



Universidad de Granada

***IMPLICACIONES CLÍNICAS Y
BIOLÓGICAS DE LA
CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS
TUMORALES CIRCULANTES EN
PACIENTES CON CÁNCER DE
MAMA Y COLON***

**FRANCISCO GABRIEL
ORTEGA SÁNCHEZ**

**TESIS DOCTORAL
GRANADA, 2015**

Editorial: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Francisco Gabriel Ortega Sánchez
ISBN: 978-84-9125-296-2
URI: <http://hdl.handle.net/10481/41013>



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



Universidad de Granada

Tesis Doctoral:

**“IMPLICACIONES CLÍNICAS Y BIOLÓGICAS DE LA CARACTERIZACIÓN DE
CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES EN PACIENTES CON CÁNCER DE
MAMA Y COLON”**

F. Gabriel Ortega Sánchez

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 Pfizer-UGR-Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (GENYO), Granada.

Certifican que:

Francisco Gabriel Ortega Sánchez, Bioquímico Nacional, ha realizado la Tesis Doctoral, **IMPLICACIONES CLÍNICAS Y BIOLÓGICAS DE LA CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA Y COLON** en el centro GENYO, para aspirar al grado de Doctor en Biomedicina. 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 25 de Septiembre de 2015.

Dr. D. J.A. Lorente

Dra. Dña. M.J. Serrano

Doctorando

El doctorando **Francisco Gabriel Ortega Sánchez** 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 el doctorando 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 25 de Septiembre de 2015.

Dr. D. J.A. Lorente

Dra. Dña. M.J. Serrano

Doctorando

Agradecimientos

Quiero dar las gracias al Dr. José Antonio Lorente, mi Director, por permitirme ser parte de este grupo de investigación, de apoyarme en todo lo que he necesitado y de brindarme una amistad sincera.

A mi Directora, la Dra. M^a José Serrano: Gracias María José por todo este tiempo de dedicación, por confiar en mí y por formarme de la mejor manera. Gracias por los innumerables consejos que me han quedado grabados a fuego y que siempre los voy a tener presentes.

También quiero dar las gracias a mis compañeros de GENYO, a los que estuvieron conmigo para enseñarme, para ayudarme y para disfrutar de buenos ratos de trabajo. Agradezco a Cristina, Eduardo, Marina Daniel, Diego, Carmen, María Jesús, Lucas, y a todas las personas que han pasado por mi laboratorio.

Me gustaría agradecer especialmente a Ana Fernández y Rosa Nadal que han sido las dos personas que abrieron el camino por el cual yo he transitado durante la realización de esta tesis.

A la gente de los laboratorios continuos, las chicas de Juan y los de Juan Carlos, un especial agradecimiento para ellos. Especialmente quiero dar las gracias a Juanjo, a su mujer y todo su grupo.

A la gente de servicios generales, de seguridad, de administración, de limpieza, los cuales hacen más fácil y alegre la vida en el trabajo.

Agradecer a mis buenos amigos argentinos Ale y Aníbal, a Jorge, a Fer. Gracias por estar siempre presente.

Quiero hacer mención y agradecer a mi gran amigo Juan Carlos Santiago Porcel, la persona más maravillosa que he tenido la suerte de conocer, gracias por permitirme acompañarte junto con tu familia y amigos, en tu valiente lucha contra una de la enfermedades más injusta y cruel que existe. Gracias a ti he aprendido el significado de la bondad.

Gracias a mi familia, a mi madre, a mi padre y a mis hermanas; que han confiado en mí y me han apoyado en todo lo que han podido. A mi tío Pepe Ortega, una persona fuerte y alegre, mi ejemplo a seguir desde pequeño.

A todos los tíos y primos de allá y de acá. Especialmente a los de allá, que han estado animándome, y si han podido, me han venido a visitar. Y especialmente a los de acá, por abrirme sus hogares y hacerme sentir parte de su familia.

A mis amigos de la Escuela, Compañeros de la Facultad y Peña de póker, que gracias a sus mensajes de whatsapp han acortado la lejanía y me han motivado para resistir en los momentos difíciles.

