



CENTRO PFIZER-UNIVERSIDAD DE GRANADA-JUNTA DE ANDALUCÍA
DE GENÓMICA E INVESTIGACIÓN ONCOLÓGICA



Universidad de Granada

***ANÁLISIS GENÉTICO Y FENOTIPO
INVASIVO DE LAS CÉLULAS
TUMORALES CIRCULANTES (CTCs)
EN PACIENTES CON CÁNCER DE
MAMA EN ESTADIOS TEMPRANOS***

ANA FERNÁNDEZ GARCÍA

TESIS DOCTORAL

GRANADA, 2015

Editorial: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autora: Ana Fernández García
ISBN: 978-84-9125-110-1
URI: <http://hdl.handle.net/10481/40209>



CENTRO PFIZER-UNIVERSIDAD DE GRANADA-JUNTA DE ANDALUCÍA
DE GENÓMICA E INVESTIGACIÓN ONCOLÓGICA



Universidad de Granada

Tesis Doctoral:

**“ANÁLISIS GENÉTICO Y FENOTIPO INVASIVO DE LAS CÉLULAS
TUMORALES CIRCULANTES (CTCs) EN PACIENTES CON CÁNCER DE
MAMA EN ESTADIOS TEMPRANOS”**

Ana Fernández García

Granada, 2015

D. José Antonio Lorente Acosta, Catedrático de la UGR; del Departamento de Medicina Legal, Toxicología y Antropología Física de la Universidad de Granada; Director del Laboratorio de Identificación Genética de la UGR y Director científico del centro Pfizer-UGR-Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (GENyO), Granada.

Dña. María José Serrano Fernández, Investigadora principal del grupo de “Biodinámica de Células Tumorales Circulantes, Microambiente Tumoral y metástasis” en el centro centro Pfizer-UGR-Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (GENyO), Granada.

Certifican que:

ANA FERNÁNDEZ GARCÍA, Licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado la Tesis Doctoral **“Análisis y fenotipo invasivo de las células tumorales circulantes (CTCs) en pacientes con cáncer de mama en estadios tempranos”**, en el centro GENyO, para aspirar al grado de Doctor en Biología. Este trabajo de investigación reúne las condiciones necesarias para ser presentado y defendido ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, en cumplimiento de la legislación vigente, firmamos el presente certificado.

En Granada, a 02 de Febrero de 2015.

Dr. D. J.A. Lorente

Dra. Dña. M.J. Serrano

Doctoranda

La doctoranda **Ana Fernández García** y los directores de la tesis; **D. José Antonio Lorente Acosta** y **Dña. M^a José Serrano Fernández**

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que:

El trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

En Granada, a 02 de Febrero de 2015.



Dr. D. J.A. Lorente



Dra. Dña. M.J. Serrano

Doctoranda

A mis padres,
A mi hermano,
A Raúl

Agradecimientos

Quiero dar las gracias al Dr. José Antonio Lorente, mi Director, por haberme dado la oportunidad de formar parte de este grupo de investigación y hacer posible la realización de este trabajo.

A mi Directora, la Dra. M^a José Serrano: gracias “*jefa*” por recibirme en tu grupo con los brazos abiertos, por la confianza que depositaste en mí desde el primer momento, por tus consejos de científicos y personales y por tu empeño en que esta tesis saliera adelante (que casi ha sido un parto, lo sé...).

Gracias a mis padres, a quienes les debo todo lo que soy y por la ilusión en este proyecto.

A mi hermano, gracias por estar siempre para todo.

Gracias Raúl; por tus consejos, por tu paciencia y sobre todo por la insistencia para hiciera la tesis.

A mi hijo Pablo, a quien no sé si darle las gracias o un “*tironcillo* de orejas”... Él ha sido el punto de locura y desorden en este trabajo: apagando el ordenador en el momento menos oportuno, desordenando y arrugando folios. Gracias Pablo por hacer más amena esta tesis con tus canciones.

Gracias a mis amigas de toda la vida, Ana y Mayte, por el interés que han puesto en que realizara este proyecto y vuestros ánimos.

También quiero dar las gracias a mis compañeros de laboratorio en los inicios de *GENyO*: Mariadel y Juan Carlos y a Carmen y Estefanía (que ya se marcharon), por hacer el trabajo más alegre con vuestras risas y por vuestros conocimientos científicos y prácticos. Y gracias Gabi por tu disponibilidad para ayudarme.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	I
REACTIVOS	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 LA GLÁNDULA MAMARIA	3
1.2 EL CÁNCER DE MAMA	6
1.2.1 Epidemiología	6
1.2.2 Factores de riesgo	7
1.2.3 Clasificación histológica del cáncer de mama	8
1.2.4 Clasificación molecular del cáncer de mama	11
1.2.5 Receptores de factores de crecimiento	13
1.2.6 Marcadores de proliferación	15
1.2.7 Marcadores de células madre	16
1.2.8 Factores pronóstico y predictivos	18
1.2.9 Tratamiento sistémico del cáncer de mama en estadio precoz...	23
1.2.10 Diseminación tumoral	24
1.2.10.1 Diseminación tumoral linfática	27
1.2.10.2 Diseminación tumoral sanguínea	27
1.2.10.3 Diseminación tumoral linfática <i>versus</i> Diseminación tumoral sanguínea	28
1.2.11 Células Tumorales Circulantes (CTCs)	28
1.2.12 Técnicas de enriquecimiento, aislamiento y detección de células tumorales circulantes	32
2. HIPÓTESIS	37
3. OBJETIVOS	41

4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	45
4.1 SELECCIÓN DE LAS PACIENTES PARA EL ESTUDIO.....	47
4.2 MUESTRAS EMPLEADAS EN ESTE ESTUDIO.....	48
4.2.1 Muestras de sangre de pacientes.....	49
4.2.2 Controles negativos.....	49
4.2.3 Líneas celulares de cáncer de mama.....	49
4.2.4 Controles positivos.....	50
4.3 ANÁLISIS REALIZADOS SOBRE LAS MUESTRAS DE SANGRE..	52
4.4 ANÁLISIS REALIZADOS SOBRE LAS MUESTRAS DEL TUMOR PRIMARIO.....	53
4.5 PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS.....	54
4.5.1 Cultivo <i>in vitro</i> de líneas celulares.....	54
4.5.2 Aislamiento y enriquecimiento celular.....	55
4.5.3 Selección positiva inmunomagnética.....	56
4.5.4 Detección de CTCs mediante tinción cromogénica.....	63
4.5.5 Tinción inmunocitoquímica.....	64
4.5.6 FICTION.....	68
4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	70
5. RESULTADOS.....	71
6. DISCUSIÓN.....	95
7. CONCLUSIONES.....	115
8. BIBLIOGRAFÍA.....	120

ABREVIATURAS

Anti-CK	Anticuerpo frente a citoqueratinas.
CDI	Carcinoma ductal invasivo.
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i> .
CLIS	Carcinoma luminal <i>in situ</i> .
CD133	Glicoproteína transmembrana característica de células madre.
CEP17	Sonda centromérica del cromosoma 17. Acrónimo derivado de su nombre en inglés <i>chromosome 17 Centromere Probe</i> .
CGH	Hibridación genómica comparada. Acrónimo derivado de su nombre en inglés <i>Comparative Genomic Hybridization</i> .
CK	Citoqueratina. Acrónimo derivado de su nombre en inglés <i>Cytokeratin</i>
Cm	Centímetros.
CSCs	Células madre cancerígenas. Acrónimo derivado de su nombre en inglés <i>Cancer Stem Cells</i> .
CTCs	Células tumorales circulantes. <i>Circulating Tumor Cells</i> .
DMSO	Dimetil Sulfoxido
DTCs	Células tumorales diseminadas. Acrónimo derivado de su nombre en inglés <i>Disseminated Tumor Cells</i> .
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.

Abreviaturas

EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico. Acrónimo derivado de su nombre en inglés <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> .
EMT	Transición epitelio-mesénquima. Acrónimo derivado de su nombre en inglés <i>Epithelial Mesenchymal Transition</i> .
EpCAM	Molécula de adhesión de células epiteliales. Acrónimo derivado de su nombre en inglés <i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i> ,
FDA	Administración de Drogas y Alimentos. Acrónimo derivado de su nombre en inglés <i>Food and Drug Administration</i> .
FICTION	Técnica para inmunofenotipado y análisis genético de células mediante fluorescencia. Acrónimo derivado de su nombre en inglés <i>Fluorescence Immunophenotyping and Interphase Cytogenetics</i> .
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i> . Acrónimo derivado de su nombre en inglés <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i> .
FITC	Isotiocianato de fluoresceína. Acrónimo derivado de su nombre en inglés <i>Fluorescein Isothiocyanate</i> .
G	Fuerza G.
HER2	Gen del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano. Acrónimo derivado de su nombre en inglés <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i> .
HER2+	Gen HER2 amplificado.

ICC	Técnica de inmunocitoquímica. Acrónimo derivado de su nombre en inglés <i>Immunocytochemistry</i> .
IF	Técnica de inmunofluorescencia.
Ig	Inmunoglobulina.
IHC	Técnica de inmunohistoquímica. Acrónimo derivado de su nombre en inglés <i>Immunohistochemistry</i> .
IL	Interleucina.
KDa	Kilo dalton.
M0	Pacientes que no presentan metástasis a distancia.
M1	Pacientes que presentan metástasis a distancia.
MACS	Sistema de enriquecimiento inmunomagnético por clasificación celular. Acrónimo derivado de su nombre en inglés <i>Magnetic-Activated Cell Sorting</i> .
µm	Micrómetro.
µL	Microlitro.
min	Minutos.
mL	Mililitro.
mm	Milímetros.

Abreviaturas

MRD	Enfermedad mínima residual. Acrónimo derivado de su nombre en inglés <i>Minimal Residual Disease</i> .
nm	Nanómetros.
NS	No significativo.
N0	Nódulos negativos para la detección de células tumorales.
N1/N2/N3	Nódulos positivos para la detección de células tumorales.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
OS	Supervivencia global. Acrónimo derivado de su nombre en inglés <i>Overall Survival</i> .
PB	Sangre periférica. Acrónimo derivado de su nombre en inglés <i>Peripheral Blood</i> .
PBS	Tampón fosfato-salino. Acrónimo derivado de su nombre en inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i> .
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa. Acrónimo derivado de su nombre en inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i> .
RH	Receptores hormonales.
RE	Receptor de estrógenos.
RP	Receptor de progesterona.
r.p.m.	Revoluciones por minuto.

RPMI	Medio de cultivo celular. Acrónimo derivado de su nombre en inglés <i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i> .
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.
T (0-4)	Tamaño tumoral.
TNM	Sistema de clasificación tumoral por Tamaño del tumor-afectación de los Nódulos linfáticos- Metástasis a distancia.
TOPO II α	Gen de la topoisomerasa II alfa humana.

REACTIVOS

Acético glacial

Acetona

Agua MiliQ

Anticuerpo anti-citoqueratina

Anticuerpo anti-citoqueratina-alcalin fosfatasa

Antígeno primario: CK AE1/AE3 (isotipo IgG1)

Antígeno secundario: Antimouse IgG1 Rabbit conjugated

Antígeno terciario: Antirabbit IgG Goat alexa 488

Bicarbonato sódico 7.5%

Cell freezing medium (Sigma)

DAPI o Antifade (en función de color del fluorocromo empleado en el revelado)

DMSO

EDTA

Etanol

Ficoll 1119 g/ml (Sigma)

Fixogum

Formaldehído

Hematoxilina tipo Mayer's

Hepes buffer 1M

IGpack

Kit Carcinoma Cell Enrichment and Detection (Miltenyi Biotec)

Metanol

Reactivos

Penicilina-estreptomina

Piruvato sódico

RPMI 1640 1x (GIBCO)

RPMI 1640 1x o similar.

Sondas ADN: HER2/TOPO2/CEPT17 (Kreatech)

SSC

Suero Bovino Fetal (SBF)

Sustrato de fosfatasa alcalina: Fast Red/Naphtol

Tampón fosfato (PBS) al 1x

Tripsina

TRIS-CLH

Trypple Express™

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA GLANDULA MAMARIA

La glándula mamaria, constituye un órgano característico de los mamíferos, se presenta como una pareja de órganos glandulares situados en la pared anterior del tórax sobre el músculo pectoral mayor y parte del músculo serrato mayor. Se extiende desde la segunda hasta la sexta costilla en el plano vertical y desde la cara lateral del esternón hasta la línea axilar anterior homolateral en el plano horizontal.

La mama está formada por piel, tejido celular subcutáneo y tejido mamario (formado por elementos glandulares y ductales, en la mama madura).

La cara superficial está cubierta por piel. En el centro de esta cara se encuentra el pezón rodeado por una zona de piel hiperpigmentada denominada areola.

Los elementos glandulares están formados por conductos secretores y acinos, que constituyen las unidades terminales de un sistema ductal que se ramifica en 10 conductos mayores; galactóforos, que desembocan en el pezón.

La glándula mamaria está formada por tejido glandular de tipo túbulo-alveolar, tejido conjuntivo (que conecta los lóbulos), tejido adiposo (que ocupa los espacios interlobulares), vasos sanguíneos y conductos lactíferos. El tejido celular subcutáneo rodea la glándula sin que exista una cápsula claramente definida, desde éste se dirigen hacia el interior numerosos tabiques de tejido conectivo. Un conjunto de quince a veinte lóbulos mamaros conforman la glándula mamaria, cada uno con su aparato excretor, que se abren en el pezón por medio de un conducto lactífero, constituyendo un sistema excretor. Los lobulillos están formados por un número de acinos comprendidos entre diez y cien, cada cual con su conducto excretor denominado conducto terminal. Los acinos están estructurados por un conjunto de células secretoras que producen la secreción láctea y conforman una cavidad a la cual vierten esta secreción,

Introducción

están rodeados de células mioepiteliales y capilares sanguíneos de singular importancia en el proceso de secreción y eyección de la leche.

El sistema de conductos lactíferos que vacía la glándula mamaria es el siguiente: el acino se vacía a través de un conducto terminal, el cual converge con sus congéneres para formar el conducto lobulillar, que recoge la secreción láctea de todos los acinos de un lobulillo. Los conductos lobulillares se reúnen para formar el conducto interlobulillar, que al unirse con otros conductos de este tipo, forma el conducto lobular o segmentario, de mayor calibre que los anteriores, que se dirige al pezón y antes de llegar a él, bajo la areola mamaria, se dilata formando el seno lactífero, el que se angosta nuevamente al desembocar en el pezón.

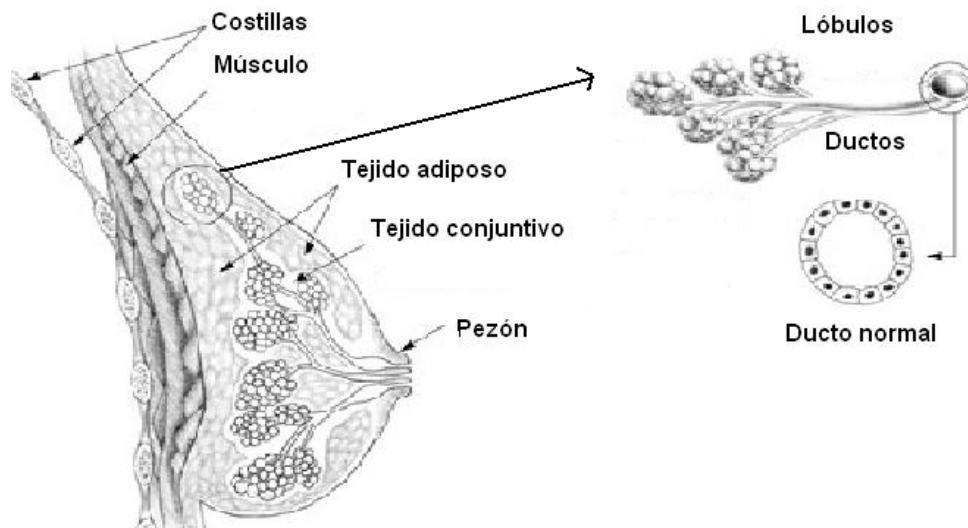


Ilustración 1: Anatomía de la mama

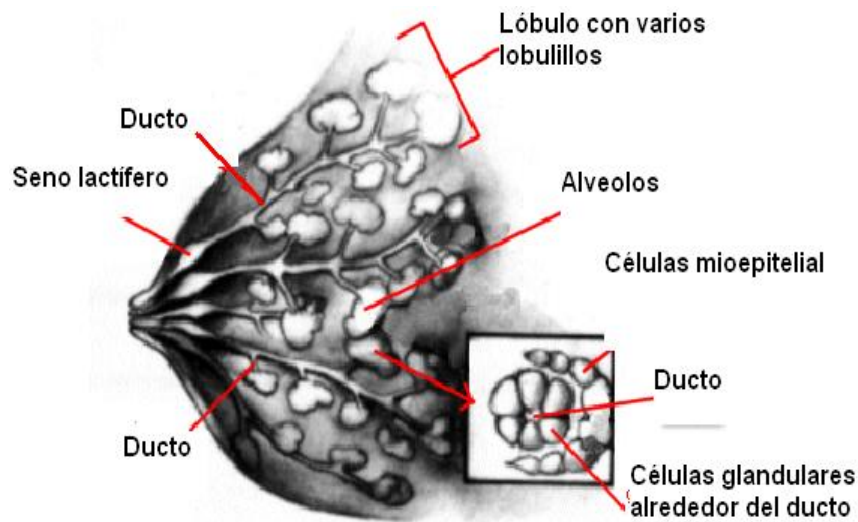


Ilustración 2: Sistema de conductos lactíferos

Los conductos están revestidos por epitelio cuboideo o cilíndrico. Por fuera de este epitelio, entre él y la membrana basal, existe una capa de células mioepiteliales muy ramificadas, que envuelven a los conductos y acinos. En los conductos de mayor tamaño el epitelio consta de dos o más capas de células que cerca del orificio externo del pezón se transforman en epitelio plano estratificado.

La mama está vascularizada por la arteria mamaria interna y las arterias torácicas laterales. Con respecto al sistema linfático, el plexo subepitelial de la mama confluye con la red de vasos linfáticos subepiteliales que se extienden por el tórax, cuello y abdomen. Los vasos linfáticos de la mama drenan a los ganglios axilares, pectorales, infraclaviculares y cadena mamaria interna.

La estructura de la glándula mamaria varía con la edad y es influenciada por el embarazo y la lactancia. Antes de la pubertad, la mama posee unos pocos conductos rudimentarios cubiertos en su interior epitelio plano y envuelto en tejido conectivo. Después de la pubertad, debido a la influencia de las hormonas ováricas, especialmente los estrógenos, los conductos se comienzan a ramificar y en sus extremos se forman pequeñas masas sólidas, esféricas, de células poliédricas, que constituirán los alveolos. Durante el estado de reposo, el epitelio glandular está separado del estroma vascularizado vecino por una fina zona de fibroblastos, a través de

Introducción

los cuales no penetran vasos. Esta unión epitelio-estroma, posiblemente, ejerce un control sobre el paso de sustancias a las células secretoras. Los alveolos activos sólo aparecen durante el embarazo, periodo en el cual, los conductos se ramifican y en su parte terminal se forma un lumen que aumenta de tamaño a medida que se va cargando de secreción.

Después de la menopausia la glándula mamaria se atrofia y los elementos celulares de los alveolos y conductos degeneran y disminuyen en número.

1.2 EL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama, también conocido como carcinoma de mama, es una neoplasia maligna originada por la proliferación acelerada e incontrolada de células malignas en el tejido mamario.

1.2.1 Epidemiología

Anualmente se detectan en España más de 16.000 nuevos casos de cáncer de mama que afectan a mujeres de edades comprendidas entre los 35 y 45 años. El cáncer de mama es un problema de salud pública muy importante, tanto por su alta incidencia como por la mortalidad que ocasiona.

En nuestro país el cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente en la población femenina española, representa entre el 23-28% de todos los tumores incidentes y la primera causa de muerte por cáncer, con una tasa de mortalidad de 28,8 por cada 100.000.

A nivel mundial se han visto importantes diferencias en la incidencia y mortalidad entre países. Siendo los países occidentales donde hay mayor incidencia de la enfermedad (Inglaterra, Noruega, Suecia, Dinamarca, EEUU, Holanda y Canadá) (Malvezzi, Bertuccio et al. 2013) y los de baja incidencia son los países asiáticos (China y Singapur), países del Caribe, América Central y América del Sur (Méjico, Costa Rica y Chile) (Key,

Verkasalo et al. 2001). Estas diferencias se atribuyen a factores relacionados con los estilos de vida y el desarrollo socio-económico.

1.2.2 Factores de riesgo

Muchos estudios han evaluado los posibles factores de riesgos asociados al cáncer de mama (McPherson, Steel et al. 2000), (Espie, Lalloum et al. 2013). Aunque son numerosas las causas a continuación se resumen algunos factores que implican una mayor predisposición:

- ✓ **Edad.** El riesgo de cáncer de mama se incrementa con la edad, siendo más frecuente entre las mujeres mayores de 50 años. La incidencia de la enfermedad aumenta con la edad hasta llegar a la menopausia que disminuye de un modo importante.
- ✓ **Edad de la menarquia y menopausia.** Se ha visto una asociación entre desarrollar cáncer de mama y la edad de la menarquia: mujeres con menarquia antes de los 12 años tienen mayor probabilidad de desarrollar la neoplasia que aquellas que desarrollaron por encima de los 14 años.

También las mujeres con menopausia natural después de los 55 años tienen mayor probabilidad de desarrollar cáncer de mama que las mujeres que la tienen antes de los 45 años.

- ✓ **Edad al nacimiento del primer hijo.** La nuliparidad y una edad tardía en el primer parto se comportan como factores de riesgo, incrementando la incidencia de la enfermedad. El riesgo se eleva entre las primíparas a partir de los 35 años.
- ✓ **Historia familiar.** Hasta la fecha se desconocen cuántos genes pueden estar implicados en el desarrollo del cáncer de mama. Cabe destacar los genes BRCA1 (situado en el cromosoma 17) y BRCA2 (situado en el cromosoma 13).
- ✓ **Radiaciones ionizantes.** Mujeres que han sufrido exposición a radiaciones ionizantes tienen mayor riesgo de padecer cáncer de mama, sobre todo si se reciben cuando la mama se está desarrollando.

Introducción

- ✓ **Factores hormonales.** Se cree que las hormonas desempeñan un papel importante en el desarrollo del cáncer de mama. Tanto los estrógenos como la progesterona unidos a sus receptores hormonales influyen en el crecimiento del tumor.
- ✓ **Estilos de vida.**
 - **Dieta.** Se sabe que hay una correlación poco consistente entre la incidencia de padecer cáncer de mama y la ingesta alimentaria. Hasta la fecha ningún nutriente estudiado de forma aislada se puede relacionar con el riesgo de padecer la enfermedad.
 - **Consumo de alcohol.** La asociación entre la ingesta de alcohol y un incremento del riesgo de cáncer de mama se ha establecido, pero no queda claro, se piensa que puede tratarse de un factor de confusión y que la asociación reside en la alimentación y otros hábitos de consumo (Scoccianti, Lauby-Secretan et al. 2014). Se ha comprobado que mujeres con consumo elevado de alcohol y receptores hormonales positivos (RE+/RP- ó RE+/RP+) tiene mayor riesgo de desarrollar la enfermedad.
 - **Tabaquismo.** No hay relación entre el hábito del tabaquismo y presentar la enfermedad.
 - **Peso.** Existe una asociación entre el índice de masa corporal y la tasa de mortalidad para cualquier tipo de cáncer. La obesidad se asocia con un aumento en el riesgo de cáncer de mama en las mujeres postmenopáusicas, con respecto a las premenopáusicas.
 - **Enfermedades benignas de la mama.** Se asocia con un incremento del riesgo de padecer cáncer de mama enfermedades benignas de la mama. Generalmente las lesiones no proliferativas, proliferativas sin atipia e hiperplasias atípicas.

1.2.3. Clasificación histológica del cáncer de mama

- ✓ **Carcinoma in situ (estadio 0).** Se define como la proliferación de células epiteliales malignas del tejido mamario sin capacidad de invasión de la membrana basal. Lesión preneoplásica y su incidencia ha incrementado en los últimos años debido a las campañas de detección precoz que se vienen realizando (Malmgren, Atwood et al. 2008). Según el lugar donde proliferan

las células epiteliales el carcinoma de mama in situ se clasifica en los siguientes tipos:

- **Carcinoma ductal in situ (CDIS).** Proliferación de las células malignas en el interior de los conductos mamarios sin sobrepasar la membrana basal (Silverstein 1998). Se considera lesión precursora ya que confiere riesgo de desarrollar cáncer infiltrante. En este tipo de carcinomas existe una prevalencia de mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 y expresión de fenotipo angiogénico (Claus, Petruzella et al. 2005), (Wulfing, Kersting et al. 2005). Su incidencia se ha incrementado hasta un 20% del total de los carcinomas de mama. En el 90% de los casos se diagnostica por la presencia de microcalcificaciones en la mamografía de mujeres asintomáticas.

Los carcinomas de mama se clasifican en tres grupos en función de las siguientes características: grado de atipia nuclear, presencia de necrosis, actividad mitótica y presencia de microcalcificaciones. Estos tres tipos son los siguientes:

CDIS de bajo grado: tumores con núcleos de grado bajo o intermedio y ausencia de necrosis.

CDIS de medio grado: tumores con núcleos de bajo grado pero con necrosis.

CDIS de alto grado: tumores con núcleos grandes y elevada mitosis con o sin necrosis.

Introducción

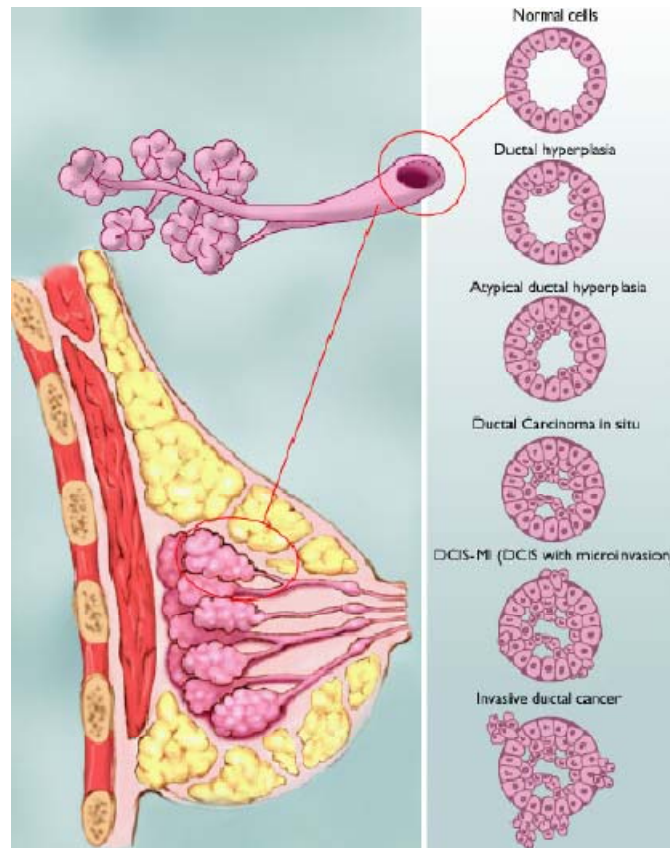


Ilustración 3: Tipos de carcinomas in situ

- **Carcinoma lobular in situ (CLIS).** Consiste en la proliferación de células pequeñas y poco adhesivas que se originan en el ducto-lobulillar terminal y pueden extenderse hasta el conducto terminal (Foote and Stewart 1941).

Es frecuente en mujeres de edades comprendidas entre los 40-50 años. Tiene una incidencia de entre el 1-3% de las biopsias de mama benignas. Es una lesión precursora del carcinoma invasivo.

✓ **Carcinoma invasivo.** Los carcinomas invasivos derivan de la transformación neoplásica del epitelio de la unidad terminal ductal-lobular de la mama. La OMS define 18 tipos histológicos siendo los siguientes los más frecuentes:

- **Carcinoma ductal infiltrante.** Es el más frecuente (40-70%). Se presenta formando cordones o grupos de células ductales que varían de tamaño, contenido citoplasmático y grado de diferenciación. La necrosis es rara pero puede darse invasión linfática.

- **Carcinoma tubular.** Se caracteriza por patrón de crecimiento en estructuras tubulares bien diferenciadas y tapizadas por una única capa de células. Suelen ser tumores menores de 2 cm y tienen buen pronóstico. La mayoría expresan receptores hormonales y no sobreexpresan el HER2.
- **Carcinoma cribiforme.** Son tumores de bajo grado citológico con expresión de receptores hormonales. Son muy poco frecuentes (0.8-3.5%).
- **Carcinoma mucinoso.** Se caracteriza por abundante moco extracelular en el que nadan grupos de células neoplásicas de bajo grado nuclear. La necrosis y la invasión linfática son raras y es más frecuente en mujeres de edad avanzada.
- **Carcinoma medular.** Es un tumor de alto grado citológico pero de buen pronóstico. Con baja frecuencia de metástasis ganglionar. Está asociado a la mutación del gen BRCA1, pero no al BRCA2.
- **Carcinoma lobulillar infiltrante.** Es un tumor con patrón de crecimiento difuso con células sueltas o en hileras y abundante estroma fibroso. Expresan receptores de estrógenos. Supone entre 5-15% de los carcinomas invasivos. Clínicamente se detecta como una masa palpable y en mamografía aparece distorsión arquitectural.

1.2.4. Clasificación molecular del cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea. Los tumores de mama tradicionalmente se han clasificado en distintas categorías en base a su estadio clínico, morfología celular y el análisis inmunohistoquímico.

Debido a la necesidad de factores pronósticos más precisos, que ayuden a clasificar las pacientes según el grupo de riesgo, para tomar decisiones terapéuticas más exactas y al desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular se ha podido determinar que existen varios subtipos de cáncer de mama con diferentes patrones de expresión genética y pronóstico (Cummings, Chambers et al. 2011).

Las técnicas de microarrays de DNA analizan grandes series de genes de tejidos tanto en fresco como congelado. También pueden analizarse pequeñas series de genes mediante la reacción en cadena de la polimerasa

Introducción

con transcriptasa inversa (RT-PCR) o incluso por técnicas de citogenética convencional y molecular (FISH y CGH). En base a las técnicas de microarrays de DNA, el cáncer de mama se divide en dos subgrupos dependiendo de la expresión o no del gen receptor de estrógenos (RE), el cual se ha observado como el mayor factor discriminador del subtipo molecular. Este patrón de expresión también persiste en sus metástasis.

