas entre o *baseline* e 1º *seguimento* (quatro óbitos e dois abandonos) e três perdas entre o 1º e 2º *seguimentos* (dois óbitos e um abandono).

TABELA 1 - Características clínicas dos pacientes recrutados

Característica	n	%	
Gênero	Masculino	10	47,6
	Feminino	11	52,4
Idade	< 67	9	42,9
	= 67	12	57,1
Estadio	II	3	14,3
	III	4	19,1
	IV	14	66,7
Tamanho tumoral (T)	2	1	4,8
	3	6	28,6
	4	8	38,1
	Sem dados	6	28,6
Comprometimento linfonodal (N)	0	6	28,6
	1	7	33,3
	Sem dados	8	38,1
Metástase (M)	0	4	19,1
	1	8	38,1
	Sem dados	9	42,8
Grau histológico	Não avaliado	7	33,3
	Bem diferenciado	2	9,4
	Moderadamente diferenciado	8	38,1
	Pouco diferenciado	4	19,4
Terapia quimioterápica antineoplásica	Gencitabina	6	28,6
	FOLFOX	4	19,0
	FOLFIRI	3	14,3
	FOLFIRINOX	7	33,3
Estratégia terapêutica	5FU	1	4,8
	Adjuvante	1	4,8
	Neoadjuvante	1	4,8
	Paliativa	17	81,0
Dados não disponíveis	2	9,4	

5FU=Fluoruracil

Transição epitélio-mesenquimal

Para definir o fenótipo mesenquimal nas CTCs, utilizaram-se três marcadores: vimentina, MMP-2 e TGF-βRI (Figura 1). Dos 12 pacientes testados para MMP-2, seis tinham marcação positiva (50%, Figura 1A), enquanto dos 16 testados para TGFβ-RI, quatro apresentaram marcação positiva (25%, Figura 1C). Três pacientes apresentaram marcação positiva em ambos marcadores. Já para vimentina, dos 11 testados, nenhum apresentou positividade nas CTCs. Ressalte-se que os anticorpos foram testados de acordo com a disponibilidade de material. Muitos pacientes tiveram os spots das membranas de ISET gastos com outras avaliações, de outros estudos, portanto, indisponíveis para nossas análises.

Não houve diferença estatisticamente relevante na SLP entre os pacientes que apresentaram marcação positiva para TGFβ-RI em comparação aos que não apresentaram expressão deste marcador (1,73 meses vs. 1,36 meses; $p=0.83$). O mesmo serve para a SG (6,95 vs. 6,53 meses; $p=0.89$), não apresentando diferença estatisticamente relevante.

Os pacientes com marcação positiva nas CTCs para MMP-2 não apresentaram diferença estatisticamente relevante em comparação aos sem essa marcação na SLP (média=2,84 meses vs. 4,86 meses; $p=0.22$) e SG (5,82 meses vs. 6,39 meses; $p=0.99$).

Levando em consideração os dois marcadores (Figura 2), os pacientes que apresentaram fenótipo mesenquimal por marcação positiva no mínimo em um dos marcadores (MMP2 e/ou TGFβ-RI) nas CTCs, apesar de não haver diferença estatisticamente relevante ($p=0.14$), progrediram mais rápido do que os que não apresentaram marcação positiva para nenhum dos marcadores mesenquimais (média: 2,84 vs. 5,43 meses). O mesmo foi verdadeiro para SG. Os pacientes que apresentaram o fenótipo mesenquimal nas CTCs, apesar de não terem diferença estatisticamente relevante, mostraram sobrevida média menor, comparada com os pacientes que não tinham marcação positiva (5,82 vs. 7,45 meses; $p=0.65$).

