

IMPORTANCIA DE LA DETECCIÓN DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES EN EL CÁNCER DE MAMA

Luis Francisco Sáenz Mateos

Servicio de Análisis Clínicos. Hospital General Universitario de Ciudad Real. C/ Obispo Rafael Torija, s/n 13005-Ciudad Real.

E-mail: txito3@hotmail.com

Resumen

A pesar de los avances en la detección y tratamiento del cáncer de mama la mortalidad es todavía muy significativa. La principal causa es el desarrollo de una enfermedad metastásica recurrente mediante la diseminación de células tumorales circulantes, cuyo principal destino es la sangre periférica junto con los nódulos linfáticos y la médula ósea antes de afectar a los órganos.

En la actualidad, existen métodos de detección de gran sensibilidad y variedad de marcadores específicos que nos pueden permitir detectar a las células tumorales circulantes en sangre periférica, y de este modo, realizar estudios para predecir un riesgo individual de desarrollar metástasis, evaluar la progresión de la enfermedad y monitorizar la respuesta al tratamiento en las pacientes con metástasis.

Palabras clave: Células tumorales circulantes, CTC, cáncer de mama.

Introducción

Se ha estimado aproximadamente a nivel mundial un millón de casos anuales de cáncer de mama, siendo el tipo de neoplasia que con más frecuencia se diagnostica en la mujer¹.

El desarrollo de una enfermedad metastásica es la causante de que un 30-40 % de las pacientes terminen falleciendo a pesar de las mejoras en la detección y tratamiento de esta patología³. La dispersión metastásica en muchas ocasiones tiene lugar sin enfermedad detectable en los ganglios linfáticos durante el segundo y tercer año después del diagnóstico^{2 3 4}.

Existen muchos investigadores que creen que la detección de estas células potencialmente metastásicas en médula ósea (células tumorales diseminadas, DTCs)^{3 4} o en sangre periférica (CTCs)⁵ podrían revelar información pronóstica adicional a la conseguida con el sistema de estadiaje actual del cáncer de mama.⁶ Se ha observado que dichas células acumu-

lan un menor número de alteraciones genómicas que las células del tumor primario, sugiriendo que la diseminación de las CTCs ocurre en una fase temprana de la enfermedad^{7 36}. En cierta manera, podríamos considerarlo como una enfermedad sistémica en las pacientes en estadios precoces⁸. En el caso de la enfermedad metastásica, la detección de CTCs podría ser utilizada como "una biopsia a tiempo real" para evaluar y monitorizar la respuesta al tratamiento.⁹

¿Qué son las Células Tumorales Circulantes?

Las CTCs fueron descritas por primera vez en 1869 en pacientes con cáncer por Asworth¹⁰. Son células tumorales epiteliales que ya se encuentran en la sangre periférica de pacientes con cáncer en un estadio temprano². Se supuso durante mucho tiempo, que su presencia en la sangre significaba progresión de enfermedad neoplásica y que se podría relacionar directamente con la aparición de metástasis tumorales. Pero su verdadero significado biológico no pudo establecerse por su escaso número y por no contar en aquel momento con técnicas que permitieran su aislamiento e identificación. Los avances tecnológicos actuales han puesto de manifiesto que las CTCs poseen alteraciones genómicas características propias de células malignas, y que rara vez se encuentran en sangre periférica de personas sanas⁴. Se estima que solamente 1 de cada 10⁵-10⁶ CTCs presentes en sangre periférica pueden ingresar en tejidos distantes del tumor primario y que sólo un pequeño porcentaje de estas células van a desarrollar una enfermedad metastásica (ver figura 1)^{11 35}.

La detección de dichas células y su monitorización durante el seguimiento y tratamiento en el cáncer de mama, podría tener un gran valor clínico con respecto a una predicción temprana de recidiva¹², incluso pudiendo superar los resultados obtenidos con los marcadores tumorales séricos clásicos¹³. La utilidad clínica de la detección de CTCs ha sido también demostrada en el cáncer de mama metastático², en cáncer colorectal y de próstata metastáticos^{15 16}. Así como en el cáncer pancreático¹⁷, gástrico¹⁸, de vejiga¹⁹, y de pulmón entre otros²⁰.