A Inés por ser la persona que me apoya, me cuida y me aguanta todos los días, que quiere lo mejor de mí y que, espero, me acompañe en mis futuros pasos.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALDH	Proteína aldehído deshidrogenasa. Acrónimo derivado de su nombre en inglés <i>Aldehyde Deshidrogenase</i> .
APC	Gen de la poliposis adenomatosa de colon. Acrónimo derivado de su nombre en inglés <i>Adenomatous Polyposis Coly</i> .
BCL2	Proteína mitocondrial. Acrónimo derivado de su nombre en Ingles <i>B cell lymphoma 2</i>
BRCA	Gen supresor de tumores humanos. Acrónimo de su nombre en inglés <i>Breast Cancer</i> .
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico. Acrónimo derivado de su nombre en inglés <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> .
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento vascular endotelial,
EMT	Transición epitelio-mesénquimal. 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> ,
CEA	Antígeno carcinoembrionario. Acrónimo de su nombre en inglés <i>Carcynoembrionic Antigen</i> .

CK	Citoqueratina. Acrónimo derivado de su nombre en inglés <i>Citokeratin</i> .
CRC	Cáncer colorrectal. Acrónimo de su nombre en inglés <i>Colorectal Cancer</i> .
CSCs	Célula Madre del Cáncer. Acrónimo de su nombre en inglés <i>Cancer Stem Cells</i> .
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico. Acrónimo de su nombre en inglés <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> .
ER	Receptor de estrógenos. Acrónimo de su nombre en inglés <i>Estrogen Receptor</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> .
Hsp	Proteína de choque térmico. Acrónimo de su nombre en inglés <i>Heat Shock Protein</i>
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	Interleuquina.
ISC III	Instituto de Salud Carlos Tercero
KDa	Kilo dalton.

M0	Pacientes que no presentan metástasis a distancia.
M1	Pacientes que presentan metástasis a distancia.
MAC	Moléculas de adhesión celular.
MACS	Sistema de enriquecimiento inmunomagnético por clasificación celular. Acrónimo derivado de su nombre en inglés <i>Magnetic-Activated Cell Sorting</i> .
MMP	Metaloproteasas de la matriz. Acrónimo de su nombre en inglés <i>Matrix Metalloproteinase</i> .
MRD	Enfermedad mínima residual. Acrónimo derivado del inglés <i>Minimal Residual Disease</i> .
µm	Micrómetro.
µL	Microlitro.
Min	Minutos.

mL	Mililitro.
Mm	Milímetros.
PR	Receptor de progesterona. Acrónimo de su nombre en inglés <i>Progesterone Receptor</i> .
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.
SERMs	Modulador selectivo de los receptores estrogénicos. Acrónimo de su nombre en inglés <i>Selective estrogen receptor modulators</i>
TNM	Sistema de clasificación tumoral por Tamaño del tumor-afectación de los Nódulos linfáticos- Metástasis a distancia.
TOPO II	Gen de la topoisomerasa II humana.
VEGF	Acrónimo derivado de su nombre en inglés <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

VEGFR Receptor del factor de crecimiento epitelial vascular. Acrónimo derivado de su nombre en inglés *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*.

VIM Vimentina

ZEB Proteína de dedos de Zinc, de unión específica a la caja E:
Acrónimo derivado de su nombre en inglés *Zinc Finger E-box-Binding Homebox*.

REACTIVOS

Acético glacial

Acetona

Agua MiliQ

Anticuerpo anti-Citoqueratina

Anticuerpo anti-FITC-alcalin fosfatasa

Anticuerpo anti-EGFR

Anticuerpo anti-VEGFR

Anticuerpo secundario anti Ig goat Alexa Fluor 350

Bicarbonato sódico 7.5%

Cell freezing medium (Sigma)

DAPI

DEMEM 1x (GIBCO)

DMSO

EDTA

Etanol

Ficoll 1119 g/ml (Sigma)

Formaldehído

Hematoxilina tipo Mayer's

Hepes buffer 1M

IGpack

Kit Carcinoma Cell Enrichment and Detection (Miltenyi Biotec)

Metanol

Penicilina-estreptomicina

Piruvato sódico

RPMI 1640 1x (GIBCO)

Sondas ADN: HER2/TOPO2/CEPT17 (Kreatech)

Suero Bovino Fetal (SBF)

Sustrato de fosfatasa alcalina: Fast Red/Naphtol

Tampón Citrato Sódico Salino (SSC)

Tampón fosfato (PBS) al 1x

Tripsina TRIS-CLH

Tryppl Express™ (GIBCO)