El perfil de expresión genética reveló que dentro de los tumores RE+ existen dos subtipos: luminal (A y B) y subtipo HER2. Los tumores RE- comprenden al subtipo basal (Perou, Sorlie et al. 2000), (Prat and Perou 2010).

✓ **Tumores receptor estrogénico positivo.**

○ **Subtipo luminal.** Expresan receptores hormonales y tienen un patrón que concuerda con el componente epitelial luminal de la glándula mamaria. Expresan citoqueratinas 8 y 18 y genes asociados a su activación, LIV1 y CCND1. Menos del 20% de estos tumores tienen mutado el gen p53 y generalmente son de grado 1. Existen dos subtipos: luminal A y B. El tumor del subtipo luminal A es el más frecuente de los tumores de mama, tiene alta expresión de los genes relacionados con el RE y baja expresión de los genes relacionados con la proliferación celular comparado con el subtipo luminal B. El subtipo luminal B tiende a ser de más alto grado.

Los tumores luminales son de buen pronóstico, sin embargo, el luminal B tiene peor pronóstico que el A. Se debe a la variación en la respuesta al tratamiento. Estos tipos de tumores son tratados con hormonoterapia.

○ **Subtipo HER2.** Estos tipos de tumores tienen una alta proporción de mutaciones en el p53 y usualmente son de grado 3. La amplificación y sobreexpresión de HER2 en las células tumorales implica un pobre pronóstico debido a su alto riesgo de recaída temprana. Muestra mayor sensibilidad a quimioterapia neoadyuvante. Los tumores HER2+ son tratados con el anticuerpo monoclonal anti-HER2: trastuzumab, inhibidor de la proliferación celular, reduce la recurrencia de la enfermedad y aumenta la supervivencia de las pacientes.

✓ **Tumores receptor estrogénico negativo.**

○ **Subtipo basal.** Su patrón de expresión es semejante al de las células epiteliales basales y a las células mioepiteliales normales del tejido mamario. No expresan el gen receptor de estrógenos, ni el gen receptor de progesterona y tienen baja expresión de HER2. Son tumores con alta expresión de citoqueratinas 5, 6 y 17 y expresan de genes relacionados con la proliferación celular (EGFR). La expresión de EGFR se considera esencial para la migración de células cancerígenas y los procesos de intravasación. También están asociados a mutaciones en el gen BRCA1.

Mediante técnicas de inmunohistoquímica a este tipo de tumores se les conoce también como *triple negativo* o *subtipo basal* por no expresar receptores hormonales (para estrógenos y progesterona) ni HER2 y están asociados a un mal pronóstico de la enfermedad (Cheang, Voduc et al. 2008).

Son tumores muy agresivos, con mutaciones en el gen p53 y de alto grado.

Subtipo	Histología	Grado	RE	HER2	Características
Luminal A	CDI; lobular, tubular y cribiforme	1 ó 2	+	-	CK luminales + E-Cadherina +/-
Luminal B	CDI; microcapilar	2 ó 3	+/-	-/+	CK luminales + p53 mutaciones
HER2	CDI	2 ó 3	+/-	+	p53 mutaciones
Basal	CDI; medular, metaplásico, secretor y adenoide	3	-	-	CK basales + p53 mutaciones EGFR+/-

CDI: carcinoma ductal invasivo // La expresión del gen receptor de estrógenos y HER2 se hace mediante inmunohistoquímica // +: positivo. -: negativo. -/+: mayormente negativo. +/-: mayormente positivo.

Tabla 1: Clasificación molecular del cáncer de mama

1.2.5. Receptores de factores de crecimiento

Existen numerosos oncogenes que codifican para receptores de factores de crecimiento con actividad tirosin-kinasa mutados. La activación

Introducción

de estos receptores, mediante la activación por ligandos, va a desencadenar la activación de vías de señalización celular que desembocan en la proliferación descontrolada.

Las mutaciones que suelen afectar a estos oncogenes suelen ser: deleción del dominio extracelular, mutaciones puntuales que les confieren la propiedad de estar permanentemente activados y deleción del extremo carboxi-terminal haciéndole al receptor perder su capacidad reguladora.

El oncogén más relevante en el cáncer de mama es el HER2 que codifica para una proteína receptor de membrana de 185kD con actividad tirosin-kinasa. Se trata de una proteína de membrana que corresponde al receptor tipo-2 del factor de crecimiento epidérmico (de los 4 que existen) El oncogén se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 (q21) (Bartsch, Ziehermayr et al. 2010), (Isakoff 2010). La sobreexpresión de la proteína HER2 en las células tumorales se debe a la amplificación del gen y como consecuencia el aumento de la expresión del gen no mutado, con el subsiguiente incremento de la actividad tirosin-kinasa que induce transformación celular, crecimiento celular y progresión del tumor (Meng, Tripathy et al. 2004), (Salido, Tusquets et al. 2005). Esto ocurre en el 15-30% de los carcinomas de mama y se considera de mal pronóstico.

La amplificación del gen HER2 se determina mediante hibridación fluorescente in situ (FISH) y la expresión de su proteína se hace mediante inmunohistoquímica.

Otros oncogenes conocidos e implicados en el cáncer de mama son los genes; erbB-1, erbB-3 y erbB-4, codifican proteínas pertenecientes a la familia de los receptores tirosin-kinasa (miembros del subgrupo de los receptores del factor de crecimiento epidérmico EGFR) con dominios de membrana sencillos y dos dominios celulares ricos en cisteína. Los cuatro receptores se coexpresan en diferentes combinaciones en una gran variedad de tejidos excepto en el hematopoyético.

Mientras que el gen HER2 se expresa a concentraciones bajas en diversas células normales, en varios tipos de cánceres se sobreexpresa.

Generalmente esto se debe a la amplificación genética o al incremento del número de genes HER2 en el núcleo.

La significación del gen HER2 en el cáncer de mama es múltiple: evolución desde la lesión premaligna no invasiva (carcinoma in situ) hasta carcinoma metastásico. La sobreexpresión del erbB-2 se puede encontrar en todos los estadios del cáncer de mama, pero no se ha encontrado en lesiones benignas; esto sugiere que el gen no se amplifica antes de un verdadero estado maligno (Fehm, Becker et al. 2007), (Lang, Mosalpuria et al. 2009).

Próxima a la región que alberga el gen HER2 se localiza el gen de la topoisomerasa II α (TOPO II α). Se sabe que las líneas celulares que tiene amplificado el HER2 también presentan amplificación del gen y del producto proteico de la TOPO II α : esta amplificación hace que las células tengan unas tasas de topoisomerasa II seis veces superior a la normal. Curiosamente, las células con baja expresión del gen de la topoisomerasa II muestran gran resistencia al tratamiento con antraciclinas (Hannemann, Kristel et al. 2006). Por tanto el estudio del estado del gen TOPO II α tiene gran valor predictivo a la respuesta al tratamiento.

1.2.6. Marcadores de proliferación

La regulación de los procesos celulares como proliferación, diferenciación, apoptosis y ciclo celular se produce mediante señales externas a la propia célula.

Un elemento esencial para el correcto funcionamiento de órganos y tejidos es el equilibrio entre el número adecuado de células en proliferación y de células especializadas. Equilibrio que se logra mediante el triangulo de proliferación, diferenciación y apoptosis.

La activación de los receptores está regulada por moléculas extracelulares con factores de crecimiento, citoquinas y hormonas.

Los marcadores de proliferación celular están presentes en determinadas fases del ciclo celular.

- ✓ **Receptor de crecimiento epidérmico (EGFR).** El EGFR es una glucoproteína transmembrana característica de células de origen epitelial. Pertenece a una familia de receptores de factores de

Introducción

crecimiento con actividad tirosín quinasa: la unión de ligandos al receptor desencadena una serie de respuestas celulares que eventualmente desembocan en la proliferación celular. El gen del EGFR codifica 26 exones y se traduce en una proteína transmembrana de 170 kDa de tres dominios con diferentes funciones: un dominio extracelular para la unión al ligando, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático tirosín quinasa encargado de la transducción de señales.

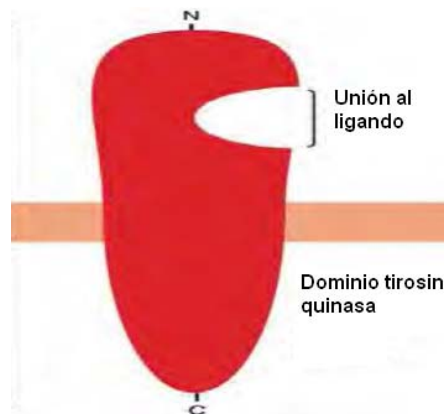


Ilustración 4: Receptor EGFR

La activación aberrante de esta vía de señales está implicada en procesos de proliferación celular aumentada, migración, evasión de la apoptosis, invasión tumoral y metástasis. Por todo ello el EGFR es una excelente diana terapéutica además de expresa con elevada frecuencia en una gran variedad de cánceres. Su expresión se asocia a enfermedad avanzada y a pobre diagnóstico clínico (Liu, Fusi et al. 2010), (Sauter, Lee et al. 2009).

1.2.7. Marcadores de células madre

Las células madre o *stem cells* son un tipo de células que tienen la virtud natural de poder convertirse en cualquiera de las variedades celulares que integran el organismo y tienen capacidad de autorregeneración. Existen dos tipos de células madre: progenitoras y cancerígenas (CSC), que derivan de una mutación en las células madre progenitoras.

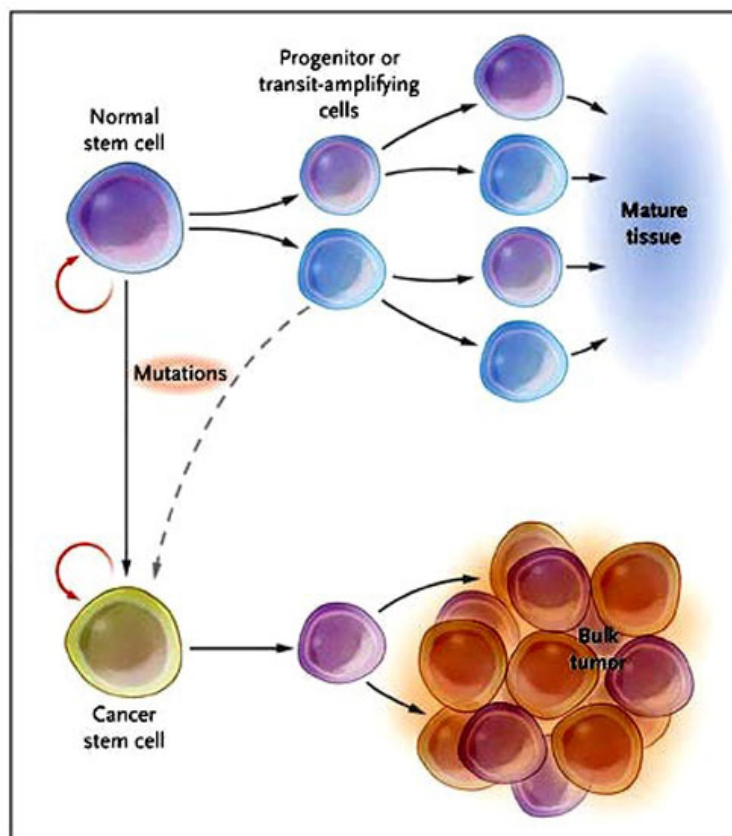


Ilustración 5: Cancer stem cells

Las CSC se definen como una población de células con capacidad para iniciar el tumor, reconstruir aspectos del tumor original, establecer metástasis a distancia y mediar en procesos de resistencia a la quimioterapia (Li, Lewis et al. 2008), (O'Brien, Kreso et al. 2010). Recientes estudios han asociado el proceso de transición de la barrera mesénquima-epitelio (EMT) con la adquisición de características propias de células madre en las CTCs (Mani, Guo et al. 2008), (Morel, Lievre et al. 2008).

En la mayoría de las neoplasias existen células madre cancerígenas que se pueden autorregenerar de forma indefinida, en contraste con las células madre que tienen un potencial proliferativo limitado (Vander Griend, Karthaus et al. 2008). Por eso, para tratar el cáncer es necesario poder destruir las células madre cancerígenas y caracterizar e identificar sus propiedades. La erradicación de estas unidades del tumor es esencial para la remisión estable y duradera del mismo.

El CD133 representa un importante marcador de superficie celular para la identificación de células madre, que puede ser detectado mediante el

Introducción

anticuerpo AC133. Se trata de una proteína glicosilada que se localiza en la superficie de células repobladoras, células progenitoras inmaduras y en células progenitoras de monocitos y de granulocitos. Su función, aunque no está totalmente caracterizada, parece estar relacionada con el mantenimiento de los estados primitivos de diferenciación (Wright, Calcagno et al. 2008), (Pece, Tosoni et al. 2010). También se le reconoce como identificador de células con potencial capacidad de iniciación tumoral en el caso de algunos cánceres como el glioblastoma, próstata (Vander Griend, Karthaus et al. 2008), colorrectal (Ricci-Vitiani, Lombardi et al. 2007) y mama (Schwab, Peacock et al. 2012).

Las células que expresan el marcador CD133 se caracterizan porque manifiestan propiedades típicas de CSC, tienen capacidad para autorrenovarse en cultivos celulares, pueden diferenciarse originando células propias del tumor original y participan en el mimetismo vascular (Kirschmann, Seftor et al. 2012). Estas células están presentes en la sangre del cordón umbilical, en la médula ósea y en sangre periférica de adultos, provenientes posiblemente de la médula ósea y movilizadas por la acción del Factor Estimulante de Colonia Granulocítica (FECG) y del Factor de células madre (*stem cell factor*).

1.2.8. Factores pronóstico y predictivos

Una vez diagnosticado el cáncer de mama, los factores pronósticos y predictivos son decisivos a la hora de tomar decisiones sobre el manejo y tratamiento de la enfermedad (Cianfrocca and Goldstein 2004).

Se considera factor pronóstico a cualquier parámetro que se asocie con una determinada supervivencia, ya sea global o libre de enfermedad, en ausencia de tratamiento adyuvante.

Se considera factor predictivo a cualquier valor asociado al grado de respuesta a un tratamiento específico.

✓ Factores pronóstico.

- **Edad.** Las pacientes más jóvenes tienen peor pronóstico que las de edad intermedia. Algunos estudios indican que las mujeres menores de 35 años presentan tumores más agresivos, más indiferenciados, con ganglios afectados y receptores hormonales negativos (Espie, Lalloum et al. 2013).

- **Afectación ganglionar.** Éste es el factor pronóstico más significativo en los estadios precoces de la enfermedad. Existe relación directa entre el número de ganglios afectados y el riesgo de diseminación metastásica y supervivencia. La supervivencia, recidiva y fracaso en el tratamiento se correlacionan con el número de ganglios axilares positivos (Fisher, Bauer et al. 1983), (Hugh, Hanson et al. 2009).

El estado de los ganglios se divide en cuatro grupos diferentes según sean negativos (N0): la supervivencia a 10 años es del 76%, positivos de 1 a 3 (N1): disminuye la supervivencia al 25%, positivos de 4 a 9 (N2) e igual o mayor que 10 (N3). El riesgo de recaída en ganglios positivos es lo suficientemente elevado como para establecer un tratamiento adyuvante.

- **Tamaño tumoral.** Es el factor pronóstico más relevante. Es necesario medir exhaustivamente el tumor en al menos 2 dimensiones, empleando la medida mayor para establecer la estadificación (T). Hay relación directa entre el tamaño tumoral y la probabilidad de metástasis ganglionares axilares (Rosen, Saigo et al. 1981).

El tamaño tumoral se utiliza de forma rutinaria como factor pronóstico para seleccionar el tratamiento adyuvante. Para tumores mayores de 1-2 cm con riesgo de recidiva mayor o igual al 20% se aconseja tratamiento adyuvante (Fisher, Dignam et al. 2001).

- **Grado histológico.** Numerosos estudios han demostrado que hay peor pronóstico en los tumores poco diferenciados, independientemente de la afectación ganglionar y del tamaño tumoral (Le Doussal, Tubiana-Hulin et al. 1989)

Los sistemas de graduación tumoral valoran tres factores: 1) grado de formación de túbulos, 2) regularidad en el tamaño, forma, carácter de tinción del núcleo y 3) hiperchromasia nuclear y actividad mitótica. Basado en la evaluación subjetiva de estos hallazgos los tumores se clasifican como de bajo, moderado o alto grado de malignidad.

Introducción

○ **Afectación metastásica.**

Estadio	Características
I	< 2cm, ganglios no afectados
II	<2cm, ganglios afectados Entre 2-5cm, ganglios afectados o no >5cm, ganglios no afectados
III	<5cm, ganglios afectados
IV	Metástasis en huesos, cerebro, pulmón, hígado, etc.

Tabla 2: Características tumorales

○ **Receptores hormonales.** Los estrógenos y progestágenos son hormonas esteroideas implicadas en el crecimiento, diferenciación y supervivencia del epitelio mamario. Son de crucial importancia en el desarrollo de las neoplasias mamarias durante los años reproductivos (Cianfrocca and Goldstein 2004), (Hammond, Hayes et al. 2010). Se ha observado que la concentración de receptores esteroideos en tejido maligno es 15 veces superior a la del tejido normal. Su activación se relaciona con un aumento de la replicación celular. Los estrógenos y progestágenos actúan a través de receptores nucleares compuestos dos por subunidades (α y β). La presencia de receptores hormonales para estrógenos y progesterona se ha asociado a un moderado mejor pronóstico. La ausencia de receptores se asocia con mayor frecuencia a diseminación a distancia en enfermas sin afectación ganglionar. Por lo que la determinación de receptores en las biopsias de carcinomas antes del comienzo del tratamiento se ha hecho una práctica habitual.

Aproximadamente entre el 55-65% de los carcinomas primarios de mama son receptores estrogénicos positivos (RE+). También se ha demostrado que responden a terapia hormonal.

Aproximadamente el 45-60% de los cánceres de mama expresan receptores de progesterona (RP+), lo que aumenta la probabilidad de respuesta a tratamientos hormonales.

La pérdida de receptores hormonales por las células tumorales está asociada con peor pronóstico.

- **HER2.** Es el oncogén más relevante identificado en el cáncer de mama. El mecanismo por el que tiene lugar la oncogénesis se regula por un aumento de la expresión del receptor no mutado y por tanto de la actividad tirosin-kinasa, que se refleja en la inducción a la transformación celular.

La amplificación del gen HER2 se encuentra en el 30% de los cánceres de mama y se asocia a peor pronóstico, pobre grado histológico, extensión a ganglios axilares y al número de ganglios afectados (Cheang, Chia et al. 2009). También se relaciona con resistencia a diversos agentes quimioterápicos y hormonales. Además, la amplificación del oncogén HER-2 se correlaciona con la ausencia de receptores estrogénicos y de progesterona.

Se ha comprobado que si un tumor primario no expresa la proteína, las subsiguientes metástasis pueden expresarla; por el contrario, si un tumor primario expresa dicha proteína, esta capacidad se mantiene en todas las metástasis del tumor.

ESTADIFICACIÓN TNM	
T0	No hay evidencia del tumor
T1	Tumor primario inferior de 2cm
T2	Tumor primario de entre 2-5cm
T3	Tumor primario mayor de 5cm
T4	A: invade pared costal / B: invade piel / C: invade piel y pared / D: carcinoma inflamatorio
N0	Ausencia de ganglios afectados
N1	1-3 ganglios axilares afectados
N2	4-9 ganglios axilares afectados
N3	≥10 ganglios axilares afectados
M0	Ausencia de evidencia de metástasis
M1	Metástasis a distancia

Tabla 3: Clasificación del tumor en base al sistema TMN

- ✓ **Factores predictivos.**
 - **Receptores hormonales.** Los tumores con expresión de receptores hormonales para estrógenos (RE) y progesterona (RP) pueden ser tratados

Introducción

con hormonoterapia en todos los estadios de la enfermedad. Aunque un alto porcentaje no responden a la hormonoterapia o desarrollan resistencia.

○ **HER2.** La amplificación del gen se ha asociado con un índice bajo de respuesta a quimioterapia. Por otra parte se asocia con la resistencia a tratamientos quimioterápicos y hormonales en el cáncer de mama avanzado. El tamoxifeno; actúa bloqueando el receptor de estrógenos, es el tratamiento de elección de primera línea en el cáncer de mama metastásico en pacientes de edad avanzada y sin metástasis. La efectividad del tamoxifeno es inferior en las pacientes que sobreexpresan HER2.

La amplificación del gen se considera factor predictivo de respuesta al anticuerpo tratuzumab al asociarse a quimioterapia, implica mayor control de la enfermedad.

○ **TOPO II α .** Este gen se sitúa en el brazo largo del cromosoma 17. La amplificación del gen TOPO II α , al contrario de lo que se defendió hasta hace poco, no siempre está ligada a la amplificación del gen HER2. Las topoisomerasas son enzimas que controlan y modifican la estructura del DNA mediante su actividad nucleasa y ligasa-helicasa. En las células humanas existen dos isoformas (α y β) codificadas por dos genes ubicados en cromosomas diferentes; siendo la isoforma α la única que está implicada en el ciclo celular, en procesos de superenrollamiento del DNA y en el apareamiento y segregación de los cromosomas durante la división celular. Se ha comprobado claramente que los niveles de TOPO2A están elevados en las células inducidas a diferenciarse: por ello es considerada como marcador de proliferación celular.

○ **Márgenes de resección.** El estado de los márgenes de resección es un buen indicador del riesgo de recidiva local. La distancia del tumor a los márgenes se mide en milímetros:

- Margen negativo: tumor separado del margen por 1 mm o más del estroma fibroadiposo.
- Margen próximo: distancia inferior a 1 mm.
- Margen positivo: menos de tres focos del tumor están en contacto con el margen de resección.

1.2.9. Tratamiento sistémico del cáncer de mama en estadio precoz

El desarrollo clínico del cáncer de mama (localizado, avanzado y metastásico) se clasifica en estadios según el sistema internacional TNM (tamaño tumoral, afectación ganglionar y afectación metastásica). El pronóstico del desarrollo de la enfermedad y las pautas de tratamiento a seguir se basan en esta clasificación por estadios.

ESTADIO	CLASIFICACION TNM
I	T1/N0/M0
II	T0/N1/M0 // T1/N1/M0 // T2/N0/M0
IIB	T2/N1 // T3/N0
IIIA	T0N2M0 // T1N2M0 // T2N2M0 // T3N1M0 // T3N2M0
IIIB	T4N0M0 // T4N1M0 // T4N2M0
IIIC	Cualquier T-N3M0
IV	Cualquier T – Cualquier N – M 1

Tabla 4: Estadios de la enfermedad

Se considera que ha habido progresión de la enfermedad cuando el tumor crece o aparece metástasis en algún órgano distante.

El cáncer de mama puede ser abordado desde dos vías: tratamiento locorregional del tumor (cirugía: conservativa o mastectomía y radioterapia) y/o tratamiento sistémico (quimioterapia, hormonoterapia e inmunoterapia). El tratamiento más común es la cirugía, seguido de tratamiento adyuvante. La aplicación de tratamiento sistémico se orienta a destruir mediante citotóxicos las posibles micrometástasis a distancia que puedan existir después del tratamiento quirúrgico antes de que se hagan patentes. Las pautas de aplicación de los tratamientos sistémicos son dos: neoadyuvancia y adyuvancia. Neoadyuvancia es toda aquella terapia que se prescribe antes de la cirugía, con el objetivo de disminuir el tamaño del tumor y practicar así una cirugía más conservadora y también para conseguir que un tumor que por su tamaño o extensión no es quirúrgico pase a serlo. En cuanto al concepto de adyuvancia es toda aquella terapia que se utiliza después de la cirugía.

Introducción

✓ **Tratamiento sistémico.**

○ **Quimioterapia.** Este tipo de tratamientos se aplica cuando se detectan micrometástasis en los estadios iniciales del tumor con la finalidad de reducir el riesgo de recaída y muerte. Y a pacientes con metástasis en los nódulos linfáticos (N1) o tumores primarios mayores de 1cm (Li, Lewis et al. 2008).

○ **Radioterapia.** Consiste en la aplicación de energía radiante para eliminar células tumorales.

○ **Hormonoterapia.** La hormonoterapia fue el primer tratamiento sistémico frente al cáncer de mama diseñado contra una diana específica: receptores de estrógenos o progesterona. La proteína del gen receptor de estrógenos la diana seleccionada, tanto en los estadios iniciales como en los casos de enfermedad avanzada, puesto que está presente en el 75% de los tumores de mama. Las vías de acción de estos tratamientos hormonales son los siguientes:

- Disminuyendo la producción de estrógenos por ablación ovárica o mediante inhibidores de la aromatasa.
- Modulando el receptor de estrógenos: actuando como agonistas o como antagonistas. El más comúnmente usado en oncología es el tamoxifeno (Treeck, Wackwitz et al. 2006)

○ **Inmunoterapia.** La diana contra la que va dirigida este tratamiento biológico es la proteína de membrana resultante de la expresión del gen HER2. Esta indicado contra tumores que sobreexpresan HER2+. Este tipo de tratamiento inmunológico utiliza el anticuerpo monoclonal denominado trastuzumab (Herceptin®), que actúa uniéndose a la proteína de membrana e inhibiendo la proliferación celular, fue la primera terapia dirigida específicamente contra las células tumorales sin afectar a las células normales.

También hay tratamientos anti-EGFR como: Cetuximab, Gefitinib y Erlotinib.

1.2.10. Diseminación tumoral

El proceso de diseminación tumoral es una de las principales características de los tumores con capacidad invasiva. Las células de los

tumores malignos tienen capacidad de diseminarse por vía sanguínea y/o linfática, como en el caso del cáncer de mama, y anidar en otros órganos dando lugar al desarrollo de tumores secundarios. Este proceso, denominado metástasis, supone la principal causa de muerte debida al cáncer.

El proceso metastásico puede ocurrir desde estadios muy tempranos del desarrollo del tumor; pudiendo desembocar posteriormente en el establecimiento de nuevos focos tumorales originado así la enfermedad metastásica (Coghlin and Murray 2010).

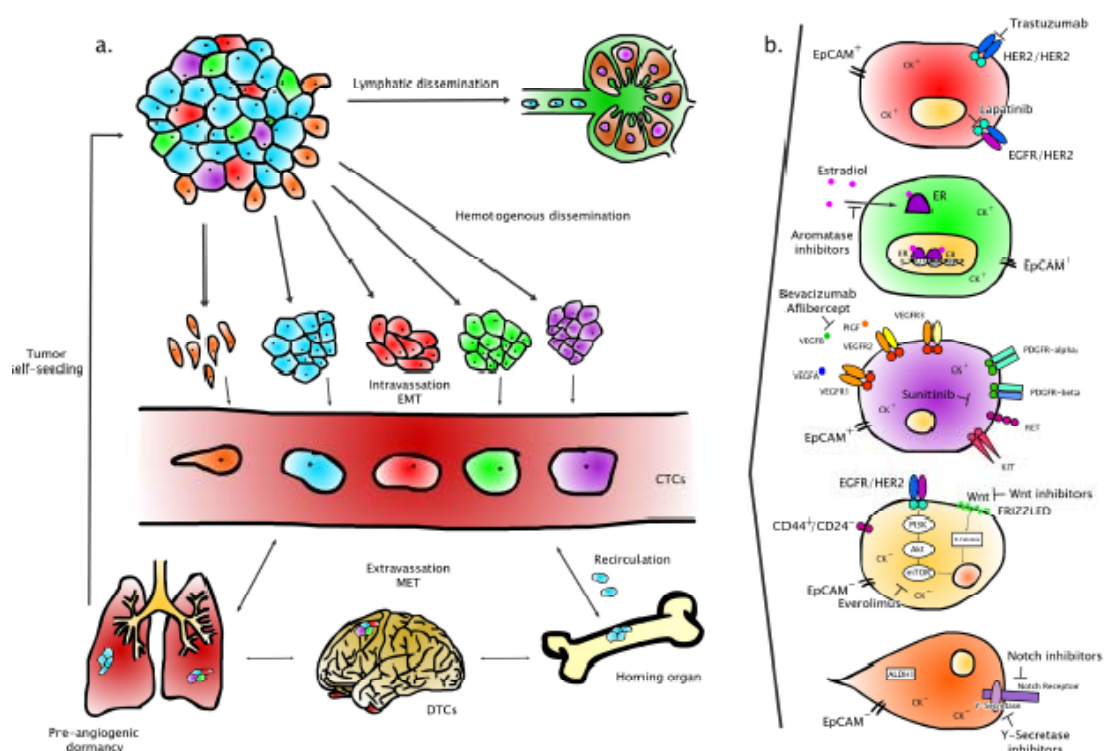


Ilustración 6: Diseminación tumoral

Las etapas que dan lugar al desarrollo de la metástasis son las siguientes: en primer lugar, las células se desprenden del tumor primario penetran la membrana basal del tumor, infiltran el estroma subyacente, entran en microcirculación, bien vía linfática o vía sanguínea.

Las células viajan a través del sistema circulatorio (sangre o linfa) y se distribuyen pasivamente en órganos distantes deteniéndose en los vasos más pequeños. En determinadas ocasiones estas células pueden tener

Introducción

capacidad para extravasar los capilares e invadir un órgano diana donde se adaptarán al microambiente para vivir en él (Gupta and Massague 2006).

Durante el proceso metastásico, gran parte de las células diseminadas serán eliminadas por el sistema inmune y otra parte de éstas permanecerán en un proceso denominado estado de latencia; celular o tumoral (Monteiro and Fodde 2010).

Para que se produzca el crecimiento de la metástasis en el órgano diana, primero debe vascularizar. En este proceso se rompe el equilibrio entre factores pro y antiangiogénicos secretados por el tumor y el microambiente. Así las células tumorales con capacidad proliferativa formarán una micrometástasis y posteriormente metástasis detectables clínicamente.

Los pasos para la formación de metástasis son los siguientes:

A) Disociación e intravasación de las células tumorales.

Un epitelio normal mantiene su estructura gracias a las uniones intercelulares (uniones GAP y desmosomas) que mantienen a sus células íntimamente conectadas. Las células mantienen su estructura gracias a los filamentos de actina y filamentos intermedios de su citoesqueleto.