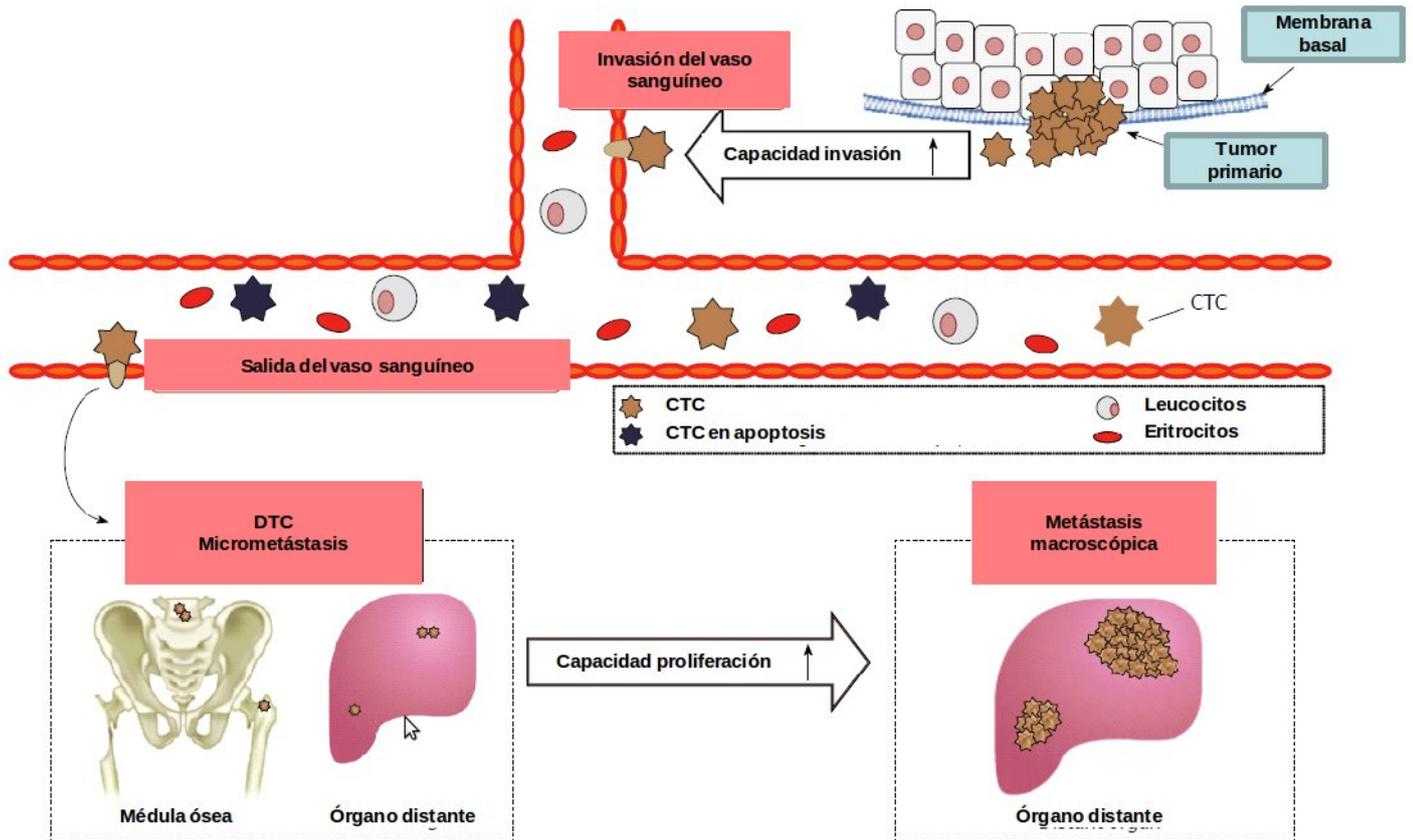


Figura 1. Células tumorales circulantes y el proceso de metástasis. Las CTCs a partir del tumor primario, alcanzan el torrente sanguíneo siendo capaces de sobrevivir durante largos periodos de tiempo hasta que se filtran en la médula ósea o en los órganos, dando lugar a micrometástasis que originarán metástasis macroscópicas identificables por pruebas de imagen. Figura modificada de Park Y, y colaboradores (2011).

¿Cómo se detectan?