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. CÁNCER	13
1.1.1. Generalidades	13
1.1.2 Importancia demográfica	17
1.1.2.1. Principales tipos de tumores sólidos en la sociedad Española	17
1.1.3. Características del proceso tumoral	19
1.1.3.1. Crecimiento celular	19
1.1.3.2. Angiogénesis	20
1.1.3.3. Pérdida de adherencia celular	20
1.1.3.4. Proteólisis	20
1.1.3.5. Movilidad	21
1.1.3.6. Metástasis	21
1.1.4. Transición epitelio mesénquimal	21
1.2. ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL	22
1.2.1. Célula tumoral circulante, célula tumoral diseminada y célula madre del cáncer	24
1.2.2. Células Tumorales Circulantes	26
1.2.3. Relevancia Clínica de las CTCs	27
1.2.4 Métodos para la detección y separación de CTCs	28
1.2.4.1 Principios y requerimientos para la detección y separación de CTCs	28
1.2.4.2. Métodos inmunológicos	29
1.2.4.3. Separación por tamaño	30
1.3. FACTORES DE SUPERVIVENCIA Y PROGRESIÓN DE LA CÉLULA	32

TUMORAL	
1.3.1. Receptores esteroides	32
1.3.1.1. Receptores de tipo I	33
1.3.1.2. Receptores de tipo II	33
1.3.1.3. Receptores de estrógenos	33
1.3.1.4. Receptor de progesterona	36
1.3.2. Receptor del factor de crecimiento epidérmico	37
1.3.3. Receptor del factor de crecimiento vascular endotelial	38
1.4. CÁNCER DE MAMA, GENERALIDADES	39
1.4.1 Factores de Riesgo	39
1.4.1.1 Agregación familiar	39
1.4.1.2 Predisposición hereditaria	40
1.4.1.3. Factores hormonales	41
1.4.1.4. Estilo de vida y factores dietéticos	42
1.4.1.5. Factores ambientales	42
1.4.1.6 Tejido mamario denso	43
1.4.1.7. Enfermedades benignas de la mama	43
1.4.2. Recuerdo clínico	43
1.5 CÁNCER DE COLON, GENERALIDADES	47
1.5.1 Factores de Riesgo	47
1.5.1.1. Cáncer colorrectal hereditario	47
1.5.1.2. Poliposis adenomatosa familiar	47
1.5.1.3. Cáncer de colon hereditario sin poliposis o síndrome de Lynch	48
1.5.1.4. Estilos de vida y factores dietéticos	49
1.5.1.5. Enfermedades asociadas	50

1.5.2. Recuerdo clínico	50
1.6. BIOLOGÍA DEL CRECIMIENTO TUMORAL	53
1.6.1. Transformaciones genéticas asociadas	54
1.6.1.1. Transformaciones en el Cáncer de Mama	54
1.6.1.2. Transformaciones en el Cáncer de Colon	55
1.7. EVALUACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA	57
1.7.1. Estadiaje del cáncer de mama	57
1.7.2. Agrupamientos TNM	58
1.7.3. Factores pronósticos del cáncer de mama	60
1.7.3.1. Clásicos	60
1.7.3.2. Sensibilidad a receptores	61
1.7.4. Estado de receptores	62
1.8. EVALUACIÓN DEL CÁNCER DE COLON	64
1.8.1 Estadiaje del cáncer de colon	64
1.8.2. Factores pronósticos del cáncer de colon	65
1.8.2.1. Factores clásicos o de categoría 1	65
1.9 QUIMIOTERAPIA	67
1.9.1. Agentes alquilantes	67
1.9.2. Antimetabolitos	68
1.9.3. Antibióticos contra el cáncer	69
1.9.3.1. Antraciclinas	69
1.9.3.2. Antibióticos contra el cáncer que no son antraciclinas	69
1.9.4. Inhibidores de la topoisomerasa	70
1.9.5. Inhibidores de la mitosis	70
1.9.6. Otros medicamentos quimioterapéuticos	71