Las cadherinas son moléculas de adhesión, proteínas transmembrana dependientes de calcio. Para que las células tumorales puedan iniciar el proceso de invasión deberán romper las fuerzas que mantienen la adhesión celular y atravesar el epitelio vascular para pasar al torrente circulatorio.

La rotura de las fuerzas de unión se debe a la modificación en la adhesión. El cambio más importante es la pérdida de la adhesión mediada por E-cadherina. A su vez en el proceso intervienen proteasas, proteínas con actividad proteolítica, que permite a las células tumorales cruzar la matriz intersticial y llegar al sistema vascular. Las moléculas implicadas en el proceso son: las metaloproteasas de la matriz (MMP), el sistema activador del plasminógeno y su receptor.

La interleucina-8 (IL-8) es otra molécula clave en la progresión tumoral. Sus niveles se regulan por factores microambientales como la hipoxia, la acidosis, el óxido nítrico y la densidad celular, actuando como factor

mitogénico y angiogénica frente a estas situaciones. El nivel de expresión de IL-8 regula directamente la neovascularización inducida por el tumor, el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis.

B) Angiogénesis.

El crecimiento del tumor primario y de la metástasis sólo es posible si se produce una neovascularización; que asegure la distribución de oxígeno y nutrientes al tejido, y un sistema excretor para eliminar los metabolitos de desecho.

El proceso de angiogénesis comienza con la degradación de la membrana basal que rodea los capilares locales, sigue con la invasión del estroma por las células endoteliales. Los nuevos vasos que se van formando muestran diferencias respecto a los normales: tienen arquitectura más desordenada e irregular, con áreas de hipoxia y acidosis. Las membranas de las nuevas células endoteliales son más permeables y los marcadores de superficie y las moléculas de adhesión son diferentes, esto permite la selección de dianas para terapias antiangiogénicas. Entre las moléculas implicadas cabe destacar el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR), el factor de crecimiento fibroblástico básico (FGFb) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

1.2.10.1 Diseminación tumoral linfática

Las células del tumor primario penetran en un vaso linfático, que carece de membrana basal y son transportadas por la linfa hasta un ganglio linfático donde proliferan formando una metástasis ganglionar linfática. La mayoría de las células tumorales que llegan al ganglio son destruidas por el sistema inmune y no pueden llegar a formar metástasis. La afectación de los ganglios linfáticos se considera de mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama (Reed, Rosman et al. 2009).

1.2.10.2 Diseminación tumoral sanguínea

Las células tumorales invaden los tejidos adyacentes al tumor primario hasta penetrar en la pared de algún vaso sanguíneo pequeño. Lo que

Introducción

conlleva a la recurrencia local por la “autosiembra tumoral” (Kim, Oskarsson et al. 2009), (Langley and Fidler 2011).

Cuando la célula tumoral alcanza el torrente sanguíneo tiene que superar varios obstáculos: la apoptosis y la actividad del sistema inmune. Las células tumorales escapan de la apoptosis porque experimentan alteraciones en las integrinas y moléculas implicadas en la señalización (proteínas reguladoras de apoptosis). Las células tumorales pueden enmascarar antígenos de superficie que son reconocidos por los linfocitos.

1.2.10.3 Diseminación tumoral linfática versus diseminación sanguínea

La mayoría de los tumores se expanden vía linfática y son los ganglios linfáticos la zona más común donde el tumor disemina.

La causa de que el tumor se expanda a los ganglios puede deberse a que éstos son filtros muy eficientes con gran capacidad adhesiva, debido a la acción de los linfocitos T. Esta característica permite a las células tumorales invadir y proliferar en los ganglios linfáticos.

A pesar de la facilidad de diseminación vía linfática, también puede ocurrir simultáneamente por vía sanguínea.

La destrucción de células tumorales en los ganglios linfáticos no es tan exitosa como la destrucción en el flujo sanguíneo.

Probablemente se deba a que las células tumorales en los ganglios puedan usar los mismos mecanismos de migración y adhesión que las células del sistema inmune cuando responden a un antígeno.

1.2.11. Células tumorales circulantes (CTCs)

El término Enfermedad Mínima Residual (MRD) hace referencia a la presencia de células tumorales después del tratamiento. Estas células no son detectables por los métodos convencionales y son el origen de futuras metástasis (Pantel and Brakenhoff 2004). Resulta muy interesante la detección y caracterización de estas CTCs a la hora de aplicar terapias

dirigidas o individualizadas a cada paciente (Pierga, Bonneton et al. 2004), (Bidard, Mathiot et al. 2010). Las células tumorales se pueden acantonar en:

- Ganglios linfáticos; células tumorales aisladas, influyen en la clasificación TMN del tumor (Sakorafas, Geraghty et al. 2004). Su detección se hace mediante técnicas de tinción con hematoxilina-eosina, inmunohistoquímica o técnicas de biología molecular.
- Médula ósea; células tumorales diseminadas (Braun and Pantel 2000), (Janni, Rjosk et al. 2000).
- Sangre periférica: células tumorales circulantes (Cristofanilli, Budd et al. 2004).

Los tumores son sistemas biológicos heterogéneos que pueden contener subpoblaciones de células con diferente capacidad angiogénica, invasiva y características de células madre, es decir, potencial de crecimiento indefinido (Huang, Heidt et al. 2007). Las células tumorales se caracterizan por tener capacidad de autorrenovación, división asimétrica, resistencia a la apoptosis, crecimiento independiente y capacidad metastásica (Talmadge 2010). Hasta la fecha se desconocen cuales son las alteraciones genéticas que contribuyen a la diseminación tumoral.

El paradigma de las carcinogénesis define la metástasis como un proceso que implica el paso de células tumorales circulantes (CTCs), a través de la sangre o linfa, desde el órgano donde se desarrolla el tumor primario hasta un órgano diana distante y sin relación anatómica directa con el órgano donde se originó la neoplasia (Braun, Vogl et al. 2005)

La teoría más aceptada de la formación de la metástasis es que un grupo de células del tumor primario se diseminan y tienen capacidad para permanecer en estado de latencia; es decir, no proliferan ni entran en apoptosis haciendo resistencia a terapias que actúan inhibiendo la división celular (Minn, Kang et al. 2005). Los mecanismos que regulan la transición de estas células desde su estado latente e indetectable clínicamente a un estado progresivo de crecimiento constituyen una de las áreas más desconocidas en la biología del cáncer.

Introducción

La presencia de células tumorales circulantes es considerada como un factor indicativo de diseminación hematógica con un considerable significado pronóstico en la posible formación de metástasis. Y es, por tanto, por lo que la presencia de CTCs en sangre periférica de pacientes de cáncer de mama no metastásicas se asocia a un mal pronóstico de la enfermedad (Pierga, Bidard et al. 2008).

Recientes estudios revelan que estas células pueden presentar características de células madre, al parecer pueden desempeñar un papel crucial en la iniciación y progresión del cáncer, así como la resistencia a tratamientos quimioterápicos (Fidler 2003).

Hasta la fecha la investigación del cáncer se ha centrado principalmente en dos ámbitos: 1) el tejido donde se desarrolla la neoplasia (microambiente primario) y 2) el tejido donde se desarrolla la metástasis (microambiente metastásico). La etapa intermedia es la diseminación de las células tumorales; etapa no detectable por los métodos clínico-patológicos convencionales. Podríamos por tanto considerar la existencia de un nuevo microambiente intermedio, el sistema circulatorio, cuyo estudio permitirá explicar cómo las células migran desde el tumor primario o microambiente-1, penetran en los vasos sanguíneos, sobreviven en el torrente circulatorio eludiendo al sistema inmune, se mantienen en estado latente en algunos órganos durante años y finalmente consiguen implantarse y proliferar en el órgano diana (Aguirre-Ghiso 2007).

En los últimos años, la investigación se ha centrado en el desarrollo de técnicas que permitan detectar células diseminadas en órganos mesenquimáticos como la sangre periférica, médula ósea y ganglios linfáticos. La detección de células tumorales diseminadas en médula ósea se considera factor pronóstico en el cáncer de mama y numerosos trabajos así lo demuestran. En el caso de las células tumorales circulantes en sangre periférica, continúa el debate sobre su posible valor pronóstico aunque numerosos trabajos científicos así lo indican (Cristofanilli, Hayes et al. 2005), (Pierga, Bidard et al. 2008). Y por tanto queda asociada la presencia de

estas células con una menor supervivencia y menor supervivencia libre de enfermedad.

La sangre es un hábitat de tránsito para las CTCs y aún no se conoce que proporción de éstas son capaces de sobrevivir en el torrente sanguíneo para con posterioridad proliferar hasta formar la metástasis. Es conocido que la mayor parte de las células tumorales circulantes encontradas se encuentran en apoptosis; lo que demuestra que la eficiencia metastásica de estas células es muy baja. Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados hasta el momento demuestran que la presencia de CTCs en pacientes con cáncer de origen epitelial, como el caso del cáncer de mama, se encuentra relacionada con la evolución de la enfermedad y la respuesta al tratamiento.

Un hecho cierto, es que pacientes sin metástasis clínica aparente sufren recaídas en un periodo de tiempo más o menos largo. Esto demuestra que las células tumorales diseminan en estadios tempranos del tumor, incluso antes del primer diagnóstico. Además, estas células presentan características fenotípicas diferentes al tumor primario y no presentan crisis telomérica. Esta particularidad las hace interesantes objeto de estudio con el fin de buscar otras pautas de tratamiento o tratamientos personalizados (Mego, Mani et al. 2010).

✓ **Características biológicas y funcionales de las CTCs.**

En el caso de cáncer de mama metastásico se ha comprobado la capacidad pronóstica y predictiva de las CTCs. No obstante es necesario determinar qué características adquieren estas células para diseminarse de forma temprana. Las técnicas de doble marcaje inmunocitoquímico nos han permitido identificarlas y detectarlas directamente.

Las células tumorales circulantes se caracterizan por:

- Morfología característica de célula tumoral: tamaño mediano-grande y núcleo granulado con gran ratio núcleo/citoplasma (aproximadamente $\frac{3}{4}$). (Marrinucci, Bethel et al. 2007; Marrinucci, Bethel et al. 2010).

Introducción

- Expresan marcadores epiteliales, como son EpCAM y CK. Hay que tener en cuenta que las CTCs ha tenido que atravesar la barrera mesénquima-epitelio (EMT) y, por tanto, la expresión de estos marcadores puede variar e incluso llegar a perderse o incluso no expresarse. (Pantel and Brakenhoff 2004), (Fehm, Sagalowsky et al. 2002), (Mikolajczyk, Millar et al. 2011).
- Aberraciones cromosómicas que afectan principalmente a los cromosomas 1, 8 y 17. Lo más frecuente es la aneusomía, siendo más común la ganancia que la pérdida de cromosomas. (Swennenhuis, Tibbe et al. 2009).
- Poco potencial proliferativo, lo que les permite escapar de los tratamientos quimioterápicos que actúan sobre células proliferativas. Estas células tendrían capacidad para autorrenovarse y diferenciarse.
- Capacidad para escapar de la apoptosis, que la consiguen al permanecer en estado durmiente o G0 largo tiempo hasta que reciben las señales apropiadas provenientes del microambiente que las rodea. Así lo manifiesta la baja expresión de Ki67. (Muller, Stahmann et al. 2005).

1.2.12. Técnicas de enriquecimiento, aislamiento y detección de células tumorales circulantes

El reto en la detección de células tumorales circulantes en sangre periférica radica en que la presencia de éstas en sangre es extremadamente baja (1 célula tumoral epitelial entre 10^5 - 10^6 células hematopoyéticas). La sangre humana se compone de células de blancas (5 - 10×10^6 /mL), células rojas o hematíes (5 - 9×10^9 /mL) y plaquetas (2.5 - 4×10^8 /mL). Tras superar con éxito el aislamiento de las células de interés, el segundo reto es identificarlas como tumorales con el fin de minimizar el riesgo de falsos positivos.

✓ **Enriquecimiento y aislamiento de CTCs.** El aislamiento de CTCs puede llevarse a cabo por distintos métodos: gradientes de densidad, enriquecimiento con anticuerpos, citometría de flujo por *sorting* celular y filtración, entre otros.

- **Gradientes de densidad.** Esta técnica consiste en la centrifugación de la muestra de sangre periférica usando soluciones de gradientes de densidad (Ficoll-histopaque). El proceso se basa en la migración de las células, en función de su densidad celular por procesos de centrifugación diferencial, en distintas capas. Las células tumorales epiteliales se disponen en la fracción correspondiente a las células mononucleares, entre el plasma y el Ficoll.

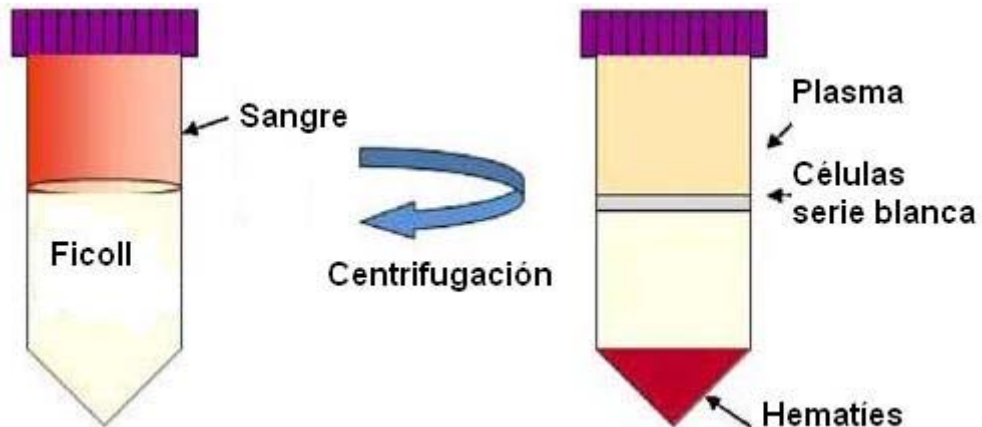


Ilustración 7: Aislamiento de CTCs mediante gradientes de densidad

- **Sistema de afinidad magnética.** El sistema más conocido es el sistema MACS de Miltenyi Biotec (Martin, Siewert et al. 1998). La metodología de este sistema se basa en el uso de partículas biodegradables de óxido de hierro conjugadas con anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra a antígenos específicos expresados en la superficie de las células de interés: célula de origen epitelial o hematopoyética mononuclear. Este sistema no afecta a la viabilidad celular. Una vez marcadas las células de interés se procede a su aislamiento mediante el uso de una columna magnética donde se lleva a cabo el “secuestro” de las partículas magnetizadas. La selección puede ser: selección positiva, marcando antígenos específicos de células tumorales (EpCAM, CK-7/8, MUC-1) (Molnar, Ladanyi et al. 2001), (Gaforio, Serrano et al. 2003), (Fehm, Becker et al. 2007) o selección negativa, marcando antígenos de células hematopoyéticas (CD-45) (Yang, Lang et al. 2009).

Las citoqueratinas (CK) son componentes integrales del citoesqueleto de las células epiteliales normales y tumorales, concretamente forman los

Introducción

filamentos intermedios. Pertenecen a una familia de 30 proteínas. No son marcadores específicos de células tumorales pero las elegimos, como criterio de identificación de células tumorales epiteliales localizadas en tejidos hematopoyéticos, porque las células sanguíneas no las expresan. Entre las CK más utilizadas están: CK-7, CK-8, CK-18 y CK-19, más expresadas en el componente luminal del epitelio mamario que en el componente basal (Moll, Franke et al. 1982).

En nuestro grupo de investigación hemos utilizado el anticuerpo monoclonal PAN anti-citoqueratina 7/8 (clon CAM 5.2) también utilizado en otros estudios (Martin, Siewert et al. 1998).

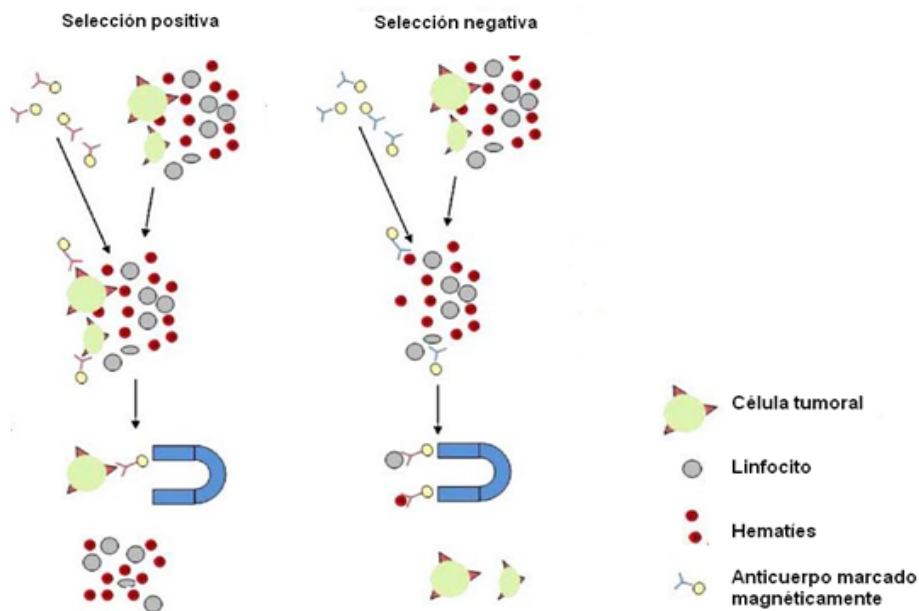


Ilustración 8: Separación inmunomagnética

Otros marcadores propuestos en la literatura que cabe destacar son:

- EpCAM: proteína de adhesión celular expresada en tumores malignos de origen epitelial. Su localización en la superficie de la célula permite mantener la viabilidad celular al no requerir permeabilización para su posterior marcaje. Esta proteína también se expresa en células de origen hematopoyético y durante el proceso de diseminación tumoral puede ser que su expresión se pierda.

- MUC1: Las mucinas son proteínas implicadas en la adhesión celular y la modulación de señales para los factores de crecimiento, se cree que su expresión podría favorecer la diseminación celular.

- EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico.

Ninguno de estos factores son específicos de CTCs, pero la combinación de dos de ellos puede eliminar falsos positivos que pueda haber en la muestra.

- **Separación por fluidos.** Esta técnica se basa en el uso de ferrofluidos de captura constituidos por nanopartículas magnéticas, revestidas de seroalbúmina bovina, conjugadas con anticuerpos específicos frente el antígeno EpCAM para capturar a las CTCs. En la actualidad podemos encontrar en el mercado el sistema CellSearch® de Veridex. Este dispositivo está basado en el uso de nanopartículas magnéticas conjugados con anticuerpos dirigidos frente al antígeno EpCAM. Se trata de un sistema automatizado que permite, una vez enriquecida la muestra, detectar mediante microscopia de fluorescencia las posible CTCs presentes en la sangre de las pacientes (Cristofanilli, Budd et al. 2004), (Cristofanilli, Hayes et al. 2005). Entre las desventajas del sistema, se encuentra el hecho de que, recientes estudios sugieren que los marcadores EpCAM y citoqueratina se pierden en subpoblaciones específicas y potencialmente agresivas de CTCs, que pierden sus propiedades epiteliales a favor de fenotipos mesenquimales. No obstante es el único aprobado actualmente por la FDA. Otro sistema basado en la separación por fluidos es el CellCollector™ de Gilupi; que permite la detección y aislamiento de las células de interés directamente *in vivo* en la sangre de los pacientes. Su tecnología está basada en la detección de la expresión de la proteína de superficie EpCAM. (Saucedo-Zeni, Mewes et al. 2012). AL igual que el CellSearch, presenta la desventaja de no poder detectar subpoblaciones diferentes de CTCs. Este dispositivo ha conseguido recientemente la acreditación europea para su uso clínico.
- **Filtración.** El proceso de filtración se basa en el tamaño celular. Se hace pasar la muestra de sangre por una membrana cuyo tamaño de poro va a dejar escapar las células hematopoyéticas y en ella van a quedar retenidas las CTCs que son de mayor tamaño.

Introducción

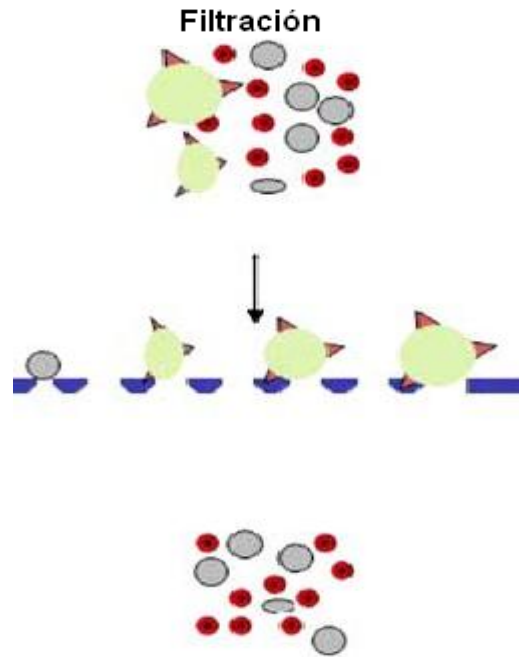


Ilustración 9: Separación celular en función del tamaño

- ✓ **Detección de CTCs.** Una vez aisladas las CTCs se puede proceder a: fijarlas en un porta para cuantificarlas y caracterizarlas mediante técnicas de citometría de flujo, inmunocitoquímica o bien estudiar su presencia mediante técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- **Citometría de flujo.** Esta técnica permite analizar las células haciéndolas pasar a través de un rayo de luz a muy alta velocidad y medir las características de dispersión de la luz y fluorescencia. Para el uso de esta técnica las células deben encontrarse aisladas en suspensión en un fluido, por ello las células sanguíneas pueden analizarse directamente. Para el estudio de marcadores específicos de las células se emplea un marcaje con anticuerpos monoclonales, señalados con partículas fluorescentes dirigidos, contra ese antígeno específico. La citometría de flujo permite el uso de varios marcadores simultáneos. Combinando el uso de varios marcadores fluorescentes se pueden analizar varias características fenotípicas de las células de interés simultáneamente. Algunos citómetros conocidos como separadores o “*sorters*” además de analizar las características celulares permiten discriminar poblaciones en base a su complejidad y tamaño celular.

2. HIPÓTESIS

El aislamiento y caracterización de células tumorales circulantes epiteliales con características de células madre puede tener importantes implicaciones biológicas en el conocimiento del proceso metastásico.

De acuerdo con los trabajos publicados, el proceso de diseminación tumoral requiere la adquisición de una serie de características propias de células progenitoras tumorales.

Los estudios realizados con células tumorales circulantes parecen definir poblaciones celulares con determinadas características biológicas que les permiten sobrevivir en un medio hostil como la sangre. Entre estas características destacan principalmente: capacidad de autorrenovación, regulación del nicho, capacidad de acumular mutaciones a lo largo del tiempo, activación de rutas antiapoptóticas, capacidad de migración y evasión, incremento de la actividad transmembrana e inducción de latencia tumoral. Todas estas características son propias de células madre.

La presencia de marcadores específicos de células madre nos identificaría pues una subpoblación de células tumorales circulantes con capacidad invasiva y proliferativa y, por tanto, con elevada probabilidad de ser las responsables del desarrollo posterior de nuevos focos tumorales.

Determinar el valor pronóstico que puedan tener estas células tumorales circulantes en pacientes con cáncer de mama en estadios tempranos (sin afectación metastásica descrita clínicamente) de la enfermedad puede permitir valorar el riesgo de recaída y la posibilidad de administrar tratamientos más específicos y adaptados a las características biológicas de las células tumorales de cada paciente.

Por otro lado, la detección de células tumorales circulantes en cáncer de mama podría permitir identificar qué pacientes con nódulos negativos podrían beneficiarse de la terapia en base a la presencia de CTCs en sangre. Diferentes estudios han demostrado que las células tumorales diseminadas y células tumorales circulantes pueden sobrevivir a la quimioterapia, incluso a altas dosis, pero son susceptibles de eliminar por

Hipótesis

tratamientos de hormonoterapia o inmunológicos dirigidos específicamente a los marcadores que caracterizan biológicamente a estas células y que pueden ser diferentes a los expresados en el tumor primario.

En base a estas premisas, se considera que la caracterización fenotípica, genética y funcional estas CTCs, nos aportará en primer lugar un mejor conocimiento del proceso de diseminación y colonización tumoral, que redundará finalmente en la adopción de medidas terapéuticas más eficaces e individualizadas, con la consiguiente mejora de la calidad de vida de los pacientes oncológicos y un menor gasto sanitario.

3. OBJETIVOS

Los objetivos de este estudio son los siguientes:

- 1) Aislar células tumorales circulantes (CTCs) de origen epitelial presentes en la sangre periférica de pacientes con cáncer de mama en estadio precoz.
- 2) Caracterizar fenotípicamente las CTCs aisladas en base a la expresión de los marcadores: citoqueratina, EGFR, CD133 y receptores hormonales (de estrógenos y de progesterona), mediante técnicas de inmunocitoquímica.
- 3) Caracterizar genéticamente las CTCs aisladas mediante el análisis citogenético de los genes HER2 y TOPO-II α , para comprobar la posible presencia de amplificaciones genéticas.
- 4) Relacionar la presencia de CTCs con la evolución de la enfermedad.
- 5) Comparar la expresión de los diferentes marcadores analizados en las CTCs con las características clínico-patológicas presentes en el tumor primario de las pacientes y su relación con la respuesta a las distintas pautas de tratamiento.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. SELECCIÓN DE LAS PACIENTES PARA EL ESTUDIO

Este estudio se ha realizado sobre dos poblaciones de pacientes seleccionadas: una población de 91 pacientes con cáncer de mama metastásico y no metastásico atendidas en el servicio de oncología del Complejo Hospitalario Ciudad de Jaén (Jaén) en la fecha comprendida entre Abril de 2000 y Diciembre de 2002; y otra población de 98 pacientes seleccionadas con cáncer de mama en estadio precoz. El reclutamiento de pacientes se llevó a cabo entre los años 2009 y 2011 en los servicios de oncología de dos centros hospitalarios: Hospital del Mar (Barcelona) y Complejo Hospitalario Ciudad de Jaén (Jaén).

Todas las pacientes fueron convenientemente informadas sobre el interés y finalidad de este estudio científico y aceptaron su participación mediante la firma de un consentimiento informado. Los ensayos se llevaron a cabo siguiendo las directrices de la Junta de Revisión Ética local y el Ministerio Español de Sanidad y cumpliendo la guía de buenas prácticas clínicas y los principios de la Declaración de Helsinki.

Todas las historias clínicas y datos derivados de estas pacientes se revisaron y recogieron en una base de datos.

Las edades de las pacientes estaban comprendidas entre los 26 y 77 años (edad media=55 años). Los estadios de la enfermedad estaban comprendidos entre: grado I-IIIc, para la población del primer estudio y grado I-II, para la población del segundo y tercer estudio.

En cuanto a la clasificación molecular del tumor, según los criterios de Perou, basado en los patrones de expresión de receptores hormonales y del gen HER2 se identificaron tres grupos: con amplificación del gen HER2 (RE+/RP+/HER2+), triples negativos o tipo basal (RE-/RP-/HER2-) y tumores luminales (RE+/RP+/HER2-).

El procedimiento quirúrgico y tratamiento sistémico a seguir fue a discreción médica. Todas las pacientes incluidas en el estudio fueron sometidas tras el primer diagnóstico a tres pautas de tratamiento: sólo

Material y Métodos

quimioterapia, quimioterapia combinado con hormonoterapia y en aquellos casos en los que el tumor primario expresaba el gen HER2 se aplicó el tratamiento con trastuzumab. Las pautas de administración de los tratamientos fueron en adyuvancia o neoadyuvancia, según el caso.

Para determinar la capacidad pronóstica en cuanto a la presencia y número de CTCs: analizamos en la primera población sometida a estudio la presencia de células tumorales circulantes en sangre periférica en 91 pacientes con cáncer de mama localmente avanzado y recién diagnosticado. Es decir, antes de ser sometidas a ningún tipo de tratamiento tanto quimioterápico, hormonal, biológico o quirúrgico. Y en posteriores muestras que fueron tomadas a lo largo de los siguientes intervalos de tiempo: 1-5 meses (durante el tratamiento), 5-12 meses (después del tratamiento), 12-24 meses y 24-50 meses (durante la reevaluación de la enfermedad).

Con la finalidad de caracterizar fenotípica y genéticamente a las CTCs, y relacionar estas características con su potencial metastásico y con la respuesta a los tratamientos administrados: seleccionamos una población de 98 pacientes con cáncer de mama en estadio precoz. Los subtipos de tumores primarios fueron: luminal (67 pacientes), basal o triple negativo (17 pacientes) y tipo HER2 amplificado (14 pacientes) (Sorlie, Perou et al. 2001). Se tomaron muestras de sangre en el momento del primer diagnóstico (extracción basal) y después de tres ciclos de quimioterapia si el tratamiento se aplicaba en adyuvancia (38 pacientes) o al final del tratamiento, si éste se aplicaba en neoadyuvancia (35 pacientes).

Con el objeto de garantizar un buen análisis predictivo y con el tiempo pronóstico, se buscó un grupo de pacientes lo más homogéneo posible respecto al resto de factores pronóstico que ya se conocen y cuya variación pueda influir en el desenlace del estudio actuando como factores de confusión.

4.2. MUESTRAS EMPLEADAS EN ESTE ESTUDIO

Las muestras sanguíneas fueron recogidas en tubos heparinizados *CellSave®* (Veridex, Johnson & Johnson Company, LLC) y procesadas dentro de las 72 horas siguientes a su extracción de acuerdo con el protocolo establecido por nuestro grupo (Gaforio, Serrano et al. 2003), (Nadal, Fernández et al. 2012). Para su transporte se adoptaron las medidas de bioseguridad, siguiendo el plan general de prevención de riesgos laborales de los Centros remitentes.

4.2.1. Muestras de sangre de pacientes

A cada paciente se le extrajeron 3 muestras de 10 mililitros de sangre periférica en momentos puntuales del tratamiento según las pautas de administración del mismo.

4.2.2. Controles negativos

Además de las muestras de sangre de nuestras pacientes, también se utilizaron para el estudio muestras de sangre procedentes de 16 voluntarios sanos sin relación alguna con las pacientes incluidas en el estudio. Estas muestras se emplearon como controles negativos con la finalidad de detectar posibles falsos positivos.

Se obtuvo el consentimiento de todos los voluntarios sanos.