Las CTCs son indetectables por los métodos de rutina actuales de imagen y laboratorio²¹. Para su detección se utiliza un paso previo de enriquecimiento pre-analítico basado en aspectos morfológicos de las CTCs (como el tamaño o la densidad), y técnicas de inmunoseparación (de esta manera se incrementa la sensibilidad del ensayo)¹³. Podemos diferenciar de una manera muy general dos tipos de detección:

1. Métodos directos basados en inmunocitoquímica, inmunofluorescencia y citometría de flujo. Todos ellos se basan en el reconocimiento de moléculas específicas de la célula tumoral por medio de uno o varios anticuerpos monoclonales asociados a una molécula que da una señal cuantificable. De entre estos métodos directos de detección, el más destacado es el CellSearch® Circulating Tumor Cell System, capaz de detectar en sangre periférica una CTC por cada 10^5 - 10^7 células mononucleares mediante electro magnetismo. Concretamente utiliza un reactivo (ferrofluido) con nanopartículas con un núcleo magnético rodeado de una capa polimérica revestida con anticuerpos dirigidos al antígeno EpCAM para captu-

rar las CTCs. Tras la captura inmunomagnética, se añaden los reactivos fluorescentes anti-citoqueratina (CK19), filamento intermedio del citoesqueleto de las células epiteliales, DAPI que tiñe el núcleo de las células y anti-CD45 que marca los leucocitos. Las células en el ferrofluido se depositan en un cartucho que se introduce en un dispositivo de presentación celular (Magnost®), este ejerce un campo magnético que atrae a las células y adquiere imágenes de las mismas permitiendo su identificación y enumeración de una manera fiable y reproducible (ver figura 2). Este sistema es el único aprobado por la agencia gubernamental de control de alimentos y medicamentos de los EE.UU. (FDA) para la determinación de las CTCs en pacientes con cáncer de mama²¹.

2. Métodos indirectos basados en ensayos de ácidos nucleicos. Los más usados son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, cuantitativa o cualitativa), la transcripción reversa (RT-PCR) y algunas variaciones de la misma, en las que se requiere un paso previo de transcripción reversa a partir de mRNA específicos (ver tabla 1). La PCR a partir de DNA genómico se utiliza para identificar y caracterizar CTCs, mediante la búsqueda de mutaciones puntuales en oncogenes o

genes supresores de tumores; siendo su principal desventaja la gran variabilidad genética entre diferentes tipos histológicos de tumor²². Además, la PCR tiene menos especificidad; no está claro si el DNA libre que es amplificado en sangre periférica es de CTCs o si proviene de tumores primarios, tumores metastásicos o de tejido normal¹¹. Sin embargo con la RT-PCR se detecta en sangre periférica pequeñas cantidades de moléculas de mRNA específicas de determinadas proteínas que sólo son expresadas por las células epiteliales del tumor sólido. Éste fenómeno además de demostrar la presencia de la célula tumoral en sangre, también demuestra que posee su maquinaria de transcripción activa y que por tanto su capacidad invasiva está intacta⁸.

Técnica	Volumen de muestra	Principio	Ventajas	Inconvenientes
PCR	5-10 mL	DNA	Alta sensibilidad Fase de enriquecimiento preanalítica corta	Baja especificidad No análisis morfológico
RT-PCR	5-10 mL	RNA	Alta sensibilidad Detección de CTCs viables	No análisis morfológico
Nested RT-PCR	5-10 mL	RNA	Sensibilidad muy alta Detección de CTCs viables	No análisis morfológico
RT-PCR a tiempo real	5-10 mL	RNA	Alta sensibilidad Detección de CTCs viables Cuantificación celular	No análisis morfológico
RT-PCR a tiempo real multimarcador	5-10 mL	RNA	Alta sensibilidad y alta especificidad Detección de CTCs viables Cuantificación celular Significación pronóstica en el cáncer de mama precoz	No análisis morfológico

Tabla 1. Métodos de detección de CTCs basados en ensayos de ácidos nucleicos.