1.10. MEDICAMENTOS NO QUIMIOTERAPÉUTICOS CONTRA EL CÁNCER	71
1.10.1. Terapias dirigidas	72
1.10.2. Agentes de diferenciación	72
1.10.3. Terapia hormonal	73
1.10.4. Inhibidores de la tirosin quinasa	73
1.10.4.1. Inhibidores de la tirosin quinasa asociada al EGFR	74
1.10.4.2. Inhibidores de la actividad tirosin quinasa de tres tipos de receptores de membrana: PDGFR, c-kit y VEGFR	74
1.10.4.3. Inhibidor de la tirosin quinasa asociada a HER2	75
1.10.5. Inmunoterapia	75
2. HIPÓTESIS	77
3. OBJETIVOS	81
4. MATERIAL Y MÉTODOS	85
4. 1. DETERMINACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES CON FENOTIPO EMT EN MUESTRAS NEGATIVAS PARA CK	87
4.1.1. Pacientes	87
4.1.2. Líneas celulares de cáncer de mama y fiabilidad del método	88
4.1.3. Procesamiento de la muestra	88
4.1.4. Inducción de EMT por TGFB1 y/o EGF	92
4.1.5. Análisis de Western Blot	92
4.1.6. Actividad de caspasas 3/7 y 8	93
4.1.7. Microscopia confocal	93
4.1.8. Extracción de RNA y análisis por PCR a tiempo real	93
4.1.9. Prueba de la cura de la herida	94
4.1.10. Datos estadísticos	94

4.2. ESTUDIO DE CÁNCER DE MAMA LOCALMENTE AVANZADO	95
BAJO TRATAMIENTO NEOADYUVANTE	
4.2.1. Selección de las pacientes	95
4.2.2. Líneas Celulares	96
4.2.3. Análisis realizados sobre las muestras de sangre	97
4.2.4. Análisis realizados sobre las biopsias del tumor primario	97
4.2.5. Marcaje Inmunofluorescente	98
4.2.6. Procesamiento de los datos	98
4.3. DETERMINACIÓN DE CTCs CON FENOTIPO EPITELIAL Y EMT EN	99
PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA LOCALMENTE AVANZADO	
4.3.1. Pacientes	99
4.3.2. Procesamiento de las muestras	99
4.3.3. FICTION	101
4.3.4. Determinación de EGFR en muestras parafinadas	102
de tejido tumoral de mama	
4.4. ESTUDIO DE CÁNCER DE COLON METASTÁSICO, BAJO	104
TRATAMIENTO COMBINADO CON FOLFOX Y BEVACIZUMAB	
4.4.1. Selección de las pacientes	104
4.4.2. Líneas celulares	106
4.4.3. Toma de muestras, aislamiento y detección de CTCs	106
4.4.4. Marcaje inmunofluorescente	106
4.4.5. Identificación de proteínas y calidad de Anticuerpos por Western	107
Blot	
4.4.6. Procesamiento y análisis de los datos	108
5. RESULTADOS	109
5.1 DETERMINACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES CON	111
FENOTIPO EMT EN MUESTRAS NEGATIVAS PARA CK	

5.1.1. Correlación de la expresión de vimentina y SLUG en CTCs con las características clínicas y patológicas de los pacientes	11
5.1.2. Correlación de VIM y SLUG en CTCs con baja expresión de CK respecto de la expresión de EGFR, CD133, TOPO2/HER2	113
5.1.3. Modificación de marcadores luego de la inducción del proceso EMT en células MCF7	115
5.1.4. El proceso EMT inducido por TGFB1/EGF promueve la movilidad celular	119
5.2. DETECCIÓN DE CTCS EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA LOCALMENTE AVANZADO	121
5.2.1. Detección y correlación de CTCs	121
5.2.2. Expresión de EGFR en CTCs	124
5.2.3. EGFR en CTCs y Subtipos histológicos de cáncer de mama	126
5.2.4. CTCs y respuesta a la terapia neoadyuvante	127
5.3. DETECCIÓN DE CTCs CON FENOTIPO EMT	129
5.4. DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CTC EN CÁNCER DE COLON	136
5.4.1. Detección y correlación de CTCs	136
5.4.2. Expresión de VEGFR en CTCs	138
6. DISCUSIÓN	151
6.1 DISCUSIÓN RESPECTO DE LA APARICIÓN DE CTCs CON FENOTIPO EMT EN MUESTRAS NEGATIVAS PARA CTCS ^{CK+} .	153
6.2. DISCUSIÓN RESPECTO LA DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN CON EGFR DE CTCS EN PACIENTES DE CANCER DE MAMA LOCALMENTE AVANZADO	157
6.3. DISCUSIÓN RESPECTO DE LA SELECCIÓN DE CTCs CON FENOTIPO EMT CARACTERIZADAS CON VIM Y EGFR	159
6.4. DISCUSIÓN RESPECTO DE DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN	163

CON VEGFR DE CTCS^{CK+} EN PACIENTES CON CÁNCER DE COLON
METASTÁSICO BAJO TRATAMIENTO DE FOLFOX Y BEVACIZUMAB

7. CONCLUSIONES 167

8. BIBLIOGRAFÍA 173

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CÁNCER

1.1.1. Generalidades.

El cáncer es una enfermedad provocada por un grupo de células que se multiplican sin control y de manera autónoma, invadiendo localmente y a distancia otros tejidos. En general, puede llevar a la muerte a la persona afectada, si no adquiere el tratamiento adecuado. Existen más de 200 tipos diferentes de cáncer, los más comunes son los de piel, pulmón, mama y colorrectal (Greenlee et al.2000).