4.2.3. Líneas celulares de cáncer de mama

Para establecer la sensibilidad y eficacia de la metodología empleada en este estudio hemos utilizado tres líneas celulares de adenocarcinoma de mama obtenidas del *American Type Culture Collection* (ATCC) (Hwang-Verslues, Kuo et al. 2009).

Las líneas celulares que se utilizaron en la investigación fueron: MDA MB-231, MCF7, SKBR3 y T47D.

Material y Métodos

Se eligieron estas líneas porque presentan características diferentes.

- ✓ MCF-7: Esta línea celular se caracteriza por expresar receptores hormonales (RE+/RP+), EGFR y CD133. Presenta 3 copias del centrómero 17, dos copias del gen HER2 y dos copias del gen TOPO II α .
- ✓ MDA-MB-231: No expresa receptores hormonales ni el gen HER2 (son triple negativo: RE-/RP-/HER2-). Expresan el gen EGFR y CD133. En esta línea celular aparecen dos genotipos diferentes, un genotipo predominante (91.33%) que presenta trisomía para el centrómero 17 y un segundo genotipo, menos abundante en la población (8.67%), con tetrasomía para el centrómero 17. No aparece amplificación de ninguno de los genes (ratio medio respecto al CEP17 de 1.01 para ambos genes).
- ✓ SKBR-3: Esta línea celular no expresa receptores hormonales. Expresan el gen HER2 y EGFR. Presenta amplificación para el gen HER2 (número medio de copias 25.87 ± 7.39) y amplificación para el gen TOPO II α (9.48 ± 2.55), respecto al CEP17. Son células con capacidad invasiva.
- ✓ T47D: Esta línea celular se caracteriza por expresar receptores hormonales (RE+/RP+) y EGFR. Presenta 2 copias del centrómero 17, dos copias del gen HER2 y dos copias del gen TOPO II α .

4.2.4. Controles positivos

Todas las técnicas de laboratorio empleadas en este estudio fueron puestas a punto previamente sobre controles positivos: con la finalidad de determinar la especificidad de la metodología empleada. Estos controles se hacen de manera periódica y simultáneamente con las muestras de las pacientes.

Los controles positivos se diseñaron a partir de las muestras de sangre periférica donadas por voluntarios sanos que se mezclaron con un determinado número de células tumorales procedentes de las líneas celulares de cáncer de mama cultivadas en el laboratorio: MDA MB-231, SKBR3, MCF-7 y T47D.

Los controles positivos también permiten evaluar la sensibilidad de nuestra metodología a la hora de aislar las células tumorales de la sangre periférica. Para ello hemos realizado tres tipos de controles; variando el número de células tumorales que se mezclan con la sangre, poniendo 1000, 500 y 50 células tumorales en 10 mililitros de sangre periférica respectivamente y posteriormente evaluamos la capacidad de recuperación de estas células. De este modo pudimos comprobar que la eficacia de la metodología rondaba entre el 40-60% de células recuperadas.

Linea celular	MCF-7			T47D		
Nº CTC 10mL sangre	1000	500	50	1000	500	50
% de recogida	52	50	58	60	50	40

Tabla 5: Eficacia de la técnica

El protocolo seguido para crear los controles positivos se describe a continuación:

- 1) Decantar el medio de cultivo de tubo Falcon® en el que crecen las líneas celulares cultivadas y si es necesario aclarar con PBS.
- 2) Despegar las células del fondo de la placa con tripsina, PBS-EDTA o medio comercial Trypple Express (Sigma). Se depositan 2 mL del reactivo y se deja actuar durante un tiempo no superior a 2 minutos. Para potenciar su actividad es aconsejable dejar la placa en el incubador durante este periodo de tiempo.
- 3) Una vez despegado el cultivo añadir 10 mL de PBS y decantar todo el contenido de la placa en un tubo de centrifuga.
- 4) Centrifugar a 1200 r.p.m. durante 10 minutos a 22°C con freno bajo.
- 5) Decantar el sobrenadante y resuspender el pellet en 2mL de medio de cultivo.
- 6) A continuación hay que evaluar la concentración celular. El recuento se hace en cámara de *Neubauer*. Esta cámara de recuento tiene una depresión en el centro de 0,1 mm con respecto

Material y Métodos

a la superficie que la divide en dos cuadrículas de 3 milímetros cuadrados cada una. Para hacer el recuento sobre la cámara Neubauer se coloca un cubreobjetos de 22x22 mm y en los bordes, superior e inferior, de éste se pipetea 10 µL de la suspensión celular. La muestra entra en la cámara por capilaridad. Bajo el microscopio óptico se cuentan las células que están en las cuatro cuadrículas grandes (marcada en rojo) y se hace la media (M).

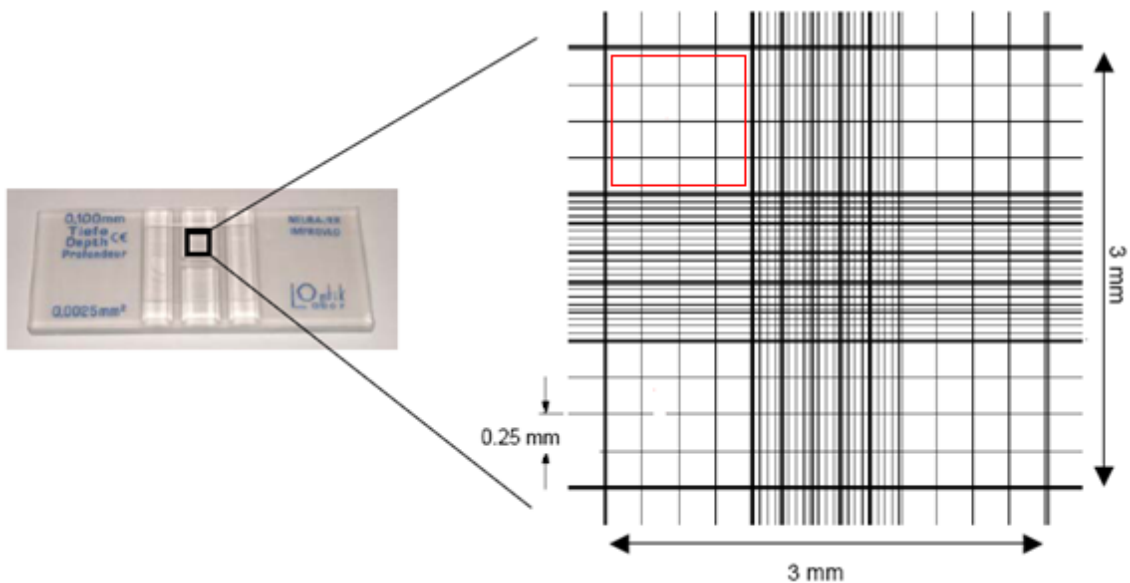


Ilustración 10: Cámara de Neubauer

- 7) Para calcular la concentración de células por mililitro se aplica la siguiente fórmula:

$$[\text{células / mililitro}] = 10000 \cdot (M/4)$$

- 8) Finalmente, preparar las diluciones apropiadas en función del número de células tumorales que se vayan a dispensar en las muestras de sangre control.

4.3. ANALISIS REALIZADOS SOBRE LAS MUESTRAS DE SANGRE

Las determinaciones analíticas que se realizaron sobre las tres muestras de sangre extraídas a las pacientes; una vez enriquecidas y fijadas

sobre un porta las células tumorales circulantes presentes en ellas, fueron las siguientes:

- Muestra-1: expresión de citoqueratinas, mediante tinción cromogénica enzimática, receptor de estrógenos (RE) y CD133 con doble tinción inmunocitoquímica.
- Muestra-2: expresión del citoqueratinas con tinción cromogénica, factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y receptor de progesterona (RP) mediante doble tinción inmunocitoquímica.
- Muestra-3: fenotipado y genotipado de CTCs mediante FICTION. Con esta técnica se evalúa la expresión de citoqueratinas con tinción inmunocitoquímica y se combina con hibridación fluorescente in situ (FISH) para detectar alteraciones numéricas de los genes a estudiar. Utilizamos la triple sonda para los genes HER2/TOPO-II α /centrómero 17.

4.4 ANÁLISIS REALIZADOS SOBRE LAS BIOPSIAS DEL TUMOR PRIMARIO

La recogida y procesamiento de las biopsias del tumor primario se realizó por los patólogos de los correspondientes hospitales donde se trataron a las pacientes. Siguiendo los protocolos de inmunotinción establecidos sobre los tejidos parafinados.

Sobre las biopsias se analizaron los siguientes marcadores: RE y RP usando los anticuerpos 6F11 (diluido 1/40; Novocastra, Newcastle Upon Tyne, United Kingdom) y 312 (diluido 1/100), respectivamente, de acuerdo con la guía de la *Sociedad Americana de Oncología Clínica* (Hammond, Hayes et al. 2010). Ki67 con el anticuerpo monoclonal de ratón MIB-1 (diluido 1/200; Dako, Glostrup, Denmark) y calculando el porcentaje de núcleo teñidos. Se establece un punto de corte de 14% de núcleos teñidos para definir a un tumor como “alto grado de proliferación” (Cheang, Chia et al. 2009). Grado de tinción nuclear del p53 usando DO-7 (Novocastra Lab, Newcastle Upon Tyne United Kingdom); cualquier grado de tinción se

Material y Métodos

considera positivo. Estado de HER2 mediante inmunohistoquímica usando el Herceptest (Dako) en todas las pacientes y confirmando cuando estaba indicado mediante FISH (Hibridación Fluorescente *In Situ*) (Pathvysion, Abbott) siguiendo las recomendaciones de Sauter (Sauter, Lee et al. 2009). Estado del gen TOPO-II α mediante FISH con la sonda TOPOII/CEP17 (Abbott Molecular Inc, Des Plaines, IL, USA), considerando amplificación del gen cuando el ratio TOPO2:CEP17 fue 2:1 o mayor. Consideramos polisomía del cromosoma 17 (p17) cuando las células tenían tres o más copias del centrómero 17 (Salido, Tusquets et al. 2005).

4.5. PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS

4.5.1. Cultivo *in vitro* de líneas celulares

El cultivo celular, técnica que consiste en hacer crecer *in vitro* células procedentes de líneas celulares (en nuestro caso células cancerígenas) en condiciones controladas, se realizó en RPMI 1640 1X (GIBCO) enriquecido con un 10% de seroalbúmina fetal bovina (HyClone) y suplementado con: piruvato sódico, bicarbonato sódico, antibióticos (penicilina y estreptomina) para evitar contaminaciones y HEPES buffer para evitar que vare el pH.

Uno de los aspectos más importantes a considerar a la hora de trabajar con cultivos celulares es evitar la contaminación con hongos o bacterias que podrían matar a las células en crecimiento. Hay que prestar especial atención a la contaminación por micoplasmas. Para evitar la entrada de microorganismos contaminantes la manipulación de los cultivos se realizan en condiciones de esterilidad: trabajando en campana de flujo laminar, se trata de una cabina dotada de un sistema de propulsión y esterilización del aire por filtración, y también suplementando los medios de cultivo con antibióticos.

Así mismos se realizaron test de micoplasmas de la líneas celulares para descartar contaminaciones.

Los cultivos se incuban a 37°C, en un ambiente de humedad y con una mezcla de gases apropiada (5% de CO₂) para mantener el pH óptimo de los medios de cultivo.

Las células cancerígenas crecen adheridas a una superficie y para ello se emplean superficies plásticas específicas (tubos Falcon®).

Antes de comenzar a trabajar con cultivos celulares se deben tomar las siguientes precauciones:

- ✓ Es muy importante cambiar el medio de cultivo uno o dos días antes de proceder a la congelación de las células u otro proceso. Dado que las células están en continua división y crecimiento, se pueden generar una serie de problemas: agotamiento de nutrientes del medio, acumulación de células necróticas o apoptóticas, inhibición del crecimiento celular por contacto y diferenciación celular anómala.
- ✓ Si se observan alteraciones en la morfología celular hay que descartar ese cultivo.
- ✓ Los cultivos no deben dividirse precipitadamente, es aconsejable esperar a que haya una considerable densidad celular para que crezcan bien las células.
- ✓ Periódicamente se debe realizar un test de micoplasmas.

4.5.2. Aislamiento y enriquecimiento celular

El método de aislamiento de células mononucleares, granulocitos y de células de origen epitelial presentes en sangre periférica se basa en la creación de un gradiente de densidad con ficoll (1119 g/mL) que permite separar las células en función de sus diferentes densidades.

El gradiente se realiza vertiendo con cuidado la muestra biológica (sangre periférica) sobre el ficoll; este proceso se hace muy lentamente para evitar que las dos fases se mezclen. La fuerza centrífuga a la que es sometida la muestra provoca que las células mononucleares, los granulocitos y otras células de semejante densidad queden retenidos en la interfase entre el plasma y la solución de ficoll de 1119 g/mL.

Material y Métodos

Es aconsejable mantener las muestras de sangre a temperatura ambiente hasta su procesamiento y diluirlas 1:2 ó 1:4 para evitar sobrecargar el gradiente. Hay que atemperar el ficoll antes de su uso para asegurar mayor eficacia en la recogida de células.

Las etapas del procesamiento de la muestra se describen a continuación:

- 1) Se requieren 5 ml de ficoll 1119 por cada 10 ml de sangre venosa.
- 2) En un tubo cónico de 30 mL, se depositan 5 ml de ficoll 1119.
- 3) A continuación se añade con cuidado la muestra de sangre, previamente diluida en PBS (5ml de PBS/10ml de sangre).
- 4) Centrifugar a 700x g durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-22°C). La centrifugación ha de realizarse sin freno y con cabezal basculante.
- 5) Sacar con cuidado los tubos de la centrífuga. Aparecerán dos interfases, en la superior quedan retenidas las células mononucleares y en la inferior los granulocitos.
- 6) Aspirar la capa de células mononucleares mediante una pipeta pasteur, colocándola justo encima del halo y con cuidado de no arrastrar plasma, eritrocitos ni ficoll. Colocar las células en un tubo de 30 ml.
- 7) Lavar las células añadiendo 15 ml de PBS y centrifugar a 200x g durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- 8) Eliminar el sobrenadante y resuspender en la solución apropiada para seguir el procesamiento adecuado.

4.5.3. Selección positiva inmunomagnética

El método de selección positiva inmunomagnética se basa en el aislamiento de las células diana dentro de una población heterogénea mediante la utilización del sistema MACS, que se basa en el uso de MACS[®] microesferas, MACS[®] Columnas y MACS[®] separadores (Miltenyi Biotec) (Martin, Siewert et al. 1998).

Las microesferas son partículas magnéticas de óxido de hierro de aproximadamente 50 nm de tamaño y biodegradables, las cuales no interfieren ni en la viabilidad, ni en la funcionalidad celular. Las microesferas están conjugadas con anticuerpos monoclonales, que reconocen específicamente las células de interés, dirigidos contra la citoqueratina CK-7, 8, 18 y 19.

Una vez marcadas, se aíslan mediante la utilización de las MACS columnas, colocadas sobre el separador magnético. Las columnas están diseñadas para soportar un alto campo magnético que permite que la fuerza magnética generada sea suficientemente fuerte para retener células marcadas con el anticuerpo conjugado con microesferas. La obtención de la población celular de interés se consigue mediante la liberación de la columna de su separador magnético siendo recogidas en tampón de elución. Este procedimiento retiene a las células de origen epitelial marcadas magnéticamente en la columna y deja pasar las células hematopoyéticas: selección inmunomagnética positiva.

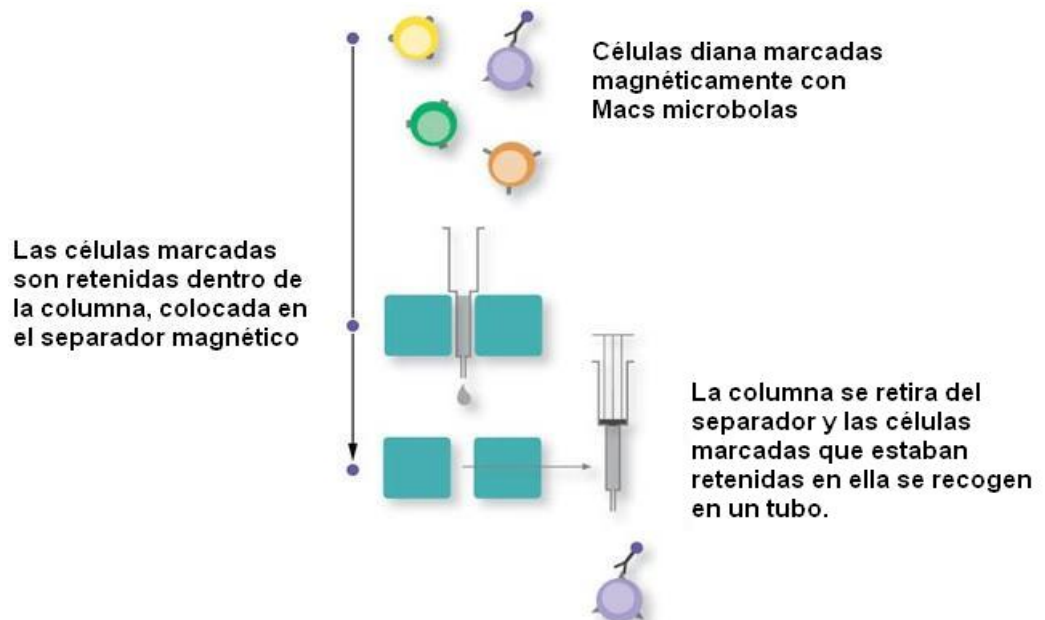


Ilustración 11: Funcionamiento de las columnas y el separador MACS®

Este sistema de separación celular basado en enriquecimiento inmunomagnético; permite seleccionar e identificar con mayor sensibilidad células tumorales diseminadas en sangre periférica, utiliza nanopartículas

Material y Métodos

supermagnéticas unidas a anticuerpos específicos para marcadores de origen epitelial que no expresan las células hematopoyéticas maduras.

Los reactivos necesarios para el marcaje magnético y posterior selección vienen incluidos en el Kit de trabajo (*Carcinoma Cell Enrichment and Detection Kit*, Miltenyi Biotec). Todas las soluciones de trabajo deben ser utilizadas al 1x.

Los componentes del kit se describen a continuación:

- ✓ **Dilution Buffer 2x50 ml (10x).** Solución tampón de lavado (contiene azida). Preparar solución al 1x diluyendo en MiliQ filtrada, mezclando bien, inmediatamente antes de usar.
- ✓ **CellStain Solution 50 ml (10x):** Solución tampón de lavado que contiene azida y BSA. Esta solución requiere la preparación previa de Dilution Buffer 1x. Preparar inmediatamente antes de usar.
- ✓ **Solución de Permeabilización (CellPerm Solution);** Reactivo, que debido a que contiene detergente, produce poros en las células, permitiendo así el marcaje intracelular.
- ✓ **Solución Fijante (CellFix Solution):** Contiene formaldehído que hace posible la fijación de los poros inducidos por el permeabilizante, estabilizando la morfología celular. Se utiliza inmediatamente después del permeabilizante.
- ✓ **Macs Cytokeratin-Microbeads:** Esferas magnéticas (Macs Microbeads) conjugadas con el anticuerpo monoclonal anticitoqueratina (Clon Cam5.2. Isotipo: mouse IgG2a).
- ✓ **FcR Blocking Reagent:** Evita uniones inespecíficas que puedan producirse. Algunas células presentes en la sangre, como monocitos y macrófagos, expresan receptores Fc que pueden unirse de forma inespecífica a las microesferas: Fc Blocking Reagent bloquea esta unión incrementando la especificidad.

Una vez que las células mononucleares son separadas del resto de fracciones celulares de la sangre, mediante gradiente de ficoll, se procede a su marcaje y aislamiento por selección positiva inmunomagnética. Todo el proceso se debe realizar a temperatura ambiente (19-22°C).

Después de la separación de la fracción de células mononucleadas presentes en la sangre mediante gradiente de ficoll se llevan a cabo los siguientes procesos:

- Preparación de la muestra
- Marcaje magnético (incubación con el anticuerpo específico)
- Selección inmunomagnética

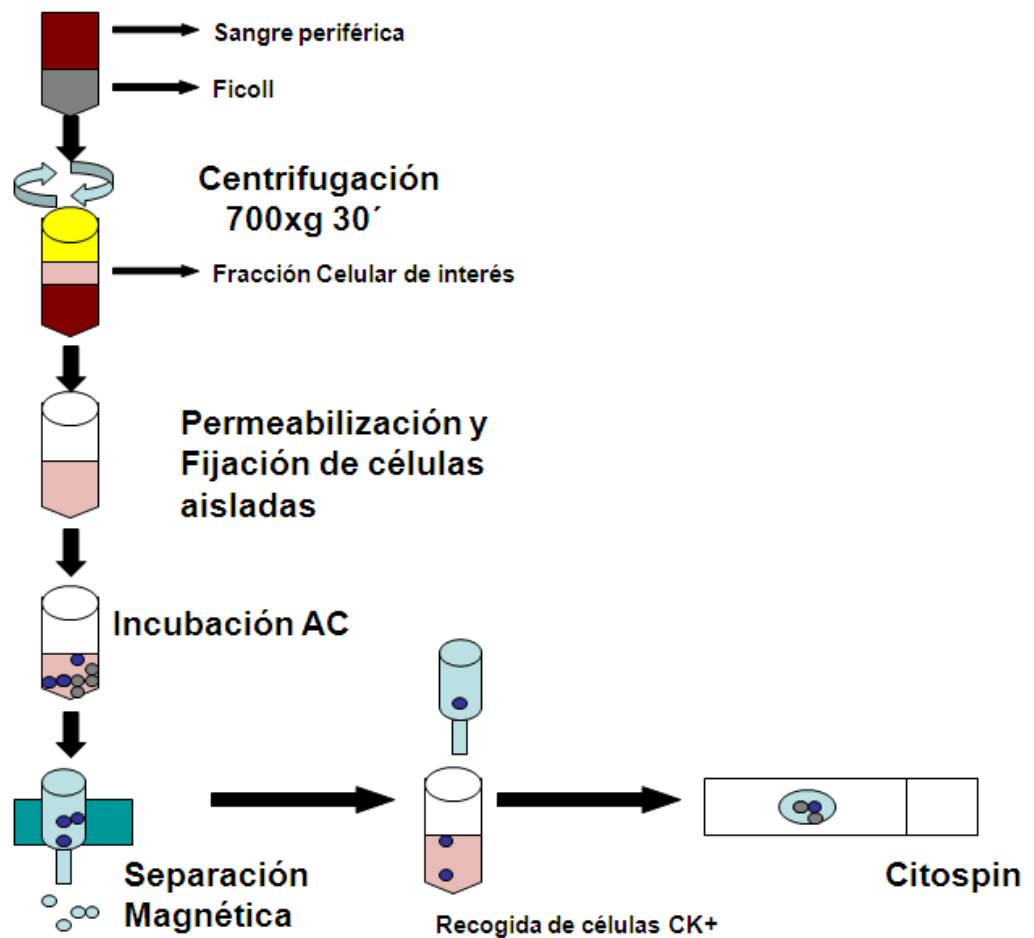


Ilustración 12: Esquemas del proceso de aislamiento de CTCs y fijación

✓ **Preparación de la muestra.**

- 1) Resuspender en 2 ml de Dilution Buffer 1x, el pellet obtenido tras el último lavado que se le realiza a las células en la selección leucocitaria, resuspender bien, con cuidado y añadir 8 ml más de Dilution Buffer volver a mezclar sin hacer burbujas. El volumen final será de 10 ml.

Material y Métodos

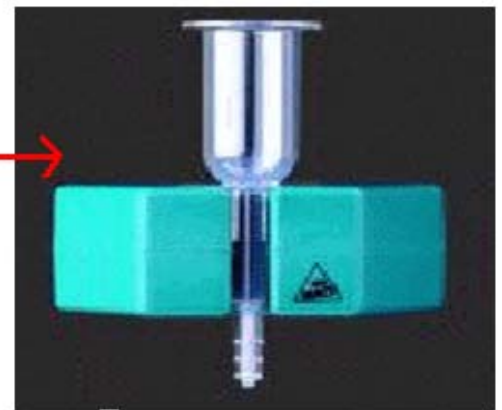
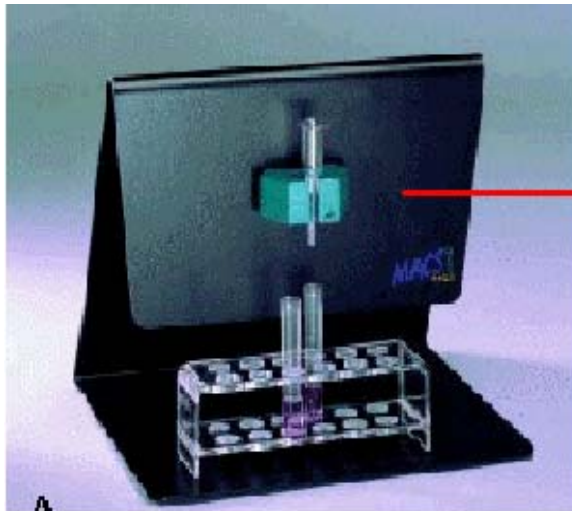
- 2) Añadir con cuidado 1,250 ml del reactivo CellPerm Solution, (se aconseja añadir el reactivo poco a poco y apoyando la pipeta en la pared del tubo, de esta forma se evita la aparición de grumos) mezclando bien sin hacer burbujas y dejar actuar durante 5 minutos exactos a temperatura ambiente.
- 3) Añadir con cuidado 1,250 ml del reactivo CellFix Solution, mezclando bien sin hacer burbujas e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 4) Centrifugar a 300 x g durante 10 minutos, a temperatura ambiente.
- 5) Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet celular golpeando suavemente el tubo con los dedos y después diluir en 5,5 ml de CellStain solution.
- 6) Centrifugar a 300 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente.

✓ **Marcaje Magnético.**

- 1) Resuspender las células en un volumen final de 150 μ l de CellStain solution en tubos de polietileno de 5 ml.
- 2) Añadir 50 μ l de FcR Blocking Reagent, mezclando bien pero sin hacer burbujas.
- 3) Añadir 50 μ l de Macs Cytokeratin-Microbeads mezclando bien pero sin hacer burbujas. Incubar 45 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
- 4) Añadir CellStain Solution hasta un volumen final de 4 ml y centrifugar a 300 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 5) Resuspender y añadir CellStain hasta un volumen final de 1mL. Proceder a la separación magnética.

✓ **Separación Magnética.**

- 1) Aplicar la columna de separación positiva tipo MS⁺/RS⁺ en el campo magnético del separador MACS.
- 2) Equilibrar la columna añadiendo 500 µl de 1x Dilution Buffer.
- 3) Pasar las células a través de la columna, no más de 500 µl cada vez, apoyando la pipeta en la pared de la columna para evitar hacer burbujas.



Separador magnético miniMAC de Miltenyi Biotec

Ilustración 13: Separador magnético

- 4) Eliminar las células no marcadas con las microesferas, que puedan quedar retenidas en la columna mediante 3 lavados, con 500 µl de 1x Dilution Buffer, cada uno de ellos. Evitar la formación de burbujas.
- 5) Retirar la columna del separador y colocar sobre un tubo. Aplicar sobre la columna 1 ml de Dilution Buffer y hacer presión con el émbolo que acompaña a la columna (a modo de jeringa) para recoger las células retenidas en ella.
- 6) Citocentrifugar en citocentrífuga Hettich (Tuttlingen, Germany) durante 10 minutos a 1500 rpm, utilizando embudos de doble cámara. Cada área sobre la que se deposita la solución celular mide 28 mm². Estos embudos se colocan sobre portas de poli-L-lisina con filtro para recoger el volumen sobrante. El volumen de muestra que se vierte sobre cada embudo es de 0,5 mL.

buffers. Y se recomienda realizar controles, tanto negativos como positivos, periódicamente como método de control de calidad del kit comercial.

4.5.4. Detección de CTCs mediante tinción cromogénica

La detección de las células de origen epitelial circulantes presentes en sangre periférica está basada en un sistema de marcaje directo de la proteína mediante un anticuerpo anticitoqueratina y empleando una tinción cromogénica enzimática. Para este proceso se emplea un marcador específico de células de origen epitelial; concretamente, la citoqueratina que en ningún caso se va a expresar en las células de origen hematopoyético. Al tratarse de muestras sanguíneas, la presencia de marcadores de origen epitelial no debe detectarse en condiciones fisiológicas normales.

Con esta metodología el marcador específico utilizado es un anticuerpo pancitoqueratina específica para la CK 7, 8, 18 y 19. La visualización de células positivas para la citoqueratina, es decir, células tumorales, se realiza en un primer paso mediante una tinción cromogénica basada en una reacción enzimática provocada por la unión de la fosfatasa alcalina con su sustrato (Fast Red TR/Naphtol). Esta reacción produce un precipitado de color rojo permanente visible con microscopia convencional. La contratinción del núcleo se realiza con hematoxilina tipo Mayer's. La utilización de esta metodología permite detectar las diferentes citomorfologías (Meng, Tripathy et al. 2004) que presentan las células tumorales circulantes y los linfocitos con total claridad.

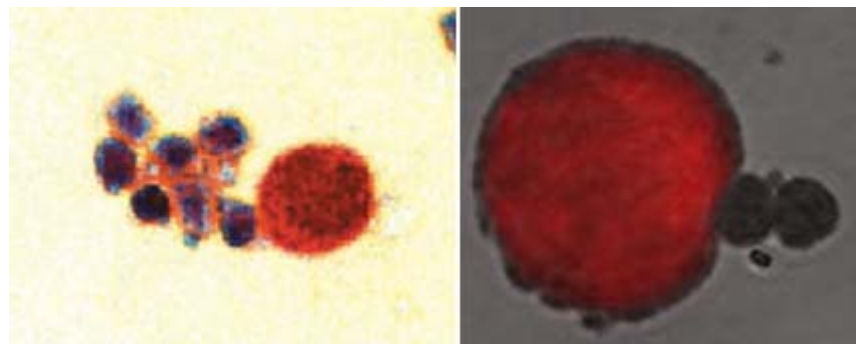


Ilustración 15: CTC teñida con tinción cromogénica y unida a linfocitos

Para proceder a marcar las citoqueratinas con Fast Red hay que preparar previamente los reactivos; disolviendo las tabletas del kit en 1 mL de agua MiliQ. Para ello en un tubo eppendorf se pone 1mL de agua miliQ y

Material y Métodos

se disuelve muy bien en primer lugar la tableta de Fast Tris Buffer; ayudándonos con el vórtex. A continuación, se disuelve la tableta de Fast Napthol. Todo el proceso se realiza directamente sobre el portaobjetos.