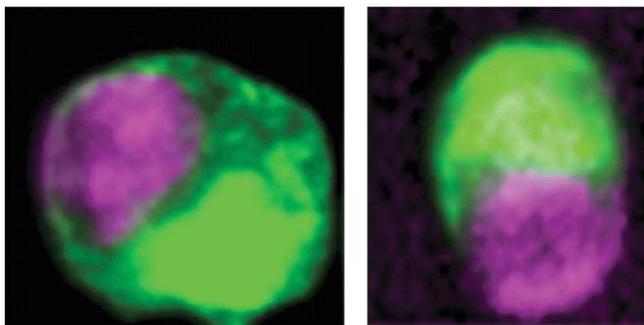


Figura 2. Imagen de células tumorales circulantes por el método CellSearch®. Cada evento clasificado como célula tumoral debe tener un fenotipo: EpCAM positivo, CK 19 positivo, DAPI positivo y CD45 negativo. Figura modificada de Krishnamurthy S, y colaboradores (2010).

Sin embargo, el principal inconveniente al que se enfrenta la RT-PCR es la detección de falsos positivos²². Mediante: a) la contaminación con DNA genómico durante la extracción del RNA; b) la expresión ilegítima de los marcadores en otros tipos celulares (transcripción en bajas cantidades de un gen específico de tejido en células no específicas); c) la inducción de los genes usados como marcadores por

citoquinas o por factores de crecimiento en trastornos hemáticos; y d) la presencia de pseudogenes²². Con el uso de la nested RT-PCR y de la RT-PCR a tiempo real se consigue aumentar la sensibilidad, se puede discriminar la transcripción ilegítima, así como diseñar oligonucleótidos que no amplifiquen DNA genómico o pseudogenes resolviendo en gran parte las falsos positivos que puedan aparecer²³. Aunque estas técnicas indirectas presentan el inconveniente de no poder observar la morfología celular²⁴, lo compensan con la posibilidad de usar gran cantidad de marcadores moleculares simultáneamente aumentando las sensibilidad (detección de 1 CTC entre 10⁷ células nucleadas de sangre periférica) y la especificidad de una forma significativa, convirtiéndose en un método idóneo para la detección de recidivas por vía hematológica y para identificar el alto riesgo de metástasis en el cáncer de mama²⁵.

¿Qué papel juegan las CTCs en el cáncer de mama?

Las CTCs han sido ampliamente estudiadas por su valor pronóstico en el cáncer de mama. Cuando están presentes después de una cirugía potencialmente curativa en sangre periférica, es lógico pensar en riesgo de recidiva y por tanto las pacientes son obvias candidatas al tratamiento adyuvante²⁶.

Hay autores que describen que en el cáncer de mama precoz y metastásico, la detección de CTCs mediante la cuantificación por CellSearch®, nested RT-PCR y RT-PCR a tiempo real con el marcador CK19, es un factor pronóstico independiente que disminuye el intervalo libre de enfermedad (disease-free interval, DFS) y la supervivencia general (“overall survival”, OS)⁵⁻⁹. A la misma conclusión llegan numerosos investigadores en el cáncer de mama precoz usando otros marcadores como la Maspina²⁷⁻²⁸, que es una proteína relacionada con la familia serpina de inhibidores de la proteasa, sintetizada por las células epiteliales del tejido mamario. O también la Mamoglobina (MGA) proteína que exhibe homología con varias proteínas secretoras epiteliales, formando parte de la superfamilia de las secretoglobinas (SCGB). La determinación de MGA se ha convertido en uno de los principales métodos para la detección de CTCs mediante RT-PCR, y es el marcador de cáncer de mama más estudiado después de la CK-19²². Hay un estudio actual que demuestra como la detección de CTCs por nested RT-PCR, usando como único marcador la mamoglobina en pacientes con cáncer de mama invasivo en el momento del diagnóstico, se asocia con un peor pronóstico, los autores proponen a la mamoglobina como un indicador pronóstico adicional²⁹.

Hay que destacar un estudio en concreto, en el que por primera vez se describe el uso de la RT-PCR a tiempo real con multimarcadores (CK19, mamoglobina-A y HER2) para detectar CTCs. En dicho estudio se pronostica un peor resultado clínico en pacientes con cáncer de mama precoz y demuestra

ser un ensayo mucho más sensible y específico comparado con la detección de CTCs por RT-PCR a tiempo real con un único marcador³². Otros investigadores utilizando el mismo método con los marcadores p1B, PS2, CK19 y EGP2 en pacientes con cáncer de mama metastásico, observaron que la positividad para estos marcadores se asociaba con una peor supervivencia¹⁴.