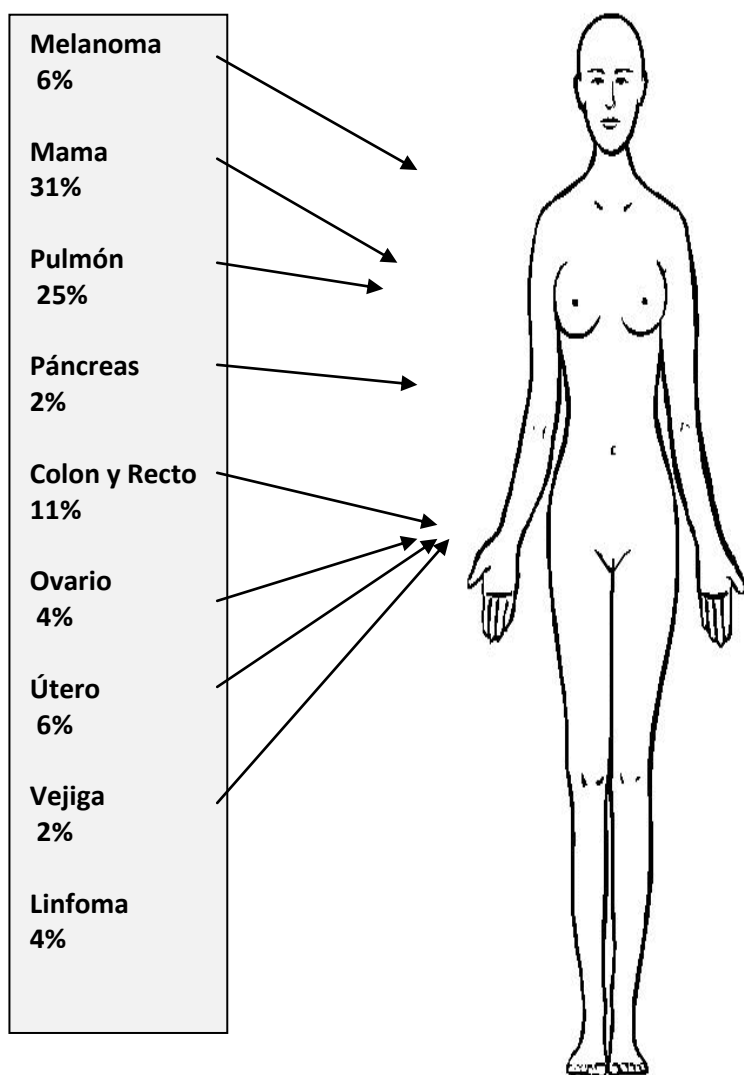


Figura 1. Incidencia de las principales neoplasias en la mujer (Greenlee et al. 2000)

La agresividad del cáncer varía, según la virulencia de sus células y de las características biológicas de cada tipo tumoral. En general, las células cancerosas

Son células normales que tienen un programa genético alterado, respecto de tiempo y forma. Debido a esto, estas células pierden el control reproductivo que requiere su función original, perdiendo así, sus principales características y adquiriendo otras distintas, como son, el crecimiento descontrolado y la capacidad de invadir, por distintas vías, tejidos, órganos próximos o inclusive diseminan a lugares muy distantes, creciendo y dividiéndose más allá de los límites normales del órgano al que pertenecían previamente, diseminando por el organismo fundamentalmente a través del sistema linfático o el sistema circulatorio, y ocasionando el crecimiento de nuevos tumores en otras partes del cuerpo alejadas de la localización original (Coghlin & Murray, 2010).