- 1) La muestra se debe procesar siempre en cámara húmeda. Se puede fabricar la cámara húmeda con una caja de plástico o metal dentro de la cual se sitúa un papel humedecido sobre el que se coloca el porta que se pretende analizar. De este modo evitamos que la muestra se deshidrate.
- 2) El área celular se marca con un lápiz hidrofóbico o diamante para que nos facilite, una vez sumergido en los reactivos, saber donde se encuentran las células así como la incubación con los distintos reactivos.
- 3) Hidratar la muestra con PBS al 1x frío hasta cubrir todo el área celular o introduciendo la muestra en una jarra Coplin, durante 5 minutos.
- 4) Decantar con cuidado la muestra para eliminar el PBS 1x sobre un papel secante.
- 5) Proceder a la fijación de muestra con Carnoys (metanol-acetona, 3:1) frío conservado a -20°C durante 5 minutos.
- 6) Lavar en PBS 1X durante 5 minutos para eliminar el Carnoys.
- 7) Depositar sobre el porta 100 μ l e incubar en oscuridad y a temperatura ambiente en la cámara de humedad durante 30 minutos.
- 8) Decantar y lavar en PBS 1X durante 1 minuto.
- 9) Colocar el porta en la cámara de humedad y cubrir con hematoxilina. Dejar actuar durante 1 minuto (en función del número de células).
- 10) Lavar en PBS y dejar secar al aire para visualizar en el microscopio de fluorescencia (Zeiss AXIOVER).

4.5.5. Tinción inmunocitoquímica

Las moléculas con actividad de anticuerpos son herramientas que utiliza el sistema inmune para combatir agentes patógenos y reciben la designación genérica de *inmunoglobulinas*, también denominados *gammaglobulinas*. Todas las moléculas de inmunoglobulinas poseen una

estructura común de cuatro cadenas polipeptídicas: dos grandes (pesadas o H) y dos pequeñas (ligeras o L).

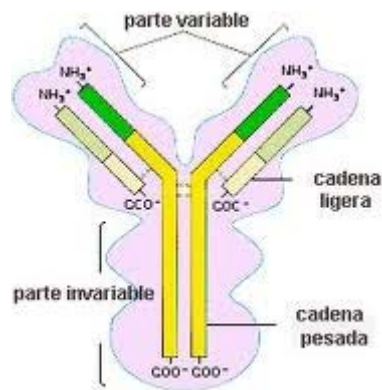


Ilustración 16: Estructura de inmunoglobulina

Las inmunoglobulinas humanas y en la mayor parte de los mamíferos superiores se dividen en cinco clases, atendiendo a la estructura primaria de sus cadenas pesadas. Estas clases se designan como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE.

Los anticuerpos se pueden unir a moléculas marcadoras, denominados fluorocromos, que permiten visualizar el lugar de reacción con sus respectivos antígenos.

Existen distintas técnicas de tinción mediante inmunofluorescencia:

- Directa; se utiliza un anticuerpo, ligado a un fluorocromo, específico frente al antígeno que se desea detectar.



Ilustración 17: Marcaje de directo

- Indirecta; se emplea un anticuerpo específico no marcado (primario) y seguidamente otro anticuerpo marcado con fluorocromo (secundario) que reacciona de forma específica con el anticuerpo primario.

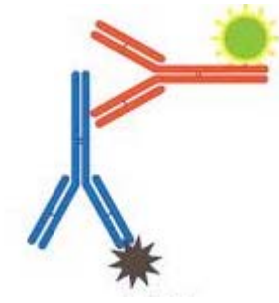


Ilustración 18: Marcate indirecto

- Técnica de sándwich; se emplea para detectar la presencia de inmunoglobulinas específicas frente a un determinado antígeno en las células de tejidos pertenecientes a un animal previamente inmunizado con ese antígeno.

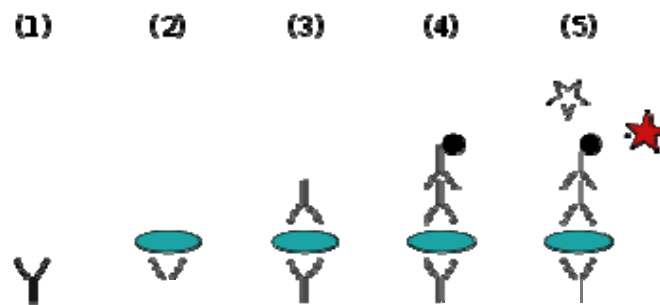


Ilustración 19: Técnica sándwich

- Incubación con complemento; es una modificación de la técnica indirecta, en ella el anticuerpo que se emplea en el primer paso de la técnica ha de ser capaz de fijar el complemento. Una vez realizada la primera incubación con dicho anticuerpo que a su vez es específico frente a un determinado antígeno se añade suero de fresco como fuente de complemento y se incuba. En una tercera fase se incuba con un anticuerpo específico frente a una determinada fracción del complemento, dicho anticuerpo específico irá marcado con un fluorocromo.
- Doble tinción; permite la determinación de dos anticuerpos de manera simultánea o secuencial. Para la técnica se emplean dos cromógenos que originen una coloración distinta en cada caso. Para evitar reacciones cruzadas deben emplearse antiseros obtenidos de distintas especies animales. Además siempre debe

utilizarse en primer lugar el anticuerpo que da reacción más intensa y si se va a trabajar con anticuerpos tipo monoclonal y policlonal, primero se usará el policlonal.

La tinción inmunocitoquímica permite la caracterización fenotípica de las células tumorales circulantes en sangre periférica mediante un doble marcaje directo sobre el porta con anticuerpos conjugados con fluorocromos. Los más utilizados habitualmente son: Alexa, Rhodamine y DiLights.

El abanico de marcadores adicionales que se pueden utilizar es muy amplio e incluye tanto marcadores específicos de proteínas de superficie (por ejemplo: EGFR y CD133) como nucleares (por ejemplo: receptores hormonales, para estrógenos o progesterona) o intracitoplasmáticos (por ejemplo: citoqueratinas). Para evaluar los resultados se requiere de un microscopio de fluorescencia.

El protocolo a seguir se describe a continuación. Es importante trabajar durante todo el proceso en oscuridad, en cámara de humedad y a temperatura ambiente.

- 1) Comenzar humedeciendo el porta en PBS 1X durante 5 minutos.
- 2) Decantar el exceso de PBS e incubar durante 30 minutos con 100 μ L del antisuero específico para el anticuerpo secundario para evitar falsos positivos diluido al 1:10 en PBS 1X.
- 3) Lavar en PBS 1X durante 5 minutos.
- 4) Incubar durante 1 hora con 100 μ L del primer anticuerpo monoclonal anti-humano para la proteína específica que se desee estudiar (EGFR, CD133, RE ó RP) diluido al 1:25 en PBS con SBF al 10%.
- 5) Lavar en PBS 1X durante 5 minutos.
- 6) Incubar durante 30 minutos con 100 μ L del anticuerpo secundario marcado con fluorescencia específico frente al anticuerpo primario diluido al 1:100 en PBS.
- 7) Lavar en PBS 1X durante 5 minutos.
- 8) Contrateñir con 5 μ L DAPI y visualizar en el microscopio de fluorescencia (Zeiss AXIOVER).

Las CTCs aisladas y fijadas sobre porta fueron caracterizadas mediante inmunocitoquímica para los siguientes biomarcadores: receptores hormonales,

Material y Métodos

EGFR y CD133. En primer lugar identificamos las CTCs mediante tinción cromogénica y a continuación se realizaron los marcajes específicos para los biomarcadores en el siguiente orden: RE/CD133, en la primera muestra. Sobre la segunda muestra de la misma paciente realizamos la tinción para identificar EGFR/RP. En primer lugar detectamos la presencia de células CK+ usando tinción cromogénica. Para la expresión del EGFR utilizamos un anticuerpo primario monoclonal anti-humano EGFR seguido de la incubación con un anticuerpo secundario marcado con Alexa fluor 355 (color azul). Para identificar el marcador CD133 usamos el kit antiCD133 (Biobytt); que contiene tres anti-CD133 dirigidos frente a los tres epitopos de la proteína CD133, diluido 1:50 y un anticuerpo secundario anti-conejo IgG marcado con Alexa fluor 350 (color azul) diluido 1:50.

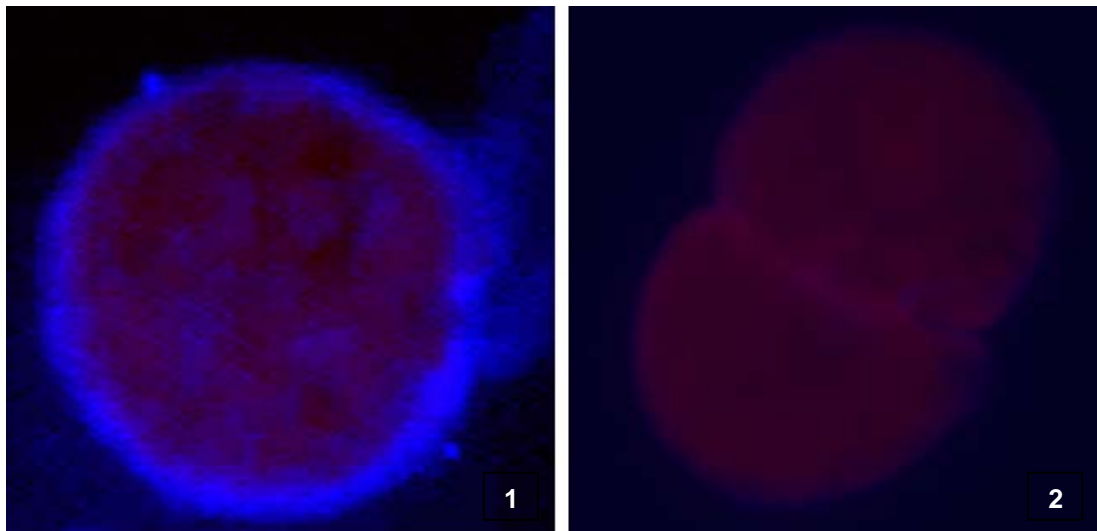


Ilustración 20: 1) CK+ (rojo) y EGFR+ (azul) // 2) CK+ (rojo) y CD133 (azul)

4.5.6. FICTION

El FICTION es una técnica de citogenética clásica que combina el análisis fenotípico y genético de las células de interés. Con este tipo de técnica en primer lugar se procede a realizar un marcaje inmunofluorescente de la célula, que nos permita identificarla como célula tumoral, en base a la expresión del antígeno citoqueratina y a continuación mediante FISH (hibridación fluorescente in situ) se pueden analizar anomalías tanto numéricas como estructurales de sus cromosomas. La técnica de la hibridación fluorescente in situ se basa en la formación, bajo determinadas condiciones físicas, de puentes de hidrógeno entre fragmentos específicos

marcados de DNA o RNA (denominados sondas) y sus secuencias complementarias del DNA o RNA celular, constituyendo híbridos. Esta técnica proporciona información de la presencia y distribución de secuencias específicas en la cromatina.

Para el FISH utilizamos la triple sonda multicolor HER2/TOPO-II/CEP17 (Kreatech, Durham, NC, USA) que marca en rojo el HER2, en verde la TOPO-II α y en celeste el centrómero 17.

Señales HER2	Señales Cep17	Estado del gen Her2
<4	<2	No amplificado
4-6	<2 =2	Posible polisomía Baja amplificación
>6	>2	Amplificación

Tabla 6: Interpretación señales de FISH (guidelines)

Con el FICTION podemos distinguir las células tumorales por su clara marcación citoplasmática en color verde de la citoqueratina y por una morfología acorde al fenotipo maligno y seguidamente proceder al análisis de sus núcleos para determinar la amplificación de los genes HER2 y TOPO-II α , evaluando el número de copias para cada gen. El protocolo para llevar a cabo esta técnica se describe a continuación.

- 1) Hidratar la muestra en PBS durante 5 minutos
- 2) Lavar a 75°C durante 2 minutos en 2xSSC al 0,3% de IGPack, en jarra coplin.
- 3) Deshidratar en concentraciones creciente de etanol: 70%, 3min; 80%, 3min; 100%, 3min.
- 4) Dejar secar al aire.
- 5) Agregar 7 μ l de sonda y colocar cubre sellando con Fixogum.
- 6) Desnaturalizar a 80° C durante 5 minutos.
- 7) Incubar a 37°C durante 16-24 horas.
- 8) Retirar el cubre e hidratar la muestra en PBS, durante 5 minutos.
- 9) Lavar a 75°C durante 2 minutos.
- 10) Lavar en agua destilada durante 15 segundos.
- 11) Montar cubre con Antifade (Vysis).

Material y Métodos

- 12) Refrigerar a 4°C durante 20 minutos.
- 13) Visualizar inmediatamente al microscopio de fluorescencia (Zeiss AXIO Imager; Carl Zeiss, Jena, Alemania): en primer lugar se localizan las CTCs (visibles por la tinción CK+) y seguidamente se analizan sus núcleos para registrar el número de copias de HER2, TOPO-II α y centrómero 17.

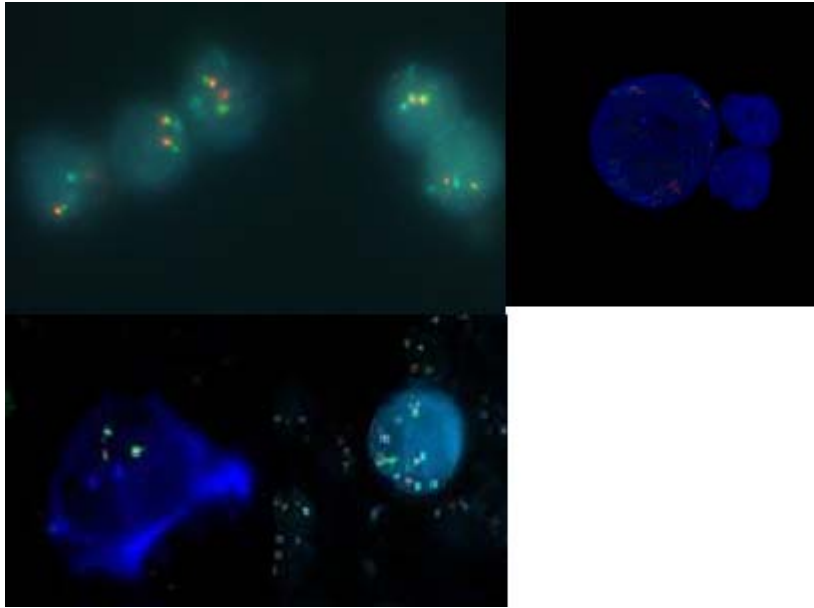


Ilustración 21: Resultados de FICTION con microscopio de fluorescencia

4.6. ANALISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico fue realizado usando el programa SPSS 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). La presencia de 1 CTC por cada 10 mililitros de sangre se considera resultado positivo, de acuerdo con el límite de detección analítica indicado en nuestro ensayo.

Los datos se expresan como medias o como números en porcentajes. Las variables categóricas fueron comparadas por la prueba exacta de Fisher's. Las variables continuas se compararon mediante el test de t-Student.

Los valores con $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Se consideró un intervalo de confianza del 95% (IC) para evaluar la asociación entre las variables clínico-patológicas y el estado de CTCs.

5. RESULTADOS

5.1. ESTUDIO-1: IMPACTO PRONÓSTICO DE CTCs EN UNA POBLACIÓN HETEROGÉNEA DE PACIENTES DE CÁNCER DE MAMA

Características de las pacientes

De las 91 pacientes incluidas inicialmente en el estudio, sólo 65 lo completaron. El seguimiento se realizó hasta un máximo de 50 meses o hasta el fallecimiento de la paciente. La edad de las pacientes estaba comprendida entre 26 y 77 años, siendo la edad media de 55 años. Estadios de la enfermedad comprendidos entre I y IIIC. Las características clínico-patológicas de las pacientes se registran en la siguiente tabla.

Características		65 pacientes
Pacientes	M0	42 (72.3%)
	M1	18 (27.7%)
Nódulos linfáticos	N0	10 (15.4%)
	N1	42 (64.1%)
	N2	10 (15.4%)
	Nx	3 (4.6%)
Tipo histológico	Ductal	53 (81.5%)
	Lobular	8 (12.3%)
	Otros	4 (6.2%)
Tamaño tumoral	T1	10 (15.4%)
	T2	36 (55.4%)
	T3	5 (7.7%)
	T4	12 (18.5%)
	Tx	2 (3.1%)
Rcpt. estrógenos	RE+	43 (66.2%)
	RE-	22 (33.8%)
Rcpt. progesterona	RP+	42 (66.7%)
	RP-	21 (33.3%)
HER2	HER2+	50.59 (81.6%)
	HER2-	11.4 (18.4%)

Resultados

Ki67	Ki67+	40 (87%)
	Ki67-	6 (13%)
P53	p53+	29 (44.6%)
	p53-	36 (55.4%)

Tabla 7: Características clínicas de las pacientes

Todas las pacientes recibieron quimioterapia como primera línea de tratamiento. En el estudio se incluyeron tanto pacientes afectas de enfermedad metastásica M1 (28%) como aquellas en estadios localizados M0 (72%). En cuanto al tipo histológico de tumor, el 81.5% de las pacientes se correspondían con el tipo ductal y el 12.5% tipo lobular. Y en cuanto al tamaño tumoral más de la mitad de los casos fue T2 (55.4%). Un porcentaje similar de las pacientes expresaron receptores de estrógenos y de progesterona (RE=66% y RP=65%). El 84%, 87% y 45% de las pacientes fueron positivas para los biomarcadores HER2, Ki67 y p53, respectivamente.

Persistencia de las CTCs y riesgo de muerte durante el seguimiento

El número de CTCs aisladas en la población analizada estaba comprendido entre un rango de 1 a 125, siendo el número medio de 3 CTCs por 10 mL de sangre periférica. Los porcentajes en que se detectaron CTCs fueron de 62.9%, 46.4%, 43.1% y 31% de las pacientes estudiadas durante los intervalos de tiempo de 1-5 meses, >5-12 meses, >12-24 meses y 24-50 meses, respectivamente.

Las pacientes que presentaron CTCs en sangre periférica en cualquiera de los intervalos de tiempo durante el seguimiento tenían mayor riesgo de muerte ($p=0.035$) que aquellas pacientes sin CTCs durante el seguimiento. Cuando sólo se consideraban las pacientes metastásicas, no encontramos relación significativa entre la presencia de CTCs y el riesgo de muerte ($p=0.059$). Dicho resultado se encuentra al borde de la significación estadística; esto podría ser consecuencia del pequeño número de pacientes analizadas.

Población (N=65)	Nº pacientes	Ratio	p
Total (M0+M1)	55	1.04	0.035
Metastásicas	18	1.04	0.059

Tabla 8: Relación entre presencia de CTCs y riesgo de muerte

Comparamos mediante la curva de Kaplan-Meier la supervivencia global entre pacientes con y sin CTCs en sangre observamos lo siguiente. En la extracción basal (antes de iniciar el tratamiento con quimioterapia) no se observaron diferencias significativas ($p=0.636$) entre pacientes que no tuvieron CTCs en sangre periférica y pacientes con CTCs,

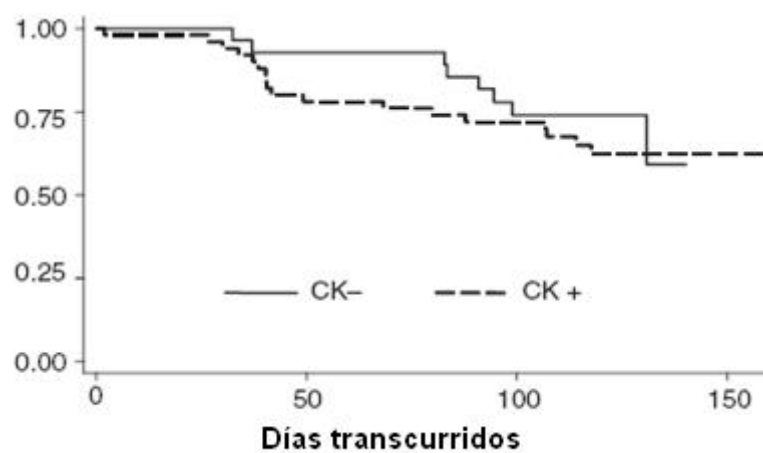


Tabla 9: Supervivencia global antes de recibir quimioterapia

Sin embargo, en la primera reevaluación (después de recibir quimioterapia) observamos una supervivencia significativamente menor ($p=0.035$) en las pacientes con CTCs en sangre periférica.

Resultados

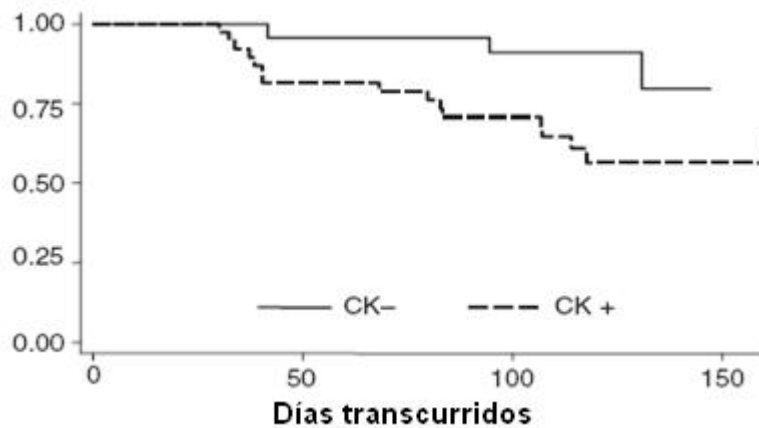


Tabla 10: Supervivencia global después del tratamiento

Además, analizando los niveles de CTCs en sangre observamos que; las pacientes con más de 10 CTCs en cualquiera de los muestras de sangre tomadas en los intervalos de tiempo establecidos durante el periodo de seguimiento tienen mayor riesgo de muerte que las pacientes con menos de 10 CTCs ($p=0.022$). Esta misma relación también es encontrada en el subgrupo de pacientes con metástasis ($p=0.038$).

Población/Nº CTCs	Ratio	p
M0+M1 CTCs+ (N=55)		
1-5	0.92	0.904
>5-9	1.34	0.795
≥10	9.20	0.022
Sólo M1 CTCs+ (N=18)		
1-5	0.87	0.852
>5-9	1.51	0.725
≥10	10.64	0.038

Tabla 11: Número de CTCs y riesgo de muerte

Las CTCs se detectaron con mayor frecuencia dentro de los primeros 24 meses. Sin embargo, la presencia de CTCs se correlacionó significativamente con el riesgo de muerte dentro de los dos primeros intervalos de tiempo: 1-5 meses ($p=0.002$) y >5-12 meses ($p=0.029$), en contraste con el intervalo de tiempo comprendido entre los 12-50 meses

($p=0.154$), donde no se encontró relación estadísticamente significativa entre el riesgo de muerte y la presencia de CTCs.

Por el contrario, para las pacientes metastásicas sólo se encontró correlación en el primer intervalo de tiempo 1-5 meses ($p=0.006$)

Población/ Intervalo tiempo	Ratio	p
M0+M1 CTCs+ (N=55)		
Muestra basal	1.02	0.100
1-5 meses	1.23	0.002
>5-12 meses	1.04	0.029
>12-24 meses	1.13	0.154
24-50 meses	1.05	0.111
Sólo M1 CTCs+ (N=18)		
Muestra basal	1.01	0.614
1-5 meses	1.35	0.006
>5-12 meses	1.08	0.269
>12-24 meses	1.85	0.319
24-50 meses	1.24	0

Tabla 12: Presencia de CTCs en los diferentes intervalos de tiempo y riesgo de muerte

Dado que el mayor riesgo de muerte se encontró en el primer intervalo de tiempo, es decir, durante los 5 primeros meses de la terapia, realizamos un análisis detallado de las CTCs en este periodo. Nuestros resultados mostraron que las pacientes con más de 5 CTCs durante los 5 primeros meses tuvieron mayor riesgo de muerte que las pacientes con menos de 5 CTCs ($p=0.002$).

Resultados

Riesgo de muerte		
Nº CTCs	Ratio	p
1-5	2.79	0.141
>5	16.9	0.002

Tabla 13: Persistencia de CTCs

5.2. ESTUDIO-2: CARACTERIZACIÓN DE BIOMARCADORES EN CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA

Detección de CTCs antes y después del tratamiento

De las 98 pacientes que participaron en nuestro estudio, antes de someterse a cualquier tipo de tratamiento sistémico identificamos CTCs en 46 (46.9%) de ellas. El número medio de CTCs detectadas fue de 3.4 células por 30mL de sangre periférica; en un rango comprendido entre 1 y 19 CTCs.

Después de tres ciclos de tratamiento adyuvante aislamos CTCs en 13 de 38 pacientes (34.2%). El número medio fue de 2.6 CTCs por 30 mL de sangre; en un rango de 1 a 7 CTCs.

Y al final del tratamiento neoadyuvante, las CTCs fueron detectadas en 16 de 35 pacientes (45.7%). Siendo el número medio de 2.6 células por 30mL y el rango osciló entre 1 y 9.

Cuando se comparó la incidencia de CTCs detectadas en las muestras basales ($p=0.30$) frente a las muestras de sangre que se tomaron secuencialmente a lo largo del tratamiento ($p=0.39$), no se encontraron diferencias significativas.

La presencia de una célula CK+, o más, en al menos uno de los tres tubos recogido a las pacientes fue considerado como resultado positivo.

Pacientes	CK+	Media	Rango	p	
Pre-tratamiento	98	46 (46.9%)	3.4	1-19	0.30
Adyuvantes	38	13 (34.2%)	2.6	1-7	0.39
Neoadyuvantes	35	16 (45.7%)	2.6	1-9	

Tabla 14: Detección de CTCs

Sobre las muestras de sangre disponibles realizamos los siguientes análisis. En el primer tubo, detección de células CK+ y expresión de RE. En el segundo tubo, detección de CTCs mediante la expresión de EGFR y RP. Y en el tercer tubo, expresión de CK y estado de los genes HER2/TOPO-II α (mediante FICTION). Observamos una tasa más alta de CTCs en sangre en el primer tubo (56.5%) frente al segundo tubo (28.30%), en las muestras basales. Lo mismo ocurre con las muestras tomadas tras los tratamientos. Esta variedad se debe a la técnica empleada para la detección del marcador que se desea estudiar. Hemos comprobado que la técnica más eficaz para identificar células CK+ en sangre periférica es el sistema APAAP (alcalin fosfatasa antialcalin fosfatasa). La distribución de las CTCs según la técnica de detección utilizada se representa en la siguiente figura.

Además en el 80% de las muestras CK+, se detectaron 4 o menos CTCs para el análisis de biomarcadores.

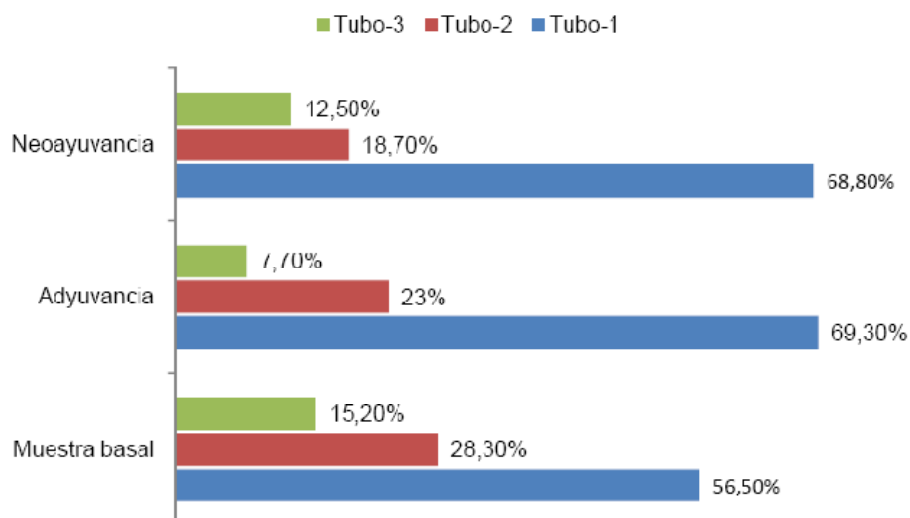


Tabla 15: Distribución de las CTCs en las muestras de sangre

Resultados

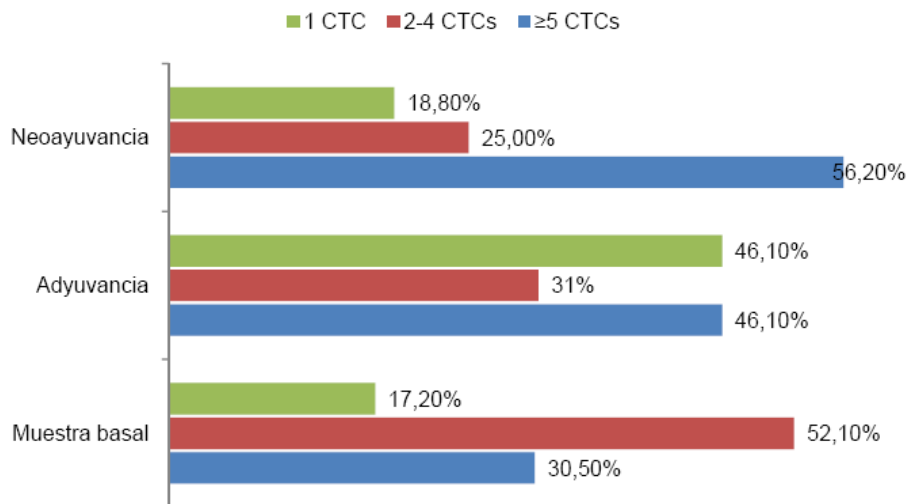


Tabla 16: Estratificación de acuerdo con las CTCs encontradas

Características clínico-patológicas de las pacientes y estado de las CTCs

Las pacientes que se seleccionaron para participar en este estudio fueron diagnosticadas de cáncer de mama en estadio precoz y localmente avanzado. Las pautas de quimioterapia que se administraron fueron: antraciclinas (66.3%), taxanos (54.1%), ciclofosfamida (100%) y fluorouracilo (66,3%). El trastuzumab fue suministrado sólo a aquellas pacientes con tumores HER2+ (13.2%). Adicionalmente, las pacientes con tumores primario que expresaron receptores hormonales positivos recibieron tratamiento endocrino con letrozol (44.8%), tamoxifeno o tamoxifeno (2-3 años) seguido de exemestrano (4.1%).