El uso de multimarcadores para la detección de CTCs aumenta la probabilidad de detectar las células que hayan perdido algún marcador epitelial como consecuencia de la diseminación tumoral^{33 34}. Y a parte de servir como herramienta pronóstica, podría también definir las subpoblaciones de CTCs con gran capacidad invasiva y resistentes en función de los marcadores detectados^{30 31}.

Conclusiones:

El uso de la gran variedad de métodos de detección para CTCs dificulta la comparación de los resultados entre los distintos estudios. Por esta razón es necesario realizar nuevos estudios clínicos para corroborar si la detección de CTCs en pacientes con carcinoma mamario (principalmente en las pacientes sin evidencia de metástasis), puede brindar un pronóstico en la evolución de la enfermedad y contribuir en la elección del tratamiento que haya que seguir para prevenir su recidiva. En el caso del paciente metastásico, sería útil para monitorizar la respuesta al tratamiento, indicando quien responde a la terapia y quien no, posibilitando nuevos tratamientos y evitando efectos secundarios innecesarios.

La estandarización de estas técnicas para la determinación de CTCs en los laboratorios clínicos asistenciales es hoy día relativamente sencilla y quizás en un futuro cercano, la detección de este tipo de células y su estudio genético en profundidad, podría ser una herramienta predictiva útil para la individualización del tratamiento del cáncer de mama.

Bibliografía:

- 1. Lee JA, Kim KI, Bae JW, Jung YH, An H, Lee ES. Triple negative breast cancer in Korea-distinct biology with different impact of prognostic factors on survival. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Aug; 123(1):177-87.
- 2. Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, et al. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23:1420-30.
- 3. Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Holle R, von Minckwitz G, Solomayer EF, et al. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1652-8.

- 4. Braun S, Pantel K, Müller P, Janni W, Hepp F, Kentenich CR, et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* 2000;342:525-33.
- 5. Stathopoulou A, Vlachonikolis I, Mavroudis D, Perraki M, Kouroussis Ch, Apostolaki S, et al. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *J Clin Oncol* 2002;20:3404-12.
- 6. Fehm T, Müller V, Alix-Panabières C, Pantel K. Micrometastatic spread in breast cancer: detection, molecular characterization and clinical relevance. *Breast Cancer Res* 2008; 10(suppl 1):S1.
- 7. Jiang WG, Martin TA, Mansel RE. Molecular detection of micro-metastasis in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2002;43:13-31.
- 8. Hüseemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, Burghart E, et al. Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* 2008;13:58-68.
- 9. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351:781-91.
- 10. Asworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in tumors were seen in the blood after death. *Aust Med J* 1869; 14:146-7.
- 11. Ring A, Smith IE, Dowsett M. Circulating tumour cells in breast cancer. *Lancet Oncol.* 2004;5:79-88.
- 12. Tewes M, Aktas B, Welt A, Mueller S, Hauch S, Kimmig R, et al. Molecular profiling and predictive value of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: an option for monitoring response to breast cancer related therapies. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 115:581-90.
- 13. Gerges N, Janusz R, Jabado N. New technologies for the detection of circulating tumour cells. *British Medical Bulletin* 2010; 94: 49-64.
- 14. Weigelt B, Bosma AJ, Hart AA, Rodenhuis S, Van 't Veer LJ. Marker genes for circulating tumour cells predict survival in metastasized breast cancer patients. *Br J Cancer* 2003;88:1091-4.
- 15. Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:3213-21.