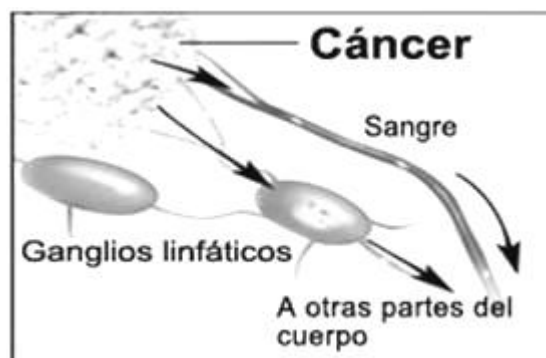


Figura 2. Esquema de las principales vías de diseminación tumoral

Existen diferencias entre tumores benignos y malignos. En el caso tumores benignos, el crecimiento es lento, no diseminan a otros tejidos y rara vez recidivan tras extirpación quirúrgica. En el caso de los tumores malignos, el crecimiento es rápido, diseminan a otros tejidos, producen recurrencia frecuentemente tras ser extirpados y pueden provocar la muerte en un periodo variable de tiempo, en caso de que no se realice un tratamiento adecuado. Los tumores benignos pueden recurrir localmente en ciertos casos, pero no suelen dar metástasis a distancia ni matar al portador, con algunas excepciones (Elliot, 2000).

En ocasiones puede ocurrir que los tumores benignos se transformen en malignos, se puede decir que existe una serie de alteraciones benignas y/o pre malignas de las células, se pueden clasificar en:

Hiperplasia: incremento en el número de células (se dividen más rápido de lo normal) de un tejido en un área específica. Se diferencia de la hipertrofia debido a que en esta última, las células aumentan de tamaño, pero no de número.

Metaplasma: sustitución de un tipo de célula por otra de otra localización.

Displasia: se trata de un desarrollo anormal del tejido, debido a un crecimiento de células alteradas. Si se deja evolucionar sin tratamiento, en algunos casos la displasia puede generar a un tumor maligno o cáncer, por tanto se trata de una lesión premaligna o precancerosa (Davis et al. 1964).

En cuanto a los tumores malignos, se pueden definir como:

- Carcinoma:

Es el tumor maligno que se origina en la capa que recubre (células epiteliales) los órganos. Aproximadamente el 80% de los tumores cancerosos son carcinomas. A su vez dependiendo del tipo celular se pueden clasificar en:

Adenocarcinoma: se denomina adenocarcinoma al cáncer que se origina en el tejido glandular, por ejemplo en los conductos o lobulillos de la mama.

- Carcinoma de células escamosas o epidermoide:

Cáncer que se origina en las células no glandulares, por ejemplo esófago, cuello de útero, etc.

- Carcinoma de células basales:

Es el cáncer de la piel más común. Se origina en la capa más profunda de la epidermis (piel), llamada la capa de células basales.

- Melanoma:

Es un tumor maligno que se origina en los melanocitos que producen la coloración de la piel.

- Sarcoma:

Se trata de un tumor maligno que se origina en los tejidos conectivos, tales como los cartílagos, la grasa, los músculos o los huesos.

Según el tipo celular del cual son originarios, se clasifican en:

Osteosarcoma: Derivado de hueso.

Liposarcoma: Derivado de la grasa.

Condrosarcoma: Derivado del cartílago.

Angiosarcoma: Derivado de los vasos sanguíneos.

- Leucemia:

Las personas con leucemia presentan un aumento notable en los niveles de leucocitos.

En las leucemias no existe tumoración, se afectan la sangre y la médula ósea.

Se pueden clasificar en función del tipo de célula alterada en:

Leucemia mieloide

Leucemia linfocítica

- Linfoma

El linfoma es generado por linfocitos y se encuentra localizado en ganglios linfáticos.

Los dos tipos principales de linfomas son la enfermedad de Hodgkin y el linfoma no Hodgkin (Elliot, 2000).

La presente tesis se centrará en el estudio exclusivo de tumores sólidos (mama y colon) que, por lo general, no contiene áreas con quistes o líquidas. Las leucemias, por lo general, no forman tumores sólidos.

1.1.2 Importancia demográfica

La epidemiología es el estudio de los factores que determinan la frecuencia y distribución de una enfermedad y otros eventos relacionados con la salud en una población determinada. Los estudios epidemiológicos pueden evaluar tendencias a través del tiempo y advertir sobre desviaciones de los patrones normales en subpoblaciones.

Los datos relativos a Europa en 2008 hablan de un número estimado de diagnósticos por cáncer de 3,2 millones, 53% en hombres y 47% en mujeres (J Ferlay, Parkin, & Steliarova-Foucher, 2010).