Las características clínico-patológicas de las pacientes y la presencia o ausencia de CTCs se recogen en la siguiente tabla:

98 pacientes		CTCs+	CTCs-	P (χ^2)
Edad	≤50 años	14 (41.2%)	20 (58.8%)	NS
	>50 años	32 (50%)	32 (50%)	
Histología	Ductal	40 (47%)	45 (53%)	NS
	Otros	6 (46.2%)	7 (53.8%)	
Tamaño tumoral	≤2cm	25 (54.3%)	21 (45.7%)	NS
	>2-5cm	15 (39.5%)	23 (60.5%)	
Nódulos linfáticos Est. Patológico	pN0	9 (39.1%)	14 (60.2%)	NS
	pN1-N2	11 (61.1%)	7 (38.9%)	
Nódulos linfáticos Est. Clínico	cN0	7 (41.2%)	10 (58.8%)	NS
	cN+	7 (38.9%)	11 (61.1%)	
Grado	I	8 (38.1%)	13 (61.9%)	NS
	II	15 (44.1%)	19 (55.9%)	
Rcpt. Hormonales	RH+	35 (46.7%)	40 (53.3%)	NS
	RH-	11 (47.8%)	12 (52.2%)	
Estado HER2	HER2+	3 (21.4%)	11 (78.6%)	0.046
	HER2-	43 (51.2%)	41 (48.8%)	
Estado p53	P53+	26 (51%)	25 (49%)	NS
	P53-	7 (50%)	7 (50%)	
Ki67	≤14%	20 (52.6%)	18 (47.4%)	NS
	>14%	26 (43.3%)	34 (56.7%)	

Tabla 17: Características de las pacientes y presencia de CTCs

Cabe destacar que tras analizar las muestras de sangre basales, antes de cualquier tipo de tratamiento, de las 14 pacientes con tumores primarios HER2+, 3 presentaron CTCs/HER2+ y las 11 restantes fueron CTCs- (p=0.046). En cambio no se encontró relación significativa entre las características clínico-patológicas de las pacientes y la presencia o ausencia de CTCs.

En nuestro estudio hemos analizado a un grupo de pacientes en las que no se detectaron CTCs en ninguna de las muestras de sangre periférica tomadas a lo largo del tiempo de estudio; como fue el caso de 43 pacientes

Resultados

(43,9%). No encontramos relación estadísticamente significativa entre la no presencia de CTCs en sangre periférica y el tamaño del tumor, el estado ganglionar, la histología, el estado de los receptores hormonales, el estado del Ki67 y p53 o el procedimiento quirúrgico. Sin embargo, sí observamos mayor incidencia de pacientes sin CTCs detectables entre las pacientes menores de 50 años ($p=0.02$), con tumores de grado 1-2 ($p=0.006$) y con amplificación del gen HER2 ($p=0.02$).

Caracterización de las CTCs aisladas antes del tratamiento sistémico

Expresión de recetores hormonales en las CTCs y en el tumor primario

Analizamos la expresión del receptor de estrógenos (RE) en las CTCs aisladas de 20 pacientes, antes de cualquier tipo de tratamiento sistémico. 10 (50%) de estas pacientes presentaban CTCs/RE+. En 5 (50%) de ellas CK+/RE+ observamos heterogeneidad para la expresión del receptor de estrógenos, por lo tanto, en una misma muestra de sangre pueden coexistir CTCs RE+ y RE-.

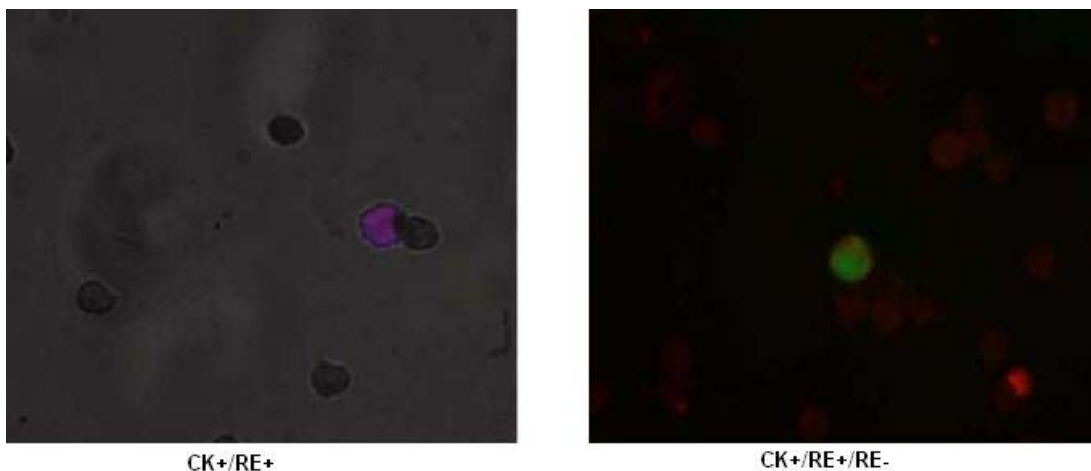


Ilustración 22: Expresión de RH en CTCs

Entre las 14 pacientes con tumores RE+ y con CTCs en sangre periférica antes de cualquier tipo de tratamiento sistémico, analizamos la expresión del RE en estas células. Como era de esperar 9 de estas pacientes fueron clasificadas como CK+/RE+ (61.5%) mientras que 5 de ellas fueron CK+/RE- (38.5%).

CTCs	Basal (RH-/HER2-)	Luminal (RH+/HER2-)	HER2+ (RH+/HER2+)	p
RE+	1 (16.7%)	7 (63.6%)	2 (66.7%)	NS
RE-	5 (83.3%)	4 (36.4%)	1 (33.3%)	

Tabla 18: Expresión de receptor de estrógenos en CTCs

Analizamos la expresión del receptor de progesterona (RP) en las CTCs aisladas de 27 pacientes, antes de cualquier tipo de tratamiento sistémico. 9 de éstas (33%) presentaron tinción nuclear para la expresión del RP y encontramos heterogeneidad para la expresión de RP en 1 caso (11.1%).

Cuando se correlacionó la expresión del RP entre las CTCs y su correspondiente tumor primario observamos que: 17 tumores RP+ (68.2%) no expresaron este marcador en las CTCs aisladas en sangre periférica. En contraste, sólo 8 tumores primarios RP+ (31.8%) también lo expresaron sus CTCs. Por tanto, encontramos discrepancias en la expresión del receptor de progesterona entre las CTCs y su correspondiente tumor primario.

CTCs	Basal (RH-/HER2-)	Luminal (RH+/HER2-)	HER2+ (RH+/HER2+)	p
RP+	1 (50%)	8 (33.3%)	0 (0%)	NS
RP-	1 (50%)	16 (66.7%)	1 (100%)	

Tabla 19: Expresión de receptor de progesterona en CTCs

Cabe señalar que no hubo relación entre la expresión de los receptores hormonales en el tumor primario y las CTCs (RE $p=0.17$ y RP $p=0.55$). Además el estado de los receptores hormonales en las CTCs no mostró asociación con las características clínico-patológicas basales de las pacientes.

Resultados

Expresión de EGFR en CTCs y en el tumor primario

En las extracciones basales, detectamos CTCs/EGFR+ en 27 pacientes (27.5%). Después de las pautas de tratamiento, detectamos CTCs/EGFR+ en 13.9% de las pacientes adyuvantes y en 11.1% de las pacientes neoadyuvantes.

No encontramos relación significativa entre el estado del EGFR en las CTCs y las características clínico-patológicas de las pacientes; edad, tamaño tumoral, estado de los ganglios linfáticos, histología, grado tumoral, estado del p53, ki67 y HER2. Sin embargo, sí hemos observado una alta probabilidad de pacientes cuyos tumores primarios expresaron receptores hormonales y las CTCs aisladas eran EGFR+ (33.3% tumor primario RH+ y CTCs/EGFR+ vs 8.7% tumor primario RH- y CTCs/EGFR+; $p=0.01$).

CTCs	Basal (RH-/HER2-)	Luminal (RH+/HER2-)	HER2+ (RH+/HER2+)	P
EGFR+	2 (11.1%)	24 (35.8%)	1 (7.7%)	0.03
EGFR-	16 (88.9%)	43 (64.2%)	12 (92.3%)	

Tabla 20: Expresión de EGFR en CTCs

Estado de los genes HER2 y TOPO-II α en las CTCs y en el tumor primario

Las CTCs aisladas en 26 pacientes fueron analizadas para evaluar el estado de los genes HER2 y TOPO-II α mediante FISH en al menos una célula, antes de que las pacientes inicien el tratamiento.

Analizando las CTCs aisladas en las muestras de sangre de 24 pacientes cuyos tumores primarios eran HER2-; observamos que estas células también eran HER2-. Tan sólo hubo un caso de una paciente con una CTC con amplificación del centrómero 17. Mientras que las CTCs de 2 pacientes con tumores primarios HER2+ ninguna de ellas tuvieron amplificación del gen.

CTCs	Basal (RH-/HER2-)	Luminal (RH+/HER2-)	HER2+ (RH+/HER2+)	P
HER2+	0 (0%)	0 (0%)*	0 (0%)	NS
HER2-	8 (100%)	16 (100%)	2 (100%)	

Tabla 21: Expresión de HER2 en CTCs

Entre las 26 pacientes CTCs+ analizadas, sólo 2 presentaron amplificación del gen TOPO-II α . Considerando a las pacientes con tumores primarios TOPO-II α no amplificado; 22 tenían CTCs/TOPO-II α -, 1 tuvo CTCs/TOPO-II α + y otra con amplificación del centrómero 17. En contraste, 2 tumores primarios con amplificación del gen TOPO-II α tuvieron CTCs/TOPO-II α -.

CTCs	Basal (RH-/HER2-)	Luminal (RH+/HER2-)	HER2+ (RH+/HER2+)	P
TOPO-II α +	1 (12.5%)	1 (6.3%)*	0 (0%)	NS
TOPO-II α -	7 (87.5%)	15 (93.7%)	2 (100%)	

Tabla 22: Expresión de TOPO-II α en CTCs

Las CTCs con amplificación del gen TOPO-II α no presentaron amplificación del gen HER2.

No hay asociación significativa entre el estado de los genes HER2 y TOPO-II α en las CTCs y su correspondiente tumor primario.

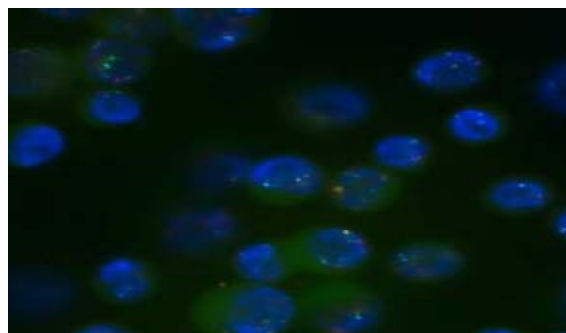


Ilustración 23: FICTION

Resultados

Caracterización de las CTCs después del tratamiento sistémico

Después de tres ciclos de tratamiento adyuvante, 13 de las 38 pacientes (34.2%) sometidas a esta pauta de tratamiento fueron CTCs+.

Con respecto al análisis de los biomarcadores, 6 de estas 13 pacientes tenían tumores primarios RE+ y en 4 de ellas sus CTCs también expresaron RE. Cabe destacar una paciente que con CTCs/RE- cuyo tumor primario fue RE+ y no presentó CTCs en la muestra de sangre extraída antes del tratamiento sistémico.

Con respecto al receptor de progesterona, observamos que 3 de 5 pacientes con tenían tumores primario RP+ presentaron CTCs/RP+. Curiosamente, 1 de las pacientes CTCs/RP+ después de tres ciclos de tratamiento provenía de un tumor primario RP+ y CTCs/RP- en la extracción basal.

En cuanto al EGFR, pudimos encontrar cambios fenotípicos en las CTCs a lo largo del seguimiento. Analizamos en caso de 5 pacientes CTCs/EGFR+; 1 paciente inicialmente fue CTCs/EGFR+ mientras que las otras 4 (11.1%) fueron CTCs/EGFR- en la extracción basal. Significativamente, 25 (69.4%) casos que eran CTCs/EGFR- en la extracción basal lo siguieron siendo después de recibir 3 ciclos de quimioterapia y 6 (16.6%) casos se transformaron en CTCs/EGFR-.

También evaluamos el estado del HER2 y TOPO-II α en 7 pacientes CTCs+. En 6 de ellas, el estado de estos genes fue normal. Entre las pacientes con tumores primarios HER2 negativo encontramos discordancia para la expresión de los genes HER2 y TOPO-II α en un solo caso; que fue clasificado como CTC con co-amplificación de HER2/TOPO-II α en CTCs.

Al final del tratamiento neoadyuvante, detectamos CTCs en 16 de las 35 pacientes (45.7%) sometidas a esta pauta de tratamiento.

La expresión de los receptores hormonales: RE y RP, se detectó en 3 (8.5%) y 1 (2.8%) de las pacientes, respectivamente. Cabe destacar que en dos pacientes, con tumores primarios RE+ y en la muestra basal CTCs/RE+, al final del tratamiento neoadyuvante sus CTCs dejaron de expresar el RE (CTCs/RE-).

En las 36 muestras analizadas para la expresión del EGFR: hubo persistencia de CTCs/EGFR+ en 1 paciente, mientras que 7 (19.4%) se transformaron en CTCs/EGFR-. A su vez 25 (69.4%) de las pacientes que inicialmente eran CTCs/EGFR- lo siguieron siendo después del tratamiento, mientras que 3 de ellas fueron CTCs/EGFR+ en la última muestra de sangre.

En 9 de las pacientes donde aún se siguieron detectaron CTCs, evaluamos el estado de los genes HER2 y TOPO-II α . Ninguna de las células detectadas en las pacientes presentaba estos genes amplificados. En este caso, los correspondientes tumores primarios de 2 de ellas tenían amplificación del HER2 mientras que los 7 restantes fueron clasificados como tumores HER2-.

Analizando el estado de los biomarcadores seleccionados, para el estudio en las CTCs aisladas en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama antes y después del tratamiento; observamos que el 30% de las pacientes cambian su estado en las CTCs antes y después del tratamiento sistémico. Es decir, hay una biodinámica en la expresión de los marcadores a lo largo del tratamiento. Los cambios pueden reflejarse tanto en la presencia o ausencia de CTCs como en la expresión de los marcadores que pueden presentar.

Hemos observado que predominan los grupos de pacientes sin CTCs antes del tratamiento y después del tratamiento, independientemente de las pautas de administración; tanto en adyuvancia como neoadyuvancia.

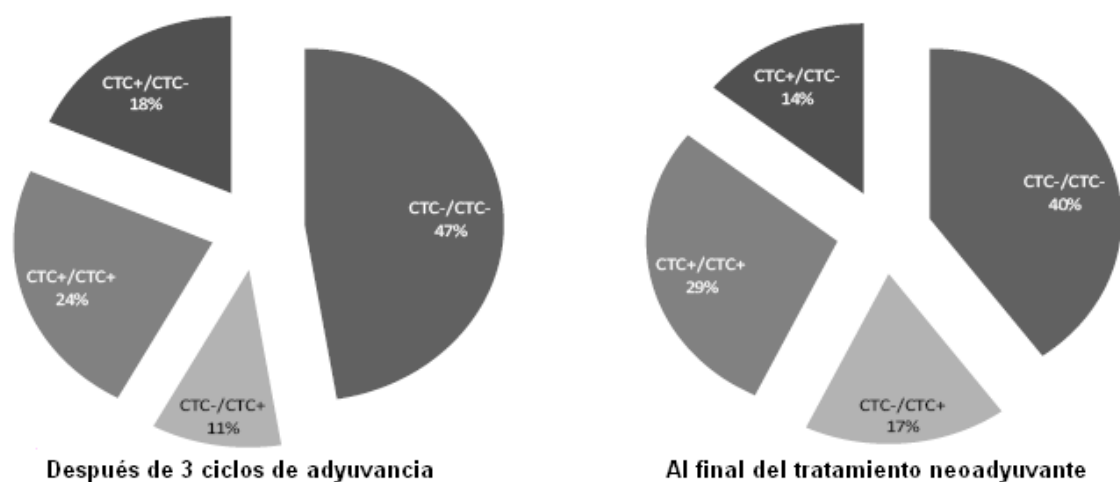


Tabla 23: Estado de las CTCs tras los tratamientos

Resultados

Subtipos moleculares de cáncer de mama y perfiles de los biomarcadores en CTCs

Las 98 pacientes que participaron en el estudio se clasificaron en tres grupos de tumores, siguiendo la clasificación de Perou (Perou, 2000) en base a sus perfiles moleculares: 67 (68.4%) tipo luminal (RE+/RP+/HER2-), 17 (17.3%) tipo basal o triple negativo (RE-/RP-/HER2-) y 14 (14.3%) tipo HER2+ (RE+/RP+/HER2+).

En nuestro estudio hemos correlacionado los biomarcadores: receptores hormonales, EGFR y estado de los genes HER2 y TOPO-II α , en las CTCs con los tres tipos moleculares de cáncer de mama. Cabe destacar que sólo encontramos asociación estadísticamente significativa entre la presencia de CTCs/EGFR+ y los tres tipos de tumores (luminal, HER2 amplificado y basal) con ($p=0.03$).

5.3. ESTUDIO-3: ANÁLISIS DE CD133 EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA NO METASTÁSICO Y CORRELACIÓN CON LOS RESULTADOS CLÍNICOS

Estado del CD133 en las CTCs y en el tumor primario

El marcador de superficie CD133 está asociado a células madre pluripotenciales; pudiendo ser un marcador útil para seleccionar células con posibles características de célula madre cancerígenas (CSC). Por ello analizamos la expresión del CD133 en un grupo de 98 pacientes con cáncer de mama en estadio precoz. Se confirmó la presencia CTCs/CK+ en 20 de estas pacientes (20.4%). Seguidamente analizamos la expresión de CD133 en este grupo. Se observa expresión de CD133 en 13 de las 20 (65%) pacientes. El número medio de CTCs CK+/CD133+ es de 1.46 células por 10 mL de sangre periférica (rango 1-4 células).

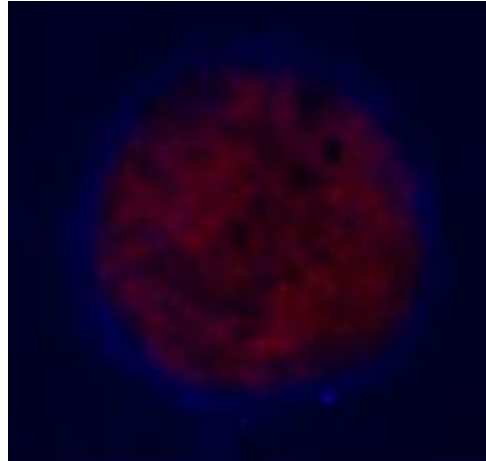


Ilustración 24: Expresión CD133

La heterogeneidad en la expresión de marcadores en CTCs también pudo observarse en el caso del CD133, se detectó en un 75% de los casos. En aquellas pacientes en las que fuimos capaces de detectar más de una CTC, observamos que pueden coexistir CTCs CK+/CD133+ y CK+/CD133-.

Comparamos el estado de la expresión del marcador CD133 en las CTCs aisladas en las pacientes antes y después de recibir tratamiento sistémico; aplicado en adyuvancia o neoadyuvancia. Cabe indicar que de las 98 pacientes que se enrolaron en el estudio: 1 abandonó el estudio, 73 recibieron quimioterapia y 24 terapia endocrina como único tratamiento. Sólo incluimos en nuestro estudio las pacientes que fueron tratadas con quimioterapia.

Comparamos la presencia de CTCs/CD133+ antes y después de recibir el tratamiento. En las muestras basales o pre-tratamiento, se confirmó la presencia de CTCs en 17 de 73 pacientes (23.3%) siendo 10 de estas 17 muestras CD133+ (58.8%). El número medio de células Ck+/CD133+ fue de 1.6 (rango 1-4). Después de recibir tratamiento quimioterápico se confirmó la presencia de CTCs en 23 de 73 pacientes (31.5%) y 11 de 23 (47.8%) coexpresaron CD133 con una media de 1.54 células (rango 1-3).

Aunque la proporción de pacientes de CTCs CK+/CD133+ fue ligeramente más elevado antes de recibir el tratamiento sistémico, no se encontraron diferencias significativas antes y después de la quimioterapia ($p=0.53$).

Resultados

Pacientes CK+	CD133+	Media	Rango	p
Pre-tratamiento 17/73	10/17 (58.8%)	1.6	1-4	NS
Adyuvantes 23/73	11/23 (47.8%)	1.54	1-3	

Tabla 24: Expresión de CD133 en CTCs

Es notable destacar que alrededor del 10.2% de las pacientes cambiaron el estado de sus CTCs después del tratamiento pasaron a ser CTCs/CK+ y 5 de 8 (62.5%) co-expresaron CD133. Entre las pacientes con CTCs antes del tratamiento; predominó el grupo de pacientes CTCs CK+/CD133+ antes del tratamiento y el grupo sin CTCs después del tratamiento. Además, algunas pacientes CK+/CD133- en las muestras basales se transformaron en CK+/CD133+ después de recibir quimioterapia. En este caso vuelve a observarse la biodinámica de las CTCs.

En cuanto a la relación del marcador CD133 con la evolución de la enfermedad a lo largo del seguimiento, encontramos que un grupo de pacientes CTC- antes del tratamiento después del tratamiento 6 pacientes pasaron a ser CTCs CK+/CD133+; 2 sufrieron una recaída de la enfermedad y 1 murió por recurrencia del cáncer de mama.

Expresión de CD133 en CTCs y correlación con las características clínico-patológicas de las pacientes

Las características clínico-patológicas de las pacientes, con cáncer de mama en estadio temprano o localmente avanzado, en la línea basal de acuerdo con el estado de sus CTCs para el CD133 se recogen en la siguiente tabla.

20 pacientes		CK+/CD133+	CK+/CD133-	P (χ^2)
Edad	≤50 años	6 (85.7%)	1 (14.3%)	NS
	>50 años	7 (53.8%)	6 (46.2%)	
Histología	Ductal	11 (68.8%)	5 (31.2%)	NS
	Otros	2 (50%)	2 (50%)	
Tamaño tumoral	≤2cm	8 (80%)	2 (20%)	NS
	>2-5cm	3 (42.9%)	4 (57.1%)	
	>5cm	2 (66.7%)	1 (33.3%)	
Nódulos linfáticos	N0	3 (50%)	3 (50%)	NS
	N+	10 (71.5%)	4 (28.5%)	
Grado	I	4 (100%)	0 (0%)	NS
	II	3 (75%)	1 (25%)	
	III	5 (45.5%)	6 (54.5%)	
	Desconc.	1 (100%)	0 (0)	
Rcpt. Hormonales	RH+	10 (76.9%)	3 (23.1%)	NS
	RH-	3 (42.9%)	4 (57.1%)	
Estado HER2	HER2-	13 (76.5%)	4 (23.2%)	0.03
	HER2+	0 (0%)	3 (100%)	
Estado p53	P53+	8 (80%)	2 (20%)	NS
	P53-	1 (50%)	1 (50%)	
	Desconc.	4 (4%)	4 (50%)	
Ki67	<14%	8 (100%)	0 (0%)	0.01
	≥14%	5 (41.7%)	7 (58.3%)	

Tabla 25: Características clínicas de las pacientes y expresión de CD133 en CTCs

Pudimos observar que la expresión del gen HER2 y Ki67 en el tumor primario se correlacionó con la presencia en sangre periférica de CTCs CK+/CD133+ ($p=0.03$ y $p=0.01$, respectivamente). Los tumores HER2- y baja proliferación ($Ki67<14\%$) mostraron un alto índice de CTCs CK+/CD133+. Y no se encontró relación significativa entre la expresión de CD133 en CTCs y el resto de características clínico-patológicas de las pacientes; como son edad, histología, tamaño tumoral, estado de los nódulos linfáticos, grado tumoral, expresión de receptores hormonales y expresión de p53.

Resultados

Expresión de CD133 en CTCs y subtipos de tumores

Correlacionamos la expresión de CTCs CK+/CD133+ con los tres subtipos moleculares de tumores primarios. Cabe destacar una asociación estadísticamente significativa sólo entre los tumores de tipo luminal y CTCs CD133+ antes del tratamiento ($p=0.006$). La presencia de CTCs CK+/CD133+ fue más común en los tumores tipo luminal en comparación con los tipo basal y tipo HER2 amplificado.

Pre-tratamiento CTCs	Luminal	Basal	HER2+	P
CK+/CD133+	10 (90.9%)	3 (50%)	0 (0%)	0.006
CK+/CD133-	1 (9.1%)	3 (50%)	3 (100%)	

Tabla 26: Relación entre tipo molecular de tumor primario y expresión de CD133 en las CTCs

Cuando analizamos sólo al subgrupo de pacientes que recibieron quimioterapia como parte del tratamiento sistémico, la asociación entre la presencia de CTCs CK+/CD133+ y los tumores luminales se mantuvo estadísticamente significativa ($p=0.026$). Después de la quimioterapia, no hubo diferencias significativas entre la distribución de las células CK+/CD133+ ó CD133- en los tres subtipos de tumores de cáncer de mama ($p=0.35$).

Post-tratamiento CTCs	Luminal	Basal	HER2+	P
CK+/CD133+	6 (50%)	4 (66.6%)	1 (20%)	0.35
CK+/CD133-	6 (50%)	2 (33.3%)	4 (80%)	

Tabla 27: Expresión de CD133 en CTCs después del tratamiento

Expresión de CD133 en CTCs en las pacientes que recibieron quimioterapia como tratamiento sistémico

Es evidente que la diseminación de células con características de células madre según los subtipos de tumores y que el enriquecimiento de células madre de cáncer de mama en el tumor primario después de administrar quimioterapia neoadyuvante, juega un papel en la resistencia a fármacos. Basándonos en estos antecedentes hemos analizado la expresión de CD133 en CTCs de los distintos subtipos de cáncer de mama antes y después de la quimioterapia.

43 (64.2%) de las 67 pacientes con tumores tipo luminal recibieron tratamiento de quimioterapia seguido de terapia endocrina: 26 en adyuvancia y 17 en neoadyuvancia. Antes del tratamiento, 7 (87.5%) tuvieron CTCs/CD133+ y sólo 1 (12.5%) CTCs/CD133-. Después de la quimioterapia, 6 (50%) de las pacientes fueron CTCs/CD133+ y sólo 6 (50%) CTCs/CD133-. No encontramos relación significativa entre CTCs CK+/CD133+ y los tumores tipo luminal.

Considerando sólo a las pacientes con tumores tipo basal o triple negativo, 17 (17.3%), todas recibieron tratamiento convencional con quimioterapia. 3 (60%) presentaron CTCs/CD133+ antes del tratamiento mientras que 4 (80%) fueron CTCs/CD133+ después del tratamiento. No encontramos diferencias significativas entre la proporción de CTCs CK+/CD133+ antes y después de la quimioterapia. No hubo relación significativa entre CTCs CK+/CD133+ y los tumores tipo basal.

En cuanto a los tumores con HER2 amplificado (14 pacientes), antes del tratamiento encontramos CTCs/CD133+ en algunas pacientes mientras que en 2 pacientes fueron CD133-. Después de aplicar la quimioterapia y tratamiento con trastuzumab en 5 pacientes encontramos: sólo 1 (20%) paciente CD133+ y 4 (80%) CD133-. No hubo diferencias significativas entre la proporción de CTCs CK+/CD133+ antes y después del tratamiento sistémico. No hubo relación significativa entre CTCs CK+/CD133+ y los tumores tipo HER2 amplificado.

6. DISCUSIÓN

La sistemática natural del cáncer de mama se caracteriza por la diseminación temprana de células tumorales, incluso cuando el tamaño del tumor es relativamente pequeño. El proceso de metástasis implica un vertido de células, que en el caso del cáncer de mama puede ocurrir a través del sistema sanguíneo y/o linfático, con la posible colonización de nuevos órganos y el posterior desarrollo de un nuevo tumor en otro órgano distante (Pantel and Brakenhoff 2004).

Actualmente nos seguimos encontrando con la problemática de aquellas pacientes que a pesar de ser consideradas “de buen pronóstico” recaen en la enfermedad al tiempo de ser diagnosticadas. Es en estos casos en los que se hace necesario establecer nuevos y adicionales factores pronóstico.

La presencia de células tumorales en sangre, a las que denominamos CTCs, es pues un paso esencial aunque no suficiente para el desarrollo del proceso metastásico. Así lo apoyan varios estudios (Cristofanilli, Broglio et al. 2007), (Franken, de Groot et al. 2012) en los que se pone de manifiesto la importancia del seguimiento de las CTCs en pacientes con cáncer de mama metastásico. Hay una asociación significativa entre la detección de CTCs y el riesgo de muerte en las pacientes. Es por ello, por lo que se puede concluir que la detección de CTCs en sangre periférica puede ser un importante factor pronóstico en pacientes con cáncer de origen epitelial: mama, pulmón y colon (Shibue and Weinberg 2010).

Siguiendo este razonamiento; las CTCs pueden considerarse como precursores metastásicos capaces de la iniciación de una lesión clonal metastásica (Yu, Stott et al. 2011). Sin embargo, tenemos que tener en cuenta que las CTCs son eventos extraordinariamente raros: entendiéndolo por ello el pequeño número en el que son detectadas. Aunque el avance en la comprensión del proceso metastásico ha sido más que evidente en los últimos años todavía queda mucho por entender sobre los mecanismos genéticos, fenotípicos y funcionales implicados en dicho evento. No obstante, sí sabemos con certeza que el proceso metastásico es altamente ineficiente, es decir, son pocas las células que diseminadas en sangre tienen capacidad para iniciar una metástasis. Lo que también explica las limitaciones implícitas al proceso y que se correlacionan con las limitaciones técnicas para poder estudiarlo.

Discusión

El interés que ha despertado el conocimiento de este proceso, con especial enfoque en el estudio de las CTCs, ha permitido que haya aumentado el número de estudios en los que se valida la capacidad predictiva y pronóstico de las CTCs.