- 16. de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:6302–9.
- 17. Kurihara T, Itoi T, Sofuni A, Itokawa F, Tsuchiya T, Tsuji S, et al. Detection of circulating tumor cells in patients with pancreatic cancer: a preliminary result. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2008;15:189–95.
- 18. Szatanek R, Drabik G, Baran J, Kolodziejczyk P, Kulig J, Stachura J, et al. Detection of isolated tumour cells in the blood and bone marrow of patients with gastric cancer by combined sorting, isolation and determination of MAGE-1, -2 mRNA expression. *Oncol Rep* 2008;19:1055–60.
- 19. Beecken WD, Engl T, Engels K, Blumenberg C, Oppermann E, Camphausen K, et al. Clinical relevance of maspin expression in bladder cancer. *World J Urol* 2006;24:338–44.
- 20. Woenckhaus M, Bubendorf L, Dalquen P, Foerster J, Blaszyk H, Mirlacher M, et al. Nuclear and cytoplasmic maspin expression in primary non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol* 2007;60:483–6.
- 21. Luz Fernanda Sua Villegas, Nhora María Silva Pérez, Marta Vidaurreta Lázaro, María Luisa Maestro de las Casas, Sara Rafael Fernández y Silvia Veganzones de Castro. Actualidad y futuro en las técnicas de cuantificación de células tumorales circulantes: su importancia en tumores sólidos epiteliales. *Rev Lab Clin.* 2011;4(3):163–169
- 22. Lacroix M. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 2006;13:1033–67.
- 23. Stathopoulou A, Ntoulia M, Perraki M, Apostolaki S, Mavroudis D, Malamos N, et al. A highly specific real-time RT-PCR method for the quantitative determination of CK-19 mRNA positive cells in peripheral blood of patients with operable breast cancer. *Int J Cancer* 2006;119:1654–9.
- 24. Ring AE, Zabaglo L, Ormerod MG, Smith IE, Dowsett M. Detection of circulating epithelial cells in the blood of patients with breast cancer: comparison of three techniques. *Br J Cancer* 2005;92:906–12.
- 25. Alix-Panabières C, Riethdorf S, Pantel K. Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 5013–5021.
- 26. Ignatiadis M, Georgoulis V, Mavroudis D. Micrometastatic disease in breast cancer: Clinical implications. *European journal of cancer* 2008; 44: 2726-36.
- 27. Corradini P, Voena C, Astolfi M, Dell’Oro S, Pilotti S, Arrigoni G, et al. Maspin and mammaglobin genes are specific markers for RT-PCR detection of minimal residual disease in patients with breast cancer. *Ann Oncol.* 2001;12:1693-8.
- 28. Sabbatini R, Federico M, Morselli M, Depenni R, Cagossi K, Luppi M, et al. Detection of circulating tumor cells by reverse transcriptase polymerase chain reaction of maspin in patients with breast cancer undergoing conventional-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1914-20.
- 29. Ferro P, Franceschini MC, Bacigalupo B, Dessanti P, Falco E, Fontana V, et al. Detection of circulating tumour cells in breast cancer patients using human mammaglobin RT-PCR: association with clinical prognostic factors. *Anti-cancer Res.* 2010 Jun;30(6):2377-82.
- 30. Gazzaniga P, Gradilone A, Naso G, Cortesi E, Gianni W, Frati L, et al. Chemoresistance profile of circulating tumor cells: toward a clinical benefit? *Int J Cancer* 2008; 123: 1730–1732.
- 31. Gazzaniga P, Naso G, Gradilone A, Cortesi E, Gandini O, Gianni W, et al. Chemosensitivity profile assay of circulating cancer cells (CTCs): prognostic and predictive value in epithelial tumors. *Int J Cancer* 2010; 126(10): 2437–2447.
- 32. Ignatiadis M, Kallergi G, Ntoulia M, Perraki M, Apostolaki S, Kafousi M, et al. Prognostic value of the molecular detection of circulating tumor cells using a multimarker reverse transcription-PCR assay for cytokeratin 19, mammaglobin A, and HER2 in early breast cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:2593–600.
- 33. Chen Y, Zou TN, Wu ZP, Zhou YC, Gu YL, Liu X, et al. Detection of cytokeratin 19, human mammaglobin, and carcinoembryonic antigen-positive circulating tumor cells by three-marker reverse transcription-PCR assay and its relation to clinical outcome in early breast cancer. *Int J Biol Markers.* 2010 Apr-Jun;25(2):59-68.
- 34. Shen C, Hu L, Xia L, Li Y. The detection of circulating tumor cells of breast cancer patients by using multimarker (Survivin, hTERT and hMAM) quantitative real-time PCR. *Clin Biochem.* 2009 Feb;42(3):194-200.
- 35. Park Y, Kitahara T, Urita T, Yoshida Y, Kato R. Expected clinical applications of circulating tumor cells in breast cancer. *World J Clin Oncol.* 2011 Aug 10;2(8):303-10.
- 36. Krishnamurthy S, Cristofanilli M, Singh B, Reuben J, Gao H, Cohen EN, et al. Detection of minimal residual disease in blood and bone marrow in early stage breast cancer. *Cancer.* 2010 Jul 15;116(14):3330-7.