1.1.2.1 Principales tipos de tumores sólidos en la población Española.

Las neoplasias más frecuentes en 2008 fueron el cáncer colorrectal (13,6% de todos los casos), seguido del cáncer de mama (13,1%), pulmón (12,2%) y próstata (11,9%). La cifra estimada de muertes por cáncer fue de 1,72 millones, 56% en hombres y 44% en mujeres. El cáncer de pulmón con una cifra estimada de 342.000 muertes (19,9% del total) fue la causa más frecuente de muerte por cáncer, seguido del cáncer colorrectal (12,3%), el cáncer de mama (7,5%) y el cáncer gástrico (6,8%) (ISCVI 2012).

Neoplasias más frecuentes en hombres:

- Cáncer de próstata: 22,2%
- Cáncer de Pulmón: 17%
- Cáncer colorrectal: 13,5%
- Cáncer de vejiga: 6,4%
- Cáncer de estómago: 5,2%

Neoplasias más frecuentes en mujeres:

- Cáncer de mama: 28,2%
- Cáncer colorrectal: 13,7%
- Cáncer de pulmón: 6,7%
- Cáncer de endometrio: 5,5%
- Cáncer de ovario: 4,5%.

Causas más frecuentes de muerte por cáncer, en hombres:

- Cáncer de pulmón: 26,6%
- Cáncer colorrectal: 14%
- Cáncer de próstata: 9%

Causas más frecuentes de muerte por cáncer, en mujeres:

- Cáncer de mama: 17%
- Cáncer colorrectal: 13,4%
- Cáncer de pulmón: 11,4%

El cáncer es la segunda causa de muerte en España, y por lo tanto, es un problema de salud prioritario (ISC III, 2012). Uno de cada tres hombres y una de cada cuatro mujeres se diagnosticarán de cáncer a lo largo de su vida. La incidencia de cáncer en España aumenta cada año, pero también disminuye su mortalidad, lo que pone de manifiesto los avances en el diagnóstico precoz y el tratamiento.

El envejecimiento de la población y la supervivencia cada vez mayor de los enfermos de cáncer han supuesto un aumento significativo del número de pacientes que tienen o han tenido cáncer.

La incidencia global prevista de cáncer para la población española en el año 2015 es de 222.069 personas (136.961 hombres y 85.108 mujeres), siendo el tipo más frecuente el cáncer colorrectal, por delante del cáncer de pulmón y de mama. El cáncer más frecuente en los hombres será el de pulmón, seguido del de próstata y

colorrectal; en mujeres, la neoplasia con mayor incidencia será el cáncer de mama, seguido del de colorrectal y los tumores ginecológicos, entre los que se incluyen los cánceres ovario, trompas de Falopio, útero y cuello uterino.

El cáncer supuso en el año 2012 la primera causa de muerte en hombres y la segunda en mujeres, constituyendo el 26% de las muertes de la población española, y de forma más específica, el 31% de las muertes en hombres y el 20% de las muertes en mujeres. Sin embargo, el riesgo de mortalidad por cáncer ha ido disminuyendo de forma considerable desde 1990 hasta 2007. Estos datos de mortalidad provienen del Centro Nacional de Epidemiología, perteneciente al Instituto Carlos III, a partir de los datos de mortalidad por cáncer en España en el año 2012. Globalmente, la neoplasia con mayor mortalidad fue el cáncer de pulmón seguido del cáncer colorrectal. Con respecto a los hombres, el cáncer que causó más muertes fue el de pulmón, seguido de colorrectal y de próstata. En el caso de las mujeres, el primer lugar lo ocupó el cáncer de mama seguido del de colorrectal.

1.1.3. Características del proceso tumoral

1.1.3.1. Crecimiento celular

El crecimiento del cáncer es descontrolado y acelerado por un proceso de división celular continuo. Además las células tumorales son capaces de infiltrar o penetrar en los tejidos normales e invadirlos, destruyendo las células normales del órgano afectado que pierde su función. También viajan a través de los vasos sanguíneos o linfáticos a otras partes del organismo, produciendo tumores hijos o metástasis. Las principales características de los tumores malignos son las siguientes:

1.1.3.2. Angiogénesis

Es la capacidad de formar nuevos vasos sanguíneos por medio de la secreción de ciertas sustancias, como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), estas sustancias son responsables de la formación de extensas redes de capilares y vasos sanguíneos nuevos. Los nuevos vasos son indispensables para la nutrición de las células tumorales y de las metástasis y le permite al parénquima tumoral tener un gran aporte de oxígeno y nutrientes, lo cual favorecerá su crecimiento y proliferación a mayor velocidad y distancia. Esta capacidad se encuentra generalmente ausente en neoplasias benignas (Shchors & Evan, 2007).