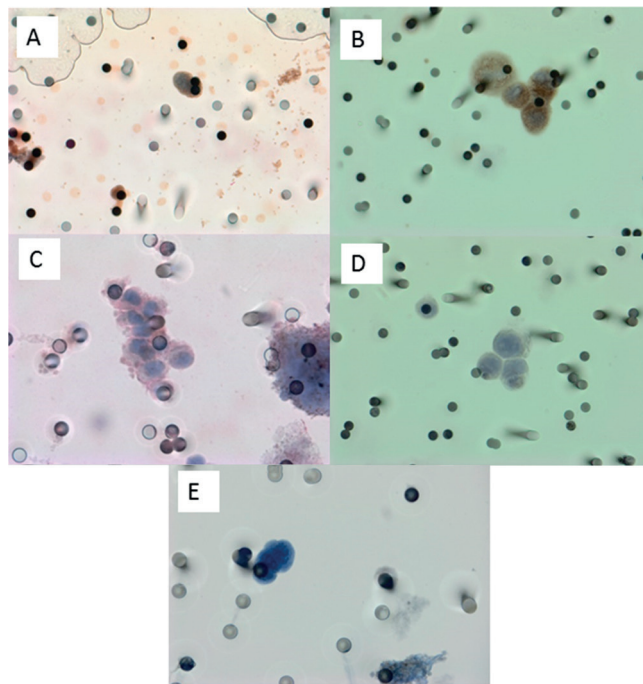


FIGURA 1 – Imunocoloração das CTCs e controles positivos: A) CTC de paciente com câncer de pâncreas positiva para MMP2 (60x); B) controle positivo, linhagem celular A-549 em sangue saudável com marcação em MMP2 (x60); C) CTC de paciente com câncer de pâncreas positiva para TGFβ-RI (60x); D) controle positivo, linhagem celular A-549 em sangue saudável com marcação em TGFβ-RI (x60); E) CTC de paciente com câncer de pâncreas positiva para hematoxilina (60x). Todas as fotomicrografias foram retiradas com microscópio de luz (Microscópio de Sistema de Pesquisa BX61 – Olympus, Tóquio, Japão) acoplado a câmera digital (SC100 – Olympus, Tóquio, Japão).

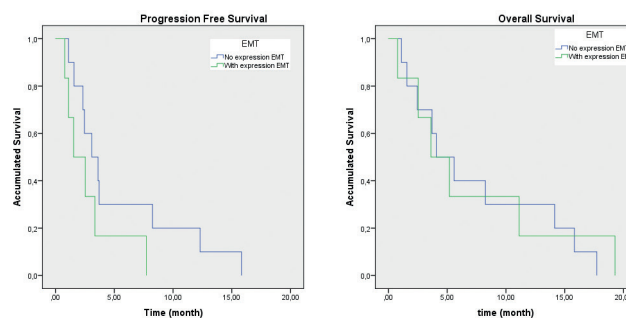


FIGURA 2 – Curvas de sobrevida livre de progressão e sobrevida global para marcadores de TEM entre pacientes que apresentam (linha verde) e os que não apresentaram (linha azul) marcação positiva em MMP2 e/ou TGFβ-RI.

DISCUSSÃO

A relevância da análise das CTCs no adenocarcinoma de pâncreas é controversa. As CTCs parecem ser bons biomarcadores visto que nas coortes de pacientes onde foram analisadas, nenhum dos indivíduos saudáveis apresentou CTC, mostrando sua especificidade. Além disso, o isolamento destas células permite a análise proteômica, genética e molecular das células tumorais de forma não invasiva^{4,8,14}.

Em relação à expressão de moléculas envolvidas na TEM,

apesar dos dados não apresentarem relevância estatística neste estudo, os pacientes que expressaram MMP2 e/ou TGFβ-RI progrediram mais rápido (média=2,84 vs. 5,43 meses; $p=0.14$) e sobreviveram menos (média=5,82 vs. 7,45 meses; $p=0.65$) comparados aos que não apresentavam fenótipo mesenquimal. Alguns estudos corroboram nossos dados na busca por marcadores de TEM. Arumugam et al. (2009)¹ demonstraram a importância da TEM na resistência a droga citotóxica no câncer pancreático. Utilizando 10 linhagens celulares desse tumor comprovaram que as cinco linhagens resistentes à gencitabina (PANC-1, Hs766T, AsPC-1, MIAPaCa-2, MPanc96) apresentaram morfologia irregular, alta expressão de Zeb-1 e vimentina e não expressão de E-caderina ($p=0.0006$), demonstrando fenótipo mesenquimal, diferentemente das linhagens sensíveis à gencitabina que tinham fenótipo epitelial (HPDE, L3.6pl, BxPC3, CFPAC, SU86.86). Em ensaio de migração, as células mesenquimais migraram mais que as epiteliais.

Outros estudos mostraram a relevância das CTC como marcadores biológicos para TEM em outros tumores. Fanelli, et al. (2017)⁸, utilizando CTCs coletadas pela filtragem ISET® de pacientes com tumores de cabeça e pescoço, demonstraram que a marcação positiva para TGFβ-RI nas CTCs foi preditor de pior SLP comparada aos pacientes que não apresentam a marcação no primeiro seguimento (12 vs. 26 meses, respectivamente; $p=0.007$). Li et al. (2013)¹⁰ fizeram um estudo com o objetivo de avaliar a correlação entre CTCs e TEM no câncer hepático. Na análise das CTCs, utilizaram técnica de imunofluorescência (miniMACS Milteny®). A presença de CTC foi estatisticamente relevante nos pacientes com trombose portal por tumor ($p<0.001$), estágio III e IV da doença ($p=0.005$) e tamanho tumoral ($p<0.001$). Nos pacientes que realizaram ressecção tumoral ou quimioembolização, os que tinham CTC positiva, apresentaram recorrência tumoral ou metástase ($p=0.002$) e mortalidade ($p=0.007$) maior do que os que não tinham CTCs no sangue periférico após um ano da primeira coleta. A expressão da vimentina e TWIST foi estatisticamente significativa nos pacientes com trombose portal por tumor ($p=0.0003$, $p<0.001$, respectivamente). Além disso, a expressão da vimentina também foi correlacionada ao tamanho tumoral maior ($p<0.001$). Em análise imunoquímica, a expressão de TWIST e ZEB1 foi significante maior no tumor hepático do que em outras doenças hepáticas ($p=0.002$, $p<0.001$, $p=0.016$, respectivamente). Os tumores que expressavam E-caderina ($p=0.001$) não expressavam vimentina e TWIST ($p=0.020$) e a expressão de E-caderina era baixa nos pacientes com trombose portal por tumor ($p=0.007$), demonstrando a importância da TEM na disseminação de células tumorais do tumor primário.