La sangre periférica ha sido históricamente uno de los especímenes más importantes de diagnóstico para el control de las CTCs; debido principalmente a la facilidad de recolección de las muestras. La extracción de sangre periférica es un proceso relativamente indoloro y puede llevarse a cabo más asiduamente.

No obstante, a pesar de que estudios recientes demuestran que la presencia de CTCs antes del tratamiento en pacientes con cáncer de mama puede asociarse a mal pronóstico (Cristofanilli, Hayes et al. 2005), (Cristofanilli, Broglio et al. 2007); la utilidad clínica en pacientes en estadios tempranos es aún incierta.

En el caso concreto del cáncer de mama; es aceptado que la presencia de un número determinado de CTCs (5CTCs/7.5ml de sangre) es indicativo de un mal pronóstico en este tipo de pacientes. Pero si bien su presencia puede aportar información sobre la evolución de la enfermedad, es necesario introducir la caracterización genética y fenotípica en su estudio si queremos obtener una potencial y complementaria herramienta predictiva en este tipo de pacientes (Gervasoni, Monasterio Muñoz et al. 2008), (Wang, Wu et al. 2006).

Como antes se explicaba, un número importante de estudios han validado la capacidad pronóstico de las CTCs en cáncer de mama, hasta el punto de que la *“American Joint Commission on Cancer Staging Manual”* incluye una nueva categoría M0(i+) en pacientes de cáncer de mama; para designar a pacientes con enfermedad microscópica en sangre o médula a pesar de que hayan sido diagnosticadas como “libres de enfermedad” (Lucci, Hall et al. 2012).

En base a los estudios realizados por los grupos ya mencionados, la *“US Food and Drug Administration”* (FDA) aprobó en 2007 el uso del equipo CellSearch® (Veridex, LLC) para la detección de CTCs y su potencial utilidad como herramienta pronóstico en pacientes con cáncer de mama metastásico (Lang, Mosalpuria et al. 2009), (Bidard, Mathiot et al. 2010). Estableciéndose por consenso un punto de corte por el cual a partir de 5 CTCs en 7,5 mL de sangre periférica se identificaba a pacientes con alto riesgo de recaída.

El principio del funcionamiento del CellsSearch® se basa en la captura inmunomagnética de células mediante el uso de anticuerpos dirigidos frente al antígeno de superficie EpCAM. La problemática que plantea el uso de esta tecnología radica precisamente en la proteína de superficie en la que basa el proceso de aislamiento de CTCs; puesto que puede dar lugar a falsos negativos. La proteína de superficie EpCAM no la expresan todos los tumores; por lo tanto, se pueden escapar CTCs que no la expresen (Mikolajczyk, Millar et al. 2011). Además se expresa en células de origen hematopoyético; esto puede dar lugar al origen de falsos positivos (Choesmel, Anract et al. 2004). También es sabido que hay tejidos con baja regulación de las proteínas de adhesión durante el proceso de diseminación tumoral: se cree que debido al proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT), (Gorges, Tinhofer et al. 2012). Por todo esto se cuestiona a la proteína EpCAM como buen marcador tumoral.

En nuestro caso, la tasa de detección de CTCs es similar a la encontrada en otros estudios donde se emplearon otros dispositivos; como pueden ser el caso del CellsSearch® (Lang, Mosalpuria et al. 2009), (Bidard, Mathiot et al. 2010). La principal ventaja de nuestra metodología de enriquecimiento y detección de CTCs, radica en el hecho de que es más versátil, en cuanto al tipo de marcadores que pueden ser utilizados, que los dispositivos anteriormente mencionados (Nadal, Fernández et al. 2012).

Por otra parte, uno de los principales problemas planteados en el tratamiento de los pacientes oncológicos, es el desarrollo de quimio-resistencia adquirida. Esto implica por defecto una progresión de la enfermedad después de la primera línea de tratamiento. La presencia de CTCs se puede emplear como un marcador alternativo, puesto que su detección nos informa sobre la probabilidad de recaída y sobre la potencial respuesta a los tratamientos, que el paciente pueda desarrollar. En este contexto, el papel pronóstico y predictivo de las CTCs podría resultar crucial para predecir el riesgo de metástasis y en la toma de decisiones terapéuticas (Pierga, Bonneton et al. 2004), (Tewes, Aktas et al. 2009). En nuestro estudio hemos demostrado que la presencia de CTCs en las pacientes a lo largo del tratamiento implicaba mayor riesgo de muerte ($p=0.035$) que aquellas pacientes que no las presentaron; independientemente de las características anatomopatológicas del tumor primario (Serrano, Lorente et al. 2011).

Discusión

Cabe destacar concretamente el caso de las pacientes con tumores de mama triple negativos. Es en estos casos donde nos encontramos con pacientes cuyos tumores carecen de dianas terapéuticas frente a las que dirigir los tratamientos. Se trata por tanto de pacientes diagnosticados con un mal pronóstico (Bartsch, Ziehermayr et al. 2010), (Isakoff 2010). Sin embargo, una característica importante presente en este tipo de tumor triple negativo, es el hecho de que sus células son positivas para la expresión del receptor EGFR. Sin embargo, y a pesar de ello, estos tumores no responden en la mayoría de los casos a los tratamientos inhibidores de la tirosin quinasa dirigidos contra el EGFR.

En nuestro estudio hemos comprobado que pacientes con CTCs/EGFR+, después de una primera línea de tratamiento adyuvante, perdían la expresión de este receptor, lo que les proporcionaba la capacidad de escapar al tratamiento, dando lugar a posteriores recaídas en estas pacientes. Los resultados de nuestro trabajo sugieren pues, que una posible explicación a la resistencia adquirida a los tratamientos anti-EGFR, desarrollados por estas pacientes, puede ser el hecho de que existan CTCs que no expresan dicha diana y por tanto serían refractarias al tratamiento.

Por todo ello, es pues necesario el análisis de los diferentes biomarcadores que pueden estar presentes en las CTCs detectadas en estas pacientes de cáncer de mama, en los estadios tempranos de la enfermedad. Necesario es, así mismo, correlacionar la presencia y características fenotípicas y genéticas de estas CTCs con las características anatomopatológicas del tumor primario del que proceden: con el propósito de seleccionar la pauta de tratamiento más adecuada.

En este estudio hemos realizado el aislamiento y detección de CTCs en diferentes pautas temporales sobre una población de 91 pacientes en estadio precoz de cáncer de mama. Con el objetivo principal de determinar su significado pronóstico y predictivo (Serrano, Lorente et al. 2011).

Los resultados obtenidos en este trabajo confirmaron, efectivamente y como ya se ha mencionado anteriormente, que la presencia de CTCs podría predecir el riesgo de muerte. Es importante destacar que el riesgo de muerte se incrementó cuando el número de CTCs era superior a 5 durante los 5 primeros meses de quimioterapia ($p=0.002$). Los resultados de estos primeros ensayos sugieren la

necesidad de establecer un punto de corte a partir del cual el número de CTCs pueda predecir la evolución de la enfermedad. Sin embargo, debemos tener en cuenta que es necesaria la implicación de un mayor número de pacientes que nos permitan determinar esta relación. Además estos resultados son coincidentes con los resultados de otros grupos de investigación en esta área (Cristofanilli, Broglio et al. 2007), (Ring, Smith et al. 2004), (Pantel, Muller et al. 2003) que argumentan la capacidad pronóstico de las CTCs en estadios tempranos en el desarrollo de metástasis a distancia. Los avances en este área de investigación han estado acompañados del desarrollo de nuevas técnicas de aislamiento y detección de CTCs (Woelfle, Breit et al. 2005), (Nagrath, Sequist et al. 2007).

A pesar de que el nivel en que las CTCs pueden predecir el riesgo de recaída, se hace interesante encontrar con mayor precisión el momento óptimo para tomar las muestras de sangre y la frecuencia de las extracciones (Hayes, Cristofanilli et al. 2006). En este sentido nuestros resultados evidencian que: la presencia de CTCs en sangre periférica durante los 12 primeros meses son un elemento predictivo de gran utilidad para la supervivencia global. Además, nuestros datos muestran un valor umbral de CTCs para identificar a las pacientes con alto riesgo de muerte antes y después de los 5 meses (5 CTCs vs 10 CTCs).

Por otra parte, se valora la potencial capacidad como factor predictivo de las CTCs. Así la detección de CTCs podría ser considerada una nueva herramienta para la valoración de respuestas a los tratamientos administrados. Es conocida la naturaleza heterogénea de la enfermedad del cáncer de mama. Esta heterogeneidad, que se determina mediante el análisis de biopsias tumorales, condiciona no sólo la valoración pronóstico de la enfermedad sino también el tipo de tratamiento a administrar. También es sabido que esta heterogeneidad es fruto de profundos y continuos cambios; que con una única biopsia no pueden ser obviamente analizados. Por tanto, el análisis de biopsias líquidas y reiterativas, como puede ser el caso de los análisis de CTCs, pueden ser de gran utilidad para la administración personalizada del tratamiento y también para el conocimiento biológico de la evolución del cáncer (Krebs, Metcalf et al. 2014), (Gasent Blesa, Alberola Candell et al. 2008), (Bear 2008). Además la caracterización de estas células puede ayudar a predecir la capacidad de metástasis en pacientes con cáncer

Discusión

de mama en estadio precoz (Gervasoni, Monasterio Muñoz et al. 2008),(Wang, Wu et al. 2006).

Así, en este punto, podemos definir que la importancia de los resultados derivados de nuestro estudio radica en los siguientes aspectos: a) validan la capacidad pronóstico de las CTCs en pacientes con cáncer de mama; b) sugieren que la persistencia de CTCs después del tratamiento con quimioterapia podría definir a un grupo de pacientes con alto riesgo de recaída; c) revelan que las CTCs pueden estar presentes en pacientes tanto metastásicas como en pacientes en estadios tempranos de la enfermedad.

El hecho claro es que las CTCs, además de ser una excelente herramienta por su comentada capacidad pronóstico y predictivo, son claves para un mejor entendimiento del proceso metastásico. Así un punto interesante en este sentido es la gran heterogeneidad presente en estas CTCs: heterogeneidad tanto fenotípica como genética, que puede existir no sólo entre ellas sino también entre ellas y el tumor primario. Estas diferencias pueden condicionar el pronóstico de la enfermedad y sobre todo la potencial respuesta al tratamiento (Lang, Mosalpuria et al. 2009). Por tanto, a medida que comencemos a conocer más sobre la biología de las CTCs podremos empezar a abordar mejor la manera de tratar la enfermedad. Por todo ello, el análisis de las CTCs nos abre una puerta para el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas y a tratamientos personalizados (Mego, Mani et al. 2010).

Es necesario pues abordar el estudio de caracterización tanto fenotípica como genética de estas células. Así uno de los trabajos aquí discutidos, que hasta donde sabemos es el más amplio realizado sobre la evaluación de biomarcadores en las CTCs aisladas en sangre periférica, ha consistido en la caracterización de las CTCs aisladas y detectadas en pacientes con cáncer de mama no metastásico (Nadal, Fernández et al. 2012).

Con la finalidad de determinar la posible complejidad fenotípica y genética de células tumorales circulantes elegimos seis marcadores. La elección de éstos se hizo teniendo en cuenta: por un lado, las implicaciones biológicas que dichos marcadores puedan tener en cuanto la capacidad de proliferación, supervivencia en medios hostiles, como es el torrente sanguíneo, o la posibilidad de evadir los procesos de anoikis y apoptosis; y por otro, la potencial utilidad clínica que la

presencia de estos marcadores pudiese tener, en cuanto a la posibilidad de ser potenciales dianas terapéuticas. En este contexto las principales líneas de tratamiento utilizadas fueron terapias basadas en principios biológicos y/o químicos. Entre los tratamientos quimioterápicos administrados a estos pacientes se encontraban: antraciclinas, taxanos, ciclofosfamida, y 5-fluoruracilo. Adicionalmente, las pacientes cuyos tumores primarios expresaron receptores hormonales también recibieron terapia endocrina con letrozol y tamoxifeno. Y sólo a las pacientes con tumores HER2 amplificado se les administró trastuzumab.

En base a ésto, se desarrolló un ensayo de trabajo que implicaba la correlación genética y fenotípica entre las CTCs y los tumores primarios de los que procedían. Con la pretensión de determinar: si las CTCs presentaban las mismas características genéticas y fenotípicas que el tumor y si la potencial resistencia a los tratamientos podía deberse a la pérdida de expresión de los marcadores en las CTCs.

En este estudio se caracterizaron a las CTCs en base a la expresión de los siguientes biomarcadores: receptores hormonales (estrógenos (RE) y progesterona (RP)), EGFR, CD133 y el estatus de los genes HER2 y TOPO-II α . Posteriormente, con el objeto de determinar su correspondencia con el tumor primario original, correlacionamos las características fenotípicas y genéticas de las CTCs con los datos anatomopatológicos del tumor de origen.

El análisis se realizó a partir de 30 mL de sangre divididos en tres tubos, con la finalidad de identificar cuáles eran los mejores marcadores para aislar y detectar CTCs y que tuviesen mayor correlación clínica. El principal problema que se nos planteó para el análisis, tanto fenotípico como genético, fue la tasa de detección de estas células. El número de células recogidas es bastante bajo y aún más por el hecho de tratarse de pacientes no metastásicas. Además hay que destacar que la sensibilidad y especificidad de la técnica dependía, como pudimos comprobar, del tipo de marcador usado. Siendo la citoqueratina (CK) el más eficaz, a pesar de no ser un marcador específico tumoral. Así mismo, el EGFR también demostró tener una gran sensibilidad.

La positividad de la muestras era determinada por la presencia de una o más células positivas para el marcador usado en cada momento (CK o EGFR). El hecho

Discusión

de que no existan estudios suficientes en este contexto del cáncer de mama no metastásico ha implicado que, si bien en cáncer de mama metastásico la determinación de un número de CTC \geq 5 es claramente un mal factor pronóstico, esta consideración no se ha podido aún establecer en los pacientes con cáncer de mama no metastásico. Por tanto en el caso de pacientes en estadio precoz, se necesitan más estudios para determinar el umbral a partir del cual podemos obtener información con validez clínica (Pierga, Bidard et al. 2008; Bidard, Mathiot et al. 2010).

La optimización de los análisis en cuanto a la detección de CTCs sería necesaria para llevar a cabo la caracterización exhaustiva de estas células y la utilización de esta tecnología emergente a gran escala en los ensayos clínicos (Riethdorf, Muller et al. 2010).

Por otra parte, diversos estudios en los que se correlacionan las características anatomopatológicas del tumor primario y la expresión de estos mismos marcadores en las CTCs se encontraron diferencias. Así los resultados obtenidos por el grupo de Lang (Lang, Mosalpuria et al. 2009) determinaban una mayor presencia de CTCs en pacientes con tumores primarios HER2+. Mientras que en otros estudios (Riethdorf, Fritsche et al. 2007), (Riethdorf, Muller et al. 2010) esta asociación no se confirmaba. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por nuestro grupo: en efecto, en nuestro estudio, las CTCs fueron encontradas con más frecuencia en pacientes con tumores primarios HER2-. En cuanto al resto de parámetros clínicos clásicos (TNM, tamaño tumoral, receptores hormonales...etc.): al igual que en la mayoría de los estudios, las CTCs se mostraron como una variable clínica independiente y no hallamos correlación estadística significativa entre su estatus y estos criterios clínico-patológicos mencionados.

Cabe recalcar la existencia de un grupo de pacientes de mal pronóstico, menores de 50 años de edad, con presencia de HER2 amplificado en el tumor primario y de alto grado nuclear, en el que no detectamos CTCs (Mego, De Giorgi et al. 2011). Esto podría estar explicado por la capacidad de las células para adquirir características mesenquimales en el proceso de transición mesenquima-epitelio (EMT). Estos cambios facilitarían el proceso de invasión y cascada metastásica (Yang and Weinberg 2008). Las CTCs derivadas de un proceso EMT podrían

modular su fenotipo y adquirir propiedades de células mesenquimales dificultando así su detección por los métodos convencionales empleados en el laboratorio (Kallergi, Papadaki et al. 2011).

La persistencia de CTCs a lo largo del tratamiento fue otra de las variables a estudiar. En nuestro análisis, el 35% de nuestra población de pacientes no cambiaban el estado de sus CTCs. Es decir, a pesar del tratamiento había pacientes que mantenían el mismo número y características de sus CTCs. Estos resultados entran en contradicción con los datos obtenidos en otros estudios previos; como en el caso de los grupos de Riethdorf y Pierga (Pierga, Bidard et al. 2008), (Riethdorf, Muller et al. 2010). Y especialmente en aquellas pacientes que recibieron terapias anti-HER2 (Riethdorf, Muller et al. 2010), (Pierga, Hajage et al. 2012). Esta discrepancia puede explicarse, en parte, porque analizamos 30 mL de sangre periférica en vez de 7,5 mL y porque sólo el 14,3% de nuestras pacientes recibieron trastuzumab como parte de su tratamiento.

En esta misma línea de trabajo, nuestro estudio demuestra que no hay concordancia en la expresión de los receptores hormonales (RE y RP) entre el tumor primario y sus correspondientes CTCs. Lo que concuerda con otros estudios (Fehm, Hoffmann et al. 2009). Además observamos que en una misma muestra de sangre coexistían poblaciones heterogéneas de CTCs con diferentes fenotipos, en base a la expresión o no de receptores hormonales.

Las técnicas actuales de análisis molecular, basadas en la tecnología de PCR, no tienen la suficiente especificidad para analizar genéticamente células individuales; debido a la pequeña cantidad de muestra. Por lo tanto, tampoco pueden detectar heterogeneidad entre las diferentes potenciales poblaciones de CTCs. Son las técnicas basadas en la inmunocitoquímica las únicas que se han revelado, hasta el momento, con mayor grado de especificidad y permiten una caracterización biológicamente más relevante de las subpoblaciones de CTCs.

Así por ejemplo, referenciándonos a la expresión de RH podríamos deducir que la distinta distribución, en cuanto a la expresión de éstos en las CTCs en una misma paciente, podría condicionar las diferentes respuestas al tratamiento hormonal y también la posterior respuesta al tratamiento quimioterápico. No

Discusión

obstante esta asociación necesita estar mejor caracterizada, con una mayor población de pacientes.

En cuanto a cambios en el fenotipo referidos a la expresión o no de los receptores hormonales en las CTCs con respecto al tumor primario, después de administrar las pautas de tratamiento, hemos observado: que hay dos grupos de pacientes claramente diferenciados. Un grupo de pacientes en cuyas CTCs se habían producido cambios en el fenotipo de los receptores hormonales y otro grupo de pacientes en las que se mantenían los fenotipos en las CTCs igual que el tumor primario. Dado que todas las muestras de sangre recogidas periódicamente y las pacientes han sido tratadas con quimioterapia; no podemos descartar que los cambios hayan sido inducidos por la droga administrada. Y por tanto, la selección clonal de las CTCs ha podido estar influenciada por la interacción con la quimioterapia.

La caracterización fenotípica de las CTCs aisladas también incluyó la identificación de la proteína EGFR. Este marcador se expresó en el 27% de las CTCs de las muestras de sangre basales. Al igual que ocurría con los otros biomarcadores ya descritos; no encontramos correlación con las características anatomopatológicas de los tumores primarios, excepto para los tumores con receptores hormonales positivos. Datos preclínicos han aportado evidencias de que la desigualdad que hay entre la expresión del EGFR y RE, entre las CTCs y éstas con su correspondiente tumor primario, puede mediar en el desarrollo a resistencias al tratamiento endocrino en las pacientes con receptores hormonales positivos. En cáncer de mama existe una probada relación entre la expresión del EGFR y los tumores triples negativos (Shou, Massarweh et al. 2004). Se podría abrir una interesante línea de investigación en este tipo de pacientes triple negativos; para las que no existen realmente marcadores específicos y que, por tanto, no son susceptibles de tratamientos específicos (Bartsch, Ziebermayr et al. 2010), (Isakoff 2010). Además, la expresión del EGFR en las CTCs podría representar un potencial biomarcador negativo en la respuesta a determinados agentes anticancerígenos incluyendo la terapia endocrina en pacientes con cáncer de mama RH+ (Osborne and Schiff 2003), (Creighton, Massarweh et al. 2008).

Por otro lado, menos del 25% de las pacientes CTCs+/EFGR+ se transformaron en CTCs+/EFGR- después del tratamiento. Lo que sugiere que los tratamientos convencionales administrados, como quimioterapia o trastuzumab, eliminan parcialmente subpoblaciones CTCs+/EGFR+. Aunque somos conscientes que nuestros resultados deben tratarse con cautela debido a la limitación del tamaño de la muestra.

La sobreexpresión del HER2 en la CTCs de las pacientes con cáncer de mama ha sido bien caracterizada en algunos estudios (Riethdorf, Muller et al. 2010), (Wulfing, Borchard et al. 2006). En estos estudios se describen las discrepancias existente entre el estatus del HER2 en las CTCs y en sus correspondientes tumores primarios analizando su expresión tanto en pacientes en estadios tempranos de la enfermedad como en pacientes metastásicas (Riethdorf, Muller et al. 2010), (Meng, Tripathy et al. 2004). En nuestro caso, la amplificación del gen HER2 no fue detectada en las CTCs aisladas. Estos resultados no coinciden con los obtenidos por otros grupos, que analizan la expresión mediante inmunofluorescencia de HER2. La ausencia de CTCs/HER2+ puede deberse a la ya comentada existencia de subpoblaciones de CTCs, debido a la heterogeneidad de la que parece hacer gala, pero también se debe tener en cuenta que el análisis se realiza sobre un bajo número de células que puede desestimar poblaciones CTCs/HER2+.

Por otra parte los genes HER2 y TOPO-II α se encuentra en la misma región cromosómica, en brazo largo del cromosoma 17 (17q), por lo que se aceptaba que la amplificación del gen HER2 conllevaba la amplificación de la TOPO-II α . Otros grupos de investigación (Glynn, Mahon et al.); (O'Malley, Chia et al. 2009) han demostrado que la amplificación del gen TOPO-II α en las pacientes con cáncer de mama no está confinado sólo a aquellas que tienen amplificado el gen HER2, simultáneamente. Esto sugiere que una proporción de pacientes HER2- (no amplificado) pueden presentar amplificaciones del gen TOPO-II α ; independientemente de la presencia de amplificación de HER2.

Estos resultados son coincidentes con los análisis genéticos con respecto a la amplificación de HER2 y TOPO2 encontrados en nuestro estudio. Así, en nuestra población de pacientes positivos para presencia de CTCs, el 50% de estas pacientes presentaban CTCs con amplificación del gen TOPO-II α mientras que esta

Discusión

anormalidad no era detectada en el gen HER2 (CTCs HER2-/TOPO2+.). Pero además, los tumores primarios de los que procedían las CTCs eran también negativos para la amplificación del gen: provenían de tumores HER2-. No obstante, es destacable que después de recibir tres ciclos de quimioterapia, observamos cambios fenotípicos y genéticos en las CTCs de las pacientes. Así, entre estos cambios se detectó la coamplificación en HER2 y TOPO-II α en CTCs en una paciente cuyo tumor primario y CTCs iniciales no presentaban amplificación ni de HER2- ni de TOPO-II α -. De acuerdo con otros grupos de investigación, estos hallazgos abren una nueva ventana de oportunidades porque tumores primarios de mama HER2- cuyas CTCs coamplifican los genes HER2 y TOPO-II α podrían beneficiarse de terapias anti-HER2 así como de tratamientos basados en las antraciclinas.

En nuestro estudio las CTCs/HER2- fueron aisladas después del tratamiento sistémico tanto en pacientes con tumores primarios HER2- como HER2+, incluso en pacientes tratadas con trastuzumab. Este hallazgo sugiere pacientes con tumores de mama con HER2 amplificado y CTCs/HER2- han podido ser seleccionadas por la terapia con trastuzumab. En esta población de pacientes cuyos tumores presentaban amplificación de HER2 la terapia biológica anti-HER2 se administraba en combinación con la quimioterapia.

Los principales parámetros estándar para la selección de los tratamientos para el cáncer de mama son: la expresión de los receptores hormonales para la terapia endocrina y el estado del gen HER2 para la terapia con anti-HER2. De todos los biomarcadores expresados en las CTCs, sólo el EGFR fue el que se encontró con más frecuencia en los tumores tipo luminal comparado con los tumores triples negativos y los tumores HER2 amplificados. Podríamos especular que, la asociación entre CTCs/EGFR+ y tumores de mama tipo luminal está explicado en parte por un aumento de las células tumorales que expresan EGFR; implicado en un bucle paracrino en el cual el factor de crecimiento producido por los macrófagos incrementa la capacidad de intravasación y migración de las células tumorales que expresan EGFR. La expresión del EGFR está relacionada con menor nivel de receptores hormonales, alta proliferación, inestabilidad genómica y sobreexpresión del HER2. Aunque esta asociación necesita ser bien caracterizada, parece ser que

los tumores luminales pueden ser más dependientes de este mecanismo que promueve la intravasación celular que otros subtipos de tumores de mama.

Un fenómeno propio del cáncer de mama es el desarrollo de metástasis años después de la erradicación con cirugía del tumor primario y el tratamiento sistémico (Aguirre-Ghiso 2007). Este proceso metastásico puede estar relacionado con la capacidad de las células tumorales de verter al torrente sanguíneo, sobrevivir y llegar a órganos distantes donde anidar periodos de tiempo en forma de células latentes, hasta que debido a estímulos determinados son capaces de formar nuevas metástasis. Esta capacidad de las CTCs de permanecer en estado de latencia y de autorrenovarse es una propiedad intrínseca de células madre progenitoras.

Al igual que ocurre con las CTCs, la identificación y definición de células madre tumorales (CSCs) es compleja en cuanto a sus características biológicas y a sus funciones. No obstante, se han identificado distintos marcadores asociados a lo que se ha identificado como células madre. En el caso del cáncer de mama, entre los marcadores que parecen ser más representativos de esta subpoblación de células tumorales cabe destacar: CD24, CD44 y CD133 (Kasimir-Bauer, Hoffmann et al. 2012), (Theodoropoulos, Polioudaki et al. 2010).

Los estudios realizados por el grupo de Schwab (Schwab, Peacock et al. 2012) junto con los anteriores mencionados nos han servido de base en este trabajo. Nuestro estudio se focalizó principalmente en el análisis de la expresión de CD133 como potencial marcador de células progenitoras del cáncer en las CTCs de pacientes con cáncer de mama. Los resultados del estudio nos llevó a cuestionarnos si las CTCs CK+/CD133+ son generadas durante el proceso de transición de epitelio-mesénquima (EMT): pudiendo estas células ser seleccionadas tras el tratamiento sistémico. Lo que sugiere que permanecen refractarias a la acción de los tratamientos administrados la resistencia a quimioterapia.

El desarrollo del proceso metastásico implica, cambios fenotípicos, genéticos y epigenéticos en las células tumorales. Estos cambios les permiten diseminar y sobrevivir adaptándose a nuevos microambientes. Entre estos cambios fenotípicos y genéticos se encuentra la adquisición de fenotipos mesenquimales a través del proceso de transición epitelio-mesénquima. Este proceso consiste en la pérdida total o parcial de las características de células epiteliales y la adquisición de fenotipos

Discusión

propios de células mesenquimales. Esto les permite pasar de ser células epiteliales (sésiles) a ser células mesenquimales (móviles). El proceso EMT es un conjunto de cambios moleculares que conducen a cambios en el comportamiento celular. El EMT se inicia cuando la célula epitelial tumoral abandona el tumor primario original y migra a un órgano diana para iniciar el desarrollo de un nuevo tumor. Todo este proceso de migración celular implica: la rotura de las uniones intercelulares, la deslocalización de las proteínas implicadas en éstas uniones y la reorganización del citoesqueleto celular (Zeisberg and Neilson 2009), (Miyazono 2009). Debido a la EMT, las células sufren cambios en el citoesqueleto y en la expresión de proteínas de superficie, como son el EpCAM y las CK, propias de células epiteliales. Todos estos cambios son esenciales para que las células adquieran características de células móviles (Thiery 2002).

Partiendo de la evidencia de que el marcador CD133 es característico de células madre y de su implicación en procesos de migración celular y vascularización; analizamos la expresión en las CTCs aisladas en pacientes con cáncer de mama en estadio precoz y la implicación en la resistencia a los tratamientos quimioterápicos.

En nuestro estudio detectamos una alta proporción de células tumorales circulantes que coexpresaban CD133 (CK+/CD133+); tanto antes como después de que las pacientes recibieran quimioterapia. Además, también nos encontramos con muestras de sangre de una misma paciente en la que coexistían poblaciones de CTCs heterogéneas para la expresión de CD133. Ya anteriormente se describe la heterogeneidad en la expresión de los receptores hormonales en la población de CTCs aisladas en una misma paciente (Nadal, Fernández et al. 2012). La heterogeneidad en la expresión de CD133 y receptores hormonales en las CTCs, aisladas en una misma paciente, apoya el concepto de heterogeneidad intratumoral y también los cambios fenotípicos de las CTCs derivadas de la EMT (Charafe-Jauffret, Monville et al. 2008), (Polyak 2011).

El hecho de que más de la mitad de las pacientes, tanto antes como después de cualquier tipo de tratamiento, presenten CTCs/CD133+ refleja la importancia de esta población celular. Se puede especular que las CTCs/CD133+ pueden ser relevantes para la progresión celular y metástasis o para la adaptación al medio

encontrado. Otros investigadores han informado que las CTCs de todos los pacientes con cáncer de próstata incluidos en el estudio expresaron CD133 (Armstrong, Marengo et al. 2011); estos resultados son coincidentes con nuestras observaciones. Especulamos que estas CTCs pudieron haber adquirido las propiedades de células madre durante su migración al torrente sanguíneo y contribuir a la progresión de la metástasis. Cabe señalar que el número de *cáncer stem cells* es pequeño en los tumores primarios; sin embargo, el CD133 se expresa ampliamente en las CTCs. Estas observaciones apoyan la idea de que las CTCs pueden funcionar como un conjunto de células con capacidad de autorrenovarse y migrar (Goss and Chambers 2010).

En nuestro estudio una alta proporción de CTCs de pacientes con cáncer de mama no metastásico expresaron el marcador de células madre CD133. Estos resultados eran coincidentes con los datos obtenidos por otros grupos de investigación (Mani, Guo et al. 2008) que demostraron como las células epiteliales de cáncer de mama adquieren características propias de *stem cells* al atravesar la barrera mesénquima-epitelio (EMT).