Este estudo foi o primeiro a verificar o papel de TGFβ-RI e MMP-2 nas CTCs, mostrando a relevância da expressão de MMP-2 nessas células. Reconhecemos nossas limitações: número de pacientes recrutados, perda de amostra entre as coletas, pacientes em diferentes estágios da doença, dificuldades encontradas na análise da amostra (coagulação sanguínea e falta de CTC em todos os spots de teste). Contudo, ressaltamos a importância de continuar a avaliação destes marcadores em câncer de pâncreas por ser doença altamente complexa e com tão pouco conhecimento a respeito de mecanismos e possibilidades de intervenção terapêutica.

CONCLUSÃO

A contagem de CTC não se mostrou relevante nas análises de comparação do número de CTC e SLP, SG ou características clínicas da população estudada. No entanto, pode ser que a análise de marcador nas CTCs seja útil, como aqui foi observado pelas curvas separadas de SLP e SG para expressão de MMP-2 e ou TGFβ-RI.

REFERÊNCIAS

1. Arumugam T, Ramachandran V, Fournier KF, et al. HHS Public Access. 2015;69(14):5820-5828. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2819.Epithelial.
2. Bonnomet a, Syne L, Brysse a, et al. A dynamic in vivo model of epithelial-to-mesenchymal transitions in circulating tumor cells and metastases of breast cancer. *Oncogene*. 2012;31(33):3741-3753. doi:10.1038/onc.2011.540.
3. Bork U, Rahbari NN, Schölch S, et al. Circulating tumour cells and outcome in non-metastatic colorectal cancer: a prospective study. *Br J Cancer*. 2015;(February):1306-1313. doi:10.1038/bjc.2015.88.
4. Cen P, Ni X, Yang J, Graham DY, Li M. Circulating tumor cells in the diagnosis and management of pancreatic cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1826(2):350-356. doi:10.1016/j.bbcan.2012.05.007.
5. Durlík M, Gardian K. Metalloproteinase 2 and 9 activity in the development of pancreatic cancer. *Prace Oryginalne Papers*. 2012;(404):7-12.
6. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. 2009;45(2):228-247. doi:10.1016/j.ejca.2008.10.026.
7. Ellenrieder V, Hendler SF, Boeck W, et al. Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation. *Cancer Res*. 2001;61(10):4222-4228.
8. Fanelli MF, Oliveira TB, Braun AC, et al. Evaluation of incidence, significance and prognostic role of circulating tumor microemboli and transforming growth factor-β receptor in head and neck cancer. *Head Neck*. November 2017, doi: 10.1002/hed.24899
9. Fernandes, Eduardo de Souza Martin et al. The largest western experience with hepatopancreatoduodenectomy: lessons learned with 35 cases. *Abcd, arq. Bras. Cir. Dig., mar 2016, vol.29, no.1, p.17-20. Issn 0102-6720*
10. Li Y-M, Xu S-C, Li J, et al. Epithelial-mesenchymal transition markers expressed in circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma patients with different stages of disease. *Cell Death Dis*. 2013;4:e831. doi:10.1038/cddis.2013.347.
11. Long J, Zhang Y, Yu X, et al. NIH Public Access. 2012;15(7):817-828. doi:10.1517/14728222.2011.566216.Overcoming.
12. Lucci A, Hall CS, Lodhi AK, et al. Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: A prospective study. *Lancet Oncol*. 2012;13(7):688-695. doi:10.1016/S1470-2045(12)70209-7.
13. Meo M, Mani S a, Cristofanilli M. Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer--clinical applications. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010;7(12):693-701. doi:10.1038/nrclinonc.2010.171.
14. Ren C, Chen H, Han C, et al. Detection and molecular analysis of circulating tumor cells for early diagnosis of pancreatic cancer. *Med Hypotheses*. 2013;80(6):833-836. doi:10.1016/j.mehy.2013.03.027.
15. Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N. Pancreatic Adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 2014;371(11):1039-1049. doi:10.1056/NEJMra1404198.
16. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014;64(1):9-29. doi:10.3322/caac.21208.
17. Wang Z, Li Y, Ahmad A, et al. Pancreatic cancer: understanding and overcoming chemoresistance. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011;8(1):27-33. doi:10.1038/nrgastro.2010.188.
18. Xu Q, Li P, Chen X, et al. miR-221/222 induces pancreatic cancer progression through the regulation of matrix metalloproteinases. *Oncotarget*. 2015;6(16):14153-14164. doi:10.18632/oncotarget.3686.
19. Zhai L, Cai C, Wu Y, Tang Z. Correlation and prognostic significance of MMP-2 and TFPI-2 differential expression in pancreatic carcinoma. 2015;8(1):682-691.