Aunque el CD133 ha sido utilizado como marcador para la identificación de células madre de tejidos normales y tumorales; se cree que el corte y unión del marcador a dominios de colesterol puede estar implicado en señales Hedgehog (SHH). Esta vía de señalización se requiere para la diferenciación celular primitiva y la interacción mesénquima-epitelio (Evangelista, Tian et al. 2006). Adicionalmente, la vía SHH juega un papel importante en la capacidad de migración de las células CD133+ derivadas de líneas celulares de cáncer (Chen, Lingala et al. 2011), (Uchida, Arita et al. 2011). Estas propiedades migratorias pueden explicarnos porqué encontramos tantas células CK+/CD133+ en el torrente sanguíneo de pacientes con cáncer de mama.

Cabe destacar que la selección clonal durante la progresión del tumor se puede reflejar en la evolución de la enfermedad. Las células generadas durante el proceso de EMT, han cambiado su fenotipo, lo que puede estar provocado por la administración de las propias terapias administradas. Estas células son un objetivo actual para el desarrollo de nuevos tratamientos específicos para la potencial

Discusión

erradicación de células circulantes y diseminadas (Mani, Guo et al. 2008), (Shipitsin, Campbell et al. 2007).

El trabajo se desarrolló pues, analizando la expresión de CD133 en CTCs antes y después de la quimioterapia, para intentar determinar la capacidad predictiva y pronóstico de este marcador sobre CTCs. En los resultados obtenidos se comprobó la existencia de cambios fenotípicos en las CTCs, de CTCs CK+/CD133- a CK+/CD133+ sugiriendo que la expresión de CD133 podría estar inducida por el efecto de la quimioterapia. Además, la mitad de las pacientes sin CTCs detectables en la muestra basal que pasaron a presentar CTCs después de la quimioterapia presentaron CTCs CK+/CD133+. Esto nos induce a pensar que la selección clonal de las CTCs/CD133+ después del tratamiento se ve influenciada por la terapia sistémica administrada a las pacientes. Es importante destacar que el 50% de las pacientes que sufrieron recaída en nuestro estudio pertenecían al subgrupo de pacientes CTCs- antes del tratamiento y CTCs+/CD133+ después de la quimioterapia. Lo que sugiere que esta subpoblación de CTCs puede predecir una recaída sistémica temprana.

Recientemente, Park y col. han demostrado que la frecuencia en que aparecen CTCs con características similares a *stem cells* varía acorde con el subtipo de tumor primario y el estadio histológico del mismo (Park, Lee et al. 2010). Por lo tanto, es de interés identificar las características clínico-patológicas de los tumores en pacientes de cáncer de mama con CTCs/CD133+. En nuestro grupo hemos encontrado que la presencia de estas células se asocia a pacientes con tumores que no presentan amplificación del gen HER2 (HER2-) y bajo índice de proliferación (Ki67).

El cáncer de mama es uno de los pocos tipos de tumores en los cuales la clasificación molecular ha logrado el diseño de terapias individualizadas, llevando a mejoras significativas en la supervivencia. Esta clasificación está lejos de ser perfecta y existen subgrupos dentro de los grupos establecidos marcados por los factores biológicos. La expresión de marcadores específicos de células madre en CTCs está asociado; con la resistencia innata a los agentes contra el cáncer y con el fracaso a los tratamientos. En consecuencia, las CTCs con fenotipo de células

madre pueden plantear importantes desafíos clínicos hacia la completa erradicación de la enfermedad mínima residual (MRD).

Uno de los objetivos fundamentales del análisis del CD133 sobre CTCs fue; determinar la contribución que su expresión podría tener sobre la heterogeneidad tumoral existente en los diferentes subtipos de cáncer de mama. En algunos estudios realizados sobre pacientes con cáncer de mama metastásico, independientemente de las características del tumor primario y el estado de las CTCs, se describe un enriquecimiento de CTCs/CD133+ después de administrar quimioterapia (Tanei, Morimoto et al. 2009), (Aktas, Tewes et al. 2009). En nuestro estudio nos hemos centrado específicamente en pacientes de cáncer de mama en estadios tempranos: en este caso no encontramos diferencias significativas, en cuanto, a la proporción de CTCs/CD133+, antes y después del tratamiento sistémico en la población general analizada.

El análisis de la presencia de CTCs CK+/CD133+ en los distintos subtipos de cáncer de mama; determinó, en este caso sí, diferencias significativas. Encontrándose estas diferencias en el porcentaje de CTCs/CD133+ aisladas según el subtipo tumoral. Así, se detectó un mayor porcentaje en los tumores de tipo luminal, en los análisis realizados antes de la administración de cualquier tipo de tratamiento. No obstante tras la administración del tratamiento quimioterápico, se detectó una disminución en la proporción de CTCs positivas para CD133. Sin embargo, lo contrario ocurría en el caso de los tumores primarios no luminales; triple negativo y HER2+. En estas pacientes se observó un enriquecimiento relativo de las CTCs/CD133+ después de la terapia sistémica. La frecuencia de CTCs con características de *stem cells* y fenotipo migratorio podría sugerir que estos subtipos puedan ser clasificados en base a la expresión de perfiles genéticos y fenotípicos relacionados con células progenitoras.

Este incremento de CTCs CK+/CD133+ después del tratamiento, en los tumores HER2 amplificado y triple negativo, podría sugerir que las células tienen la potencial capacidad para sobrevivir al tratamiento y que, por tanto, son refractarias al mismo. Con la consiguiente capacidad para poder desarrollar más tarde enfermedad metastásica. De hecho de 2 de las 4 (50%) pacientes con tumores triple negativo y CTCs CK+/CD133+ sufrieron recaída después de la quimioterapia dentro de los dos

Discusión

primeros años. En este punto es importante destacar que no se encontraron diferencias significativas; debido a la falta de seguimiento y al tamaño insuficiente de la muestra por la baja tasa de detección al tratarse de pacientes no metastásicas.

Otros grupos han analizado la expresión de marcadores característicos de células madre, tales como CD44 y ALDH1, en CTCs aisladas en pacientes con cáncer de mama (Aktas, Tewes et al. 2009), (Theodoropoulos, Polioudaki et al. 2010), (Kasimir-Bauer, Hoffmann et al. 2012). Dado que el marcador CD133 podría desempeñar un papel como potencial marcador de células madre en cáncer de mama; nuestros hallazgos son consistentes con otros autores que describen como las células epiteliales del cáncer de mama activan vías de células madre en el proceso epitelio-mesénquima (Mani, Guo et al. 2008). La activación de las vías de células madre implica la expresión de genes asociados a células endoteliales. Todo ello va a favorecer el mimetismo vascular y las propiedades migratorias de las células tumorales: implicando la diseminación del tumor y el desarrollo de una metástasis.

Debido a que las CSC conducen a la resistencia a los tratamientos quimioterápicos el conocimiento de las vías de señalización de estas células se convierten en una interesante diana terapéutica.

El hallazgo de nuevos tratamientos, especialmente en el caso de pacientes con cáncer de mama no metastásico que es potencialmente curable, aumenta el interés de la caracterización molecular de las CTCs. Se hacen necesarios más estudios para poder confirmar el papel de CD133 en la resistencia a la quimioterapia y su papel como diana de tratamientos anti-CSC y antivascuales.

Independientemente del perfil molecular, la presencia de CTCs proporciona una valiosa información pronóstica. Además, su erradicación es esencial para el éxito en el tratamiento del cáncer a largo plazo. Claramente, las *cancer stem cells* conducen a la resistencia a la quimioterapia y es por ello que son dianas atractivas para el desarrollo de nuevas terapias dirigidas contra ellas.

7. CONCLUSIONES

- 1) Las CTCs son un factor pronóstico importante e independiente de la supervivencia global.
- 2) La heterogeneidad de la distribución de los biomarcadores en las CTCs y la falta de correlación fenotípica y genética con el tumor primario; puede explicar la potencial resistencia que determinadas pacientes desarrollan a las terapias.
- 3) Esta heterogeneidad, reflejada en la asociación entre el estado de los receptores hormonales, EGFR, HER2 y TOPO2, entre las CTCs y los subtipos de tumores primarios de las que proceden: puede contribuir, en parte, a la diversidad en los patrones de expresión genética y en los distintos resultados clínicos según el subtipo de cáncer de mama.
- 4) La caracterización de los biomarcadores en CTCs podría convertirse en una herramienta útil para clasificar a las pacientes y aplicar terapias a medida y drogas dirigidas.
- 5) La expresión del biomarcador CD133 en CTCs es más frecuente en los tumores de tipo luminal antes de cualquier tipo de tratamiento.
- 6) Las células que expresan CD133 no incrementan significativamente su presencia después del tratamiento. Sin embargo, las CTCs CD133+ persisten tras el tratamiento administrado en los casos de pacientes no metastásicas de cáncer de mama.
- 7) Las células CD133+ presentan un potencial papel en la resistencia a la quimioterapia.
- 8) Los resultados de este trabajo requieren estudios adicionales que impliquen un número mayor de pacientes con cáncer de mama en estadio precoz para obtener conclusiones definitivas en este contexto.

8. BIBLIOGRAFÍA

Aguirre-Ghiso JA (2007). "Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy." *Nat Rev Cancer* 7(11): 834-46.

Aktas B, Tewes M, et al. (2009). "Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients." *Breast Cancer Res* 11(4): R46.

Armstrong AJ, Marengo MS et al. (2011). "Circulating tumor cells from patients with advanced prostate and breast cancer display both epithelial and mesenchymal markers." *Mol Cancer Res* 9(8): 997-1007.

Bartsch R, Ziebermayr R et al. (2010). "Triple-negative breast cancer." *Wien Med Wochenschr* 160(7-8): 174-81.

Bear HD (2008). "Measuring circulating tumor cells as a surrogate end point for adjuvant therapy of breast cancer: what do they mean and what should we do about them?" *J Clin Oncol* 26(8): 1195-7.

Bidard FC, Mathiot C et al. (2010). "Single circulating tumor cell detection and overall survival in nonmetastatic breast cancer." *Ann Oncol* 21(4): 729-33.

Braun S. and Pantel K (2000). "[Diagnosis and clinical significance of disseminated tumor cells in bone marrow]." *Dtsch Med Wochenschr* 125(41): 1237-9.

Braun S, Vogl FD et al (2005). "A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer." *N Engl J Med* 353(8): 793-802.

Charafe-Jauffret E, Monville F et al. (2008). "Cancer stem cells in breast: current opinion and future challenges." *Pathobiology* 75(2): 75-84.

Cheang MC, Chia SK et al. (2009). "Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer." *J Natl Cancer Inst* 101(10): 736-50.

Bibliografía

Cheang MC, Voduc D et al. (2008). "Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype." *Clin Cancer Res* 14(5): 1368-76.

Chen X, Lingala S et al. (2011). "Epithelial mesenchymal transition and hedgehog signaling activation are associated with chemoresistance and invasion of hepatoma subpopulations." *J Hepatol* 55(4): 838-45.

Choesmel V, Anract P et al. (2004). "A relevant immunomagnetic assay to detect and characterize epithelial cell adhesion molecule-positive cells in bone marrow from patients with breast carcinoma: immunomagnetic purification of micrometastases." *Cancer* 101(4): 693-703.

Cianfrocca M and Goldstein L (2004). "Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer." *Oncologist* 9(6): 606-16.

Claus EB, Petruzella S et al. (2005). "Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in women diagnosed with ductal carcinoma in situ." *JAMA* 293(8): 964-9.

Coghlin C and Murray GI (2010). "Current and emerging concepts in tumour metastasis." *J Pathol* 222(1): 1-15.

Creighton CJ, Massarweh S et al. (2008). "Development of resistance to targeted therapies transforms the clinically associated molecular profile subtype of breast tumor xenografts." *Cancer Res* 68(18): 7493-501.

Creighton CJ, Massarweh S et al. (2008). "Development of resistance to targeted therapies transforms the clinically associated molecular profile subtype of breast tumor xenografts." *Cancer Res* 68(18): 7493-501.

Cristofanilli M, Broglio et al (2007). "Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: biologic staging beyond tumor burden." *Clin Breast Cancer* 7(6):471-9.

Cristofanilli M, Budd GT et al. (2004). "Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer." *N Engl J Med* 351(8): 781-91.

Cristofanilli M, Hayes DF et al. (2005). "Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer." *J Clin Oncol* 23(7): 1420-30.

Cummings, M. C., R. Chambers, et al. (2011). "Molecular classification of breast cancer: is it time to pack up our microscopes?" *Pathology* 43(1): 1-8.

Espie M, Lalloum M et al. (2013). "Epidemiology and risk factors of breast cancer". *Soins(776)*: 22-4.

Evangelista M, Tian H et al. (2006). "The hedgehog signaling pathway in cancer." *Clin Cancer Res* 12(20 Pt 1): 5924-8.

Fehm T, Becker S et al. (2007). "Determination of HER2 status using both serum HER2 levels and circulating tumor cells in patients with recurrent breast cancer whose primary tumor was HER2 negative or of unknown HER2 status." *Breast Cancer Res* 9(5): R74.

Fehm T, Hoffmann O et al. (2009). "Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by RT-PCR and comparison to status of bone marrow disseminated cells." *Breast Cancer Res* 11(4): R59.

Fehm T, Sagalowsky A et al. (2002). "Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant." *Clin Cancer Res* 8(7): 2073-84.

Fidler I (2003). "The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited." *Nat Rev Cancer* 3(6): 453-8.

Fisher B, Bauer M et al. (1983). "Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update."

Bibliografía

Cancer 52(9): 1551-7.

Fisher B, Dignam J et al. (2001). "Prognosis and treatment of patients with breast tumors of one centimeter or less and negative axillary lymph nodes." J Natl Cancer Inst 93(2): 112-20.

Foote and Stewart (1941). "Lobular carcinoma in situ: A rare form of mammary cancer." Am J Pathol 17(4): 491-496 3.

Franken B, de Groot MR et al. (2012). "Circulating tumor cells, disease recurrence and survival in newly diagnosed breast cancer." Breast Cancer Res 14(5): R133.

Gaforio JJ, Serrano MJ et al. (2003). "Detection of breast cancer cells in the peripheral blood is positively correlated with estrogen-receptor status and predicts for poor prognosis." Int J Cancer 107(6): 984-90.

Gasent Blesa, JM, Alberola Candell V et al. (2008). "Circulating tumor cells in breast cancer: methodology and clinical repercussions." Clin Transl Oncol 10(7): 399-406.

Gervasoni A, Monasterio Muñoz RM et al. (2008). "Molecular signature detection of circulating tumor cells using a panel of selected genes." Cancer Lett 263(2): 267-79.

Glynn RW, Mahon S et al. "TOP2A amplification in the absence of that of HER-2/neu: toward individualization of chemotherapeutic practice in breast cancer." Oncologist 16(7): 949-55.

Gorges TM, Tinhofer I et al. (2012). "Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition." BMC Cancer 12: 178.

Goss PE and Chambers AF (2010). "Does tumour dormancy offer a therapeutic target?" Nat Rev Cancer 10(12): 871-7.

Gupta GP and Massague J (2006). "Cancer metastasis: building a framework." *Cell* 127(4): 679-95.

Hammond ME, Hayes DF et al. (2010). "American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer." *J Clin Oncol* 28(16): 2784-95.

Hannemann J, Kristel P et al. (2006). "Molecular subtypes of breast cancer and amplification of topoisomerase II alpha: predictive role in dose intensive adjuvant chemotherapy." *Br J Cancer* 95(10): 1334-41.

Hayes DF, Cristofanilli M et al. (2006). "Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival." *Clin Cancer Res* 12(14 Pt 1): 4218-24.

Huang EH, Heidt DG et al (2007). "Cancer stem cells: a new paradigm for understanding tumor progression and therapeutic resistance." *Surgery* 141(4):415-9.

Hugh J, Hanson J et al. (2009). "Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial." *J Clin Oncol* 27(8): 1168-76.

Hwang-Verslues WW, Kuo WH et al. (2009). "Multiple lineages of human breast cancer stem/progenitor cells identified by profiling with stem cell markers." *PLoS One* 4(12): e8377.

Ignatiadis M, Kallergi G et al. (2008). "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* 14(9): 2593-600.

Isakoff SJ. (2010). "Triple-negative breast cancer: role of specific chemotherapy agents." *Cancer J* 16(1): 53-61.

Bibliografía

Janni W, Rjosk et al. (2000). "Clinical relevance of occult metastatic cells in the bone marrow of patients with different stages of breast cancer." *Clin Breast Cancer* 1(3): 217-25.

Kallergi G, Papadaki MA et al. (2011). "Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients." *Breast Cancer Res* 13(3): R59.

Kasimir-Bauer S, Hoffmann O et al. (2012). "Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells." *Breast Cancer Res* 14(1): R15.

Key TJ, Verkasalo PK et al. (2001). "Epidemiology of breast cancer." *Lancet Oncol* 2(3): 133-40.

Kim MY, Oskarsson T et al. (2009). "Tumor self-seeding by circulating cancer cells." *Cell* 139(7): 1315-26.

Kirschmann DA, Seftor EA et al. (2012). "Molecular pathways: vasculogenic mimicry in tumor cells: diagnostic and therapeutic implications." *Clin Cancer Res* 18(10): 2726-32.

Krebs MG, Metcalf RL et al. (2014). "Molecular analysis of circulating tumour cells-biology and biomarkers." *Nat Rev Clin Oncol* 11(3): 129-44.

Lang JE, Mosalpuria K et al. (2009). "HER2 status predicts the presence of circulating tumor cells in patients with operable breast cancer." *Breast Cancer Res Treat* 113(3): 501-7.

Langley RR and Fidler IJ (2011). "The seed and soil hypothesis revisited--the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs." *Int J Cancer* 128(11): 2527-35.

Le Doussal V, Tubiana-Hulin M et al. (1989). "Prognostic value of histologic

grade nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson (SBR). An improved score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas." *Cancer* 64(9): 1914-21.

Li X, Lewis MT et al. (2008). "Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy." *J Natl Cancer Inst* 100(9): 672-9.

Lin H, Balic M et al. (2011). "Disseminated and circulating tumor cells: Role in effective cancer management." *Crit Rev Oncol Hematol* 77(1): 1-11.

Liu Z, Fusi A et al. (2010). "Eradication of EGFR-positive circulating tumor cells and objective tumor response with lapatinib and capecitabine." *Cancer Biol Ther* 10(9): 860-4.

Lucci A, Hall CS et al. (2012). "Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study." *Lancet Oncol* 13(7): 688-95.

Malmgren JA, Atwood MK et al. (2008). "Increase in mammography detected breast cancer over time at a community based regional cancer center: a longitudinal cohort study 1990-2005." *BMC Cancer* 8: 131.

Malvezzi M, Bertuccio P et al. (2013). "European cancer mortality predictions for the year 2013." *Ann Oncol* 24(3): 792-800.

Mani S.A, Guo W et al. (2008). "The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells." *Cell* 133(4): 704-15.

Marrinucci D, Bethel K et al. (2007). "Case study of the morphologic variation of circulating tumor cells." *Hum Pathol* 38(3): 514-9.

Marrinucci D, Bethel K et al. (2010). "Cytomorphology of circulating colorectal tumor cells:a small case series." *J Oncol* 2010: 861341.

Martin VM, Siewert C et al. (1998). "Immunomagnetic enrichment of

Bibliografía

disseminated epithelial tumor cells from peripheral blood by MACS." *Exp Hematol* 26(3): 252-64.

Martin VM, Siewert C et al. (1998). "Immunomagnetic enrichment of disseminated epithelial tumor cells from peripheral blood by MACS." *Exp Hematol* 26(3): 252-64.

McPherson K, Steel CM et al. (2000). "ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics." *BMJ* 321(7261): 624-8.

Mego, M., S. A. Mani, et al. (2010). "Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer--clinical applications." *Nat Rev Clin Oncol* 7(12): 693-701.

Mego, M., U. De Giorgi, et al. (2011). "Characterization of metastatic breast cancer patients with nondetectable circulating tumor cells." *Int J Cancer* 129(2): 417-23.

Meng, S., D. Tripathy, et al. (2004). "Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy." *Clin Cancer Res* 10(24): 8152-62.

Meng, S., D. Tripathy, et al. (2004). "HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(25): 9393-8.

Mikolajczyk, S. D., L. S. Millar, et al. "Detection of EpCAM-Negative and Cytokeratin-Negative Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood." *J Oncol* 2011: 252361.

Mikolajczyk, S. D., L. S. Millar, et al. (2011). "Detection of EpCAM-Negative and Cytokeratin-Negative Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood." *J Oncol* 2011: 252361.

Minn, A. J., Y. Kang, et al. (2005). "Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors." *J Clin Invest*

115(1): 44-55.

Miyazono, K. (2009). "Transforming growth factor-beta signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer." *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85(8): 314-23.

Moll, R., W. W. Franke, et al. (1982). "The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells." *Cell* 31(1): 11-24.

Molnar, B., A. Ladanyi, et al. (2001). "Circulating tumor cell clusters in the peripheral blood of colorectal cancer patients." *Clin Cancer Res* 7(12): 4080-5.

Monteiro, J. and R. Fodde (2010). "Cancer stemness and metastasis: therapeutic consequences and perspectives." *Eur J Cancer* 46(7): 1198-203.

Morel, A. P., M. Lievre, et al. (2008). "Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition." *PLoS One* 3(8): e2888.

Muller, V. and K. Pantel (2009). "HER2 as marker for the detection of circulating tumor cells." *Breast Cancer Res Treat* 117(3): 535-7.

Muller, V., N. Stahmann, et al. (2005). "Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity." *Clin Cancer Res* 11(10): 3678-85.

Nadal, R., A. Fernández, et al. (2012). "Biomarkers characterization of circulating tumour cells in breast cancer patients." *Breast Cancer Res* 14(3): R71.

Nagrath, S., L. V. Sequist, et al. (2007). "Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology." *Nature* 450(7173): 1235-9.

Bibliografía

O'Brien, C. A., A. Kreso, et al. (2010). "Cancer stem cells and self-renewal." *Clin Cancer Res* 16(12): 3113-20.

O'Malley, F. P., S. Chia, et al. (2009). "Topoisomerase II alpha and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy." *J Natl Cancer Inst* 101(9): 644-50.

Osborne, C. K. and R. Schiff (2003). "Growth factor receptor cross-talk with estrogen receptor as a mechanism for tamoxifen resistance in breast cancer." *Breast* 12(6): 362-7.

Pantel, K. and R. H. Brakenhoff (2004). "Dissecting the metastatic cascade." *Nat Rev Cancer* 4(6): 448-56.

Pantel, K., V. Muller, et al. (2003). "Detection and clinical implications of early systemic tumor cell dissemination in breast cancer." *Clin Cancer Res* 9(17): 6326-34.

Pantel, K., G. Schlimok, et al. (1994). "Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow." *J Hematother* 3(3): 165-73.

Park, S. Y., H. E. Lee, et al. (2010). "Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer." *Clin Cancer Res* 16(3): 876-87.

Pece, S., D. Tosoni, et al. (2010). "Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content." *Cell* 140(1): 62-73.

Perou, C. M., T. Sorlie, et al. (2000). "Molecular portraits of human breast tumours." *Nature* 406(6797): 747-52.

Pierga, J. Y., F. C. Bidard, et al. (2008). "Circulating tumor cell detection

predicts early metastatic relapse after neoadjuvant chemotherapy in large operable and locally advanced breast cancer in a phase II randomized trial." *Clin Cancer Res* 14(21): 7004-10.

Pierga, J. Y., C. Bonneton, et al. (2004). "Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients." *Clin Cancer Res* 10(4): 1392-400.

Pierga, J. Y., D. Hajage, et al. (2012). "High independent prognostic and predictive value of circulating tumor cells compared with serum tumor markers in a large prospective trial in first-line chemotherapy for metastatic breast cancer patients." *Ann Oncol* 23(3): 618-24.

Polyak, K. (2011). "Heterogeneity in breast cancer." *J Clin Invest* 121(10): 3786-8.

Prat, A. and C. M. Perou (2010). "Deconstructing the molecular portraits of breast cancer." *Mol Oncol* 5(1): 5-23.

Reed, J., M. Rosman, et al. (2009). "Prognostic implications of isolated tumor cells and micrometastases in sentinel nodes of patients with invasive breast cancer: 10-year analysis of patients enrolled in the prospective East Carolina University/Anne Arundel Medical Center Sentinel Node Multicenter Study." *J Am Coll Surg* 208(3): 333-40.

Ricci-Vitiani, L., D. G. Lombardi, et al. (2007). "Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells." *Nature* 445(7123): 111-5.

Riethdorf, S., H. Fritsche, et al. (2007). "Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system." *Clin Cancer Res* 13(3): 920-8.

Riethdorf, S., V. Muller, et al. (2010). "Detection and HER2 expression of

Bibliografía

circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial." *Clin Cancer Res* 16(9): 2634-45.

Ring, A., I. E. Smith, et al. (2004). "Circulating tumour cells in breast cancer." *Lancet Oncol* 5(2): 79-88.

Rosen, P. P., P. E. Saigo, et al. (1981). "Prognosis in stage II (T1N1M0) breast cancer." *Ann Surg* 194(5): 576-84.

Sakorafas, G. H., J. Geraghty, et al. (2004). "The clinical significance of axillary lymph node micrometastases in breast cancer." *Eur J Surg Oncol* 30(8): 807-16.

Salido, M., I. Tusquets, et al. (2005). "Polysomy of chromosome 17 in breast cancer tumors showing an overexpression of ERBB2: a study of 175 cases using fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry." *Breast Cancer Res* 7(2): R267-73.

Saucedo-Zeni, N., S. Mewes, et al. (2012). "A novel method for the in vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire." *Int J Oncol* 41(4): 1241-50.

Sauter, G., J. Lee, et al. (2009). "Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations." *J Clin Oncol* 27(8): 1323-33.

Schwab, L. P., D. L. Peacock, et al. (2012). "Hypoxia-inducible factor 1alpha promotes primary tumor growth and tumor-initiating cell activity in breast cancer." *Breast Cancer Res* 14(1): R6.

Scoccianti, C., B. Lauby-Secretan, et al. (2014). "Female breast cancer and alcohol consumption: a review of the literature." *Am J Prev Med* 46(3 Suppl

1): S16-25.

Serrano, M. J., J. A. Lorente, et al. (2011). "Circulating tumour cells in peripheral blood: potential impact on breast cancer outcome." *Clin Transl Oncol* 13(3): 204-8.

Serrano, M. J., P. Sanchez-Rovira, et al. (2009). "Detection of circulating tumor cells in the context of treatment: prognostic value in breast cancer." *Cancer Biol Ther* 8(8): 671-5.

Shibue, T. and R. A. Weinberg (2010). "Metastatic colonization: settlement, adaptation and propagation of tumor cells in a foreign tissue environment." *Semin Cancer Biol* 21(2): 99-106.

Shipitsin, M., L. L. Campbell, et al. (2007). "Molecular definition of breast tumor heterogeneity." *Cancer Cell* 11(3): 259-73.

Shou, J., S. Massarweh, et al. (2004). "Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer." *J Natl Cancer Inst* 96(12): 926-35.

Silverstein, M. J. (1998). "Ductal carcinoma in situ of the breast." *BMJ* 317(7160): 734-9.

Sorlie, T., C. M. Perou, et al. (2001). "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(19): 10869-74.

Swennenhuis, J. F., A. G. Tibbe, et al. (2009). "Characterization of circulating tumor cells by fluorescence in situ hybridization." *Cytometry A* 75(6): 520-7.

Talmadge, J. E. (2010). "Immune cell infiltration of primary and metastatic lesions: mechanisms and clinical impact." *Semin Cancer Biol* 21(2): 131-8.

Bibliografía

Tanei, T., K. Morimoto, et al. (2009). "Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers." *Clin Cancer Res* 15(12): 4234-41.

Tewes, M., B. Aktas, et al. (2009). "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* 115(3): 581-90.

Theodoropoulos, P. A., H. Polioudaki, et al. (2010). "Circulating tumor cells with a putative stem cell phenotype in peripheral blood of patients with breast cancer." *Cancer Lett* 288(1): 99-106.

Thiery, J. P. (2002). "Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression." *Nat Rev Cancer* 2(6): 442-54.

Trecek, O., B. Wackwitz, et al. (2006). "Effects of a combined treatment with mTOR inhibitor RAD001 and tamoxifen in vitro on growth and apoptosis of human cancer cells." *Gynecol Oncol* 102(2): 292-9.

Uchida, H., K. Arita, et al. (2011). "Role of sonic hedgehog signaling in migration of cell lines established from CD133-positive malignant glioma cells." *J Neurooncol* 104(3): 697-704.

Vander Griend, D. J., W. L. Karthaus, et al. (2008). "The role of CD133 in normal human prostate stem cells and malignant cancer-initiating cells." *Cancer Res* 68(23): 9703-11.

Wang, J. Y., C. H. Wu, et al. (2006). "Molecular detection of circulating tumor cells in the peripheral blood of patients with colorectal cancer using RT-PCR: significance of the prediction of postoperative metastasis." *World J Surg* 30(6): 1007-13.

Woelfle, U., E. Breit, et al. (2005). "Bi-specific immunomagnetic enrichment of micrometastatic tumour cell clusters from bone marrow of cancer patients." *J Immunol Methods* 300(1-2): 136-45.

Wright, M. H., A. M. Calcagno, et al. (2008). "Brca1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics." *Breast Cancer Res* 10(1): R10.

Wulfing, P., J. Borchard, et al. (2006). "HER2-positive circulating tumor cells indicate poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients." *Clin Cancer Res* 12(6): 1715-20.

Wulfing, P., C. Kersting, et al. (2005). "Expression patterns of angiogenic and lymphangiogenic factors in ductal breast carcinoma in situ." *Br J Cancer* 92(9): 1720-8.

Xenidis, N., M. Perraki, et al. (2006). "Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mRNA-positive cells detected by real-time polymerase chain reaction in node-negative breast cancer patients." *J Clin Oncol* 24(23): 3756-62.

Yang, J. and R. A. Weinberg (2008). "Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis." *Dev Cell* 14(6): 818-29.

Yang, L., J. C. Lang, et al. (2009). "Optimization of an enrichment process for circulating tumor cells from the blood of head and neck cancer patients through depletion of normal cells." *Biotechnol Bioeng* 102(2): 521-34.

Yu, M., S. Stott, et al. (2011). "Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization." *J Cell Biol* 192(3): 373-82.

Zeisberg, M. and E. G. Neilson (2009). "Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions." *J Clin Invest* 119(6): 1429-37.