1.1.3.3. Pérdida de adherencia celular

Las células tumorales para poder diseminarse deben ser capaces de romper su unión con la estructura del tejido en el que se originan. En el cáncer, la adhesión entre células se reduce por la pérdida de las moléculas de adhesión celular (MAC), las cuales son proteínas localizadas en la superficie de la membrana celular, que están implicadas en la unión con otras células o con la matriz extracelular (Gupta & Massagué, 2006).

1.1.3.4. Proteólisis

Las células tumorales producen enzimas proteolíticas (proteasas) que degradan la matriz extracelular y favorecen la expansión y diseminación del tumor (Yoon, Park, Yun, & Chung, 2003).

1.1.3.5 Movilidad

Es la migración de las células malignas, algunas de las cuales abandonan el tumor primario, viajan a un sitio alejado del organismo por medio del sistema circulatorio linfático y se establecen como un tumor secundario de las mismas características que el primitivo (Friedl & Wolf, 2003; Lange & Fabry, 2013).

1.1.3.6. Metástasis

En general, lo que diferencia un tumor maligno de otro benigno, es la capacidad que poseen sus células de lograr una trasvasación exitosa (o metastatizar), que se define como la capacidad que posee una célula tumoral de infiltrarse al torrente sanguíneo o linfático, mediante la ruptura de moléculas de adhesión celular que sujetan a las células a la membrana basal, con posterior destrucción de esta última. Esta característica se adquiere luego de sucesivas alteraciones en el material genético celular. Los órganos en los que se producen metástasis con más frecuencia son huesos, pulmones, hígado y cerebro. No obstante, distintos tipos de cáncer tienen preferencias individuales para propagarse a determinados órganos (Friedl & Wolf, 2003).

1.1.4 Transición epitelio mesénquimal

La transición epitelio mesénquimal (EMT) fue descrita como un componente fundamental en la diferenciación de los tejidos y órganos durante el desarrollo embrionario. (Nieto, 2010; Thiery, Acloque, Huang, & Nieto, 2009).

EMT también ha sido descrito como un mediador en la cicatrización de las heridas, necesario para la remodelación de tejidos luego de la lesión (Weber, Li, Wai, & Kuo, 2012). Las características de EMT que son fundamentales para la cicatrización de

heridas también están relacionadas con la fibrosis de órganos. El rol de EMT en el proceso de iniciación y metástasis tumoral, es de gran importancia (Klymkowsky & Savagner, 2009).

Actualmente podemos clasificar el proceso EMT, en tres tipos: de tipo 1, referido a la embriogénesis, de tipo 2 referido a la cicatrización de heridas y de tipo 3 referido al cáncer y metástasis. Una característica distintiva en cada proceso, es la pérdida de las uniones célula-célula, pérdida de polaridad apical-basal y reorganización del citoesqueleto como consecuencia de un cambio en la expresión génica. Estos procesos son altamente regulados en EMT de tipo 1 y 2, pero muy desregulados en EMT de tipo 3 (Kalluri & Neilson, 2003).

A nivel molecular EMT es definido como un importante intermediario responsable de importantes cambios en la expresión génica de las células. Donde son incluidos factores de transcripción, múltiples vías de señalización, modificaciones en las secuencias de promotores y señalización autocrina. Los principales factores de transcripción son los de la familia SNAIL, TWIST y los de dedos de zinc vinculados a la caja-E (ZEB). El evento principal en EMT es la represión de E-caderina que es responsable de mantener uniones adherentes y adhesión célula-célula. SNAIL, TWIST y ZEB pueden reprimir E-caderina, como así también activar importantes genes de tipo mesenquimales, tales como N-caderina, vimentina y fibronectina entre otros (Lamouille, Xu, & Derynck, 2014).

1.2. ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL

La enfermedad mínima residual (*MRD=del inglés minimal residual disease*) hace referencia a la persistencia de una cantidad pequeña de células malignas tras tratamiento con intención curativa del cáncer. Es decir, es la enfermedad persistente

bajo el nivel de detectabilidad de las técnicas convencionales, utilizadas para identificar una patología tumoral. De forma general hace referencia, a la presencia de pequeñas de células tumorales circulantes en sangre o micrometástasis no detectables en ganglios linfáticos o en médula ósea, en pacientes con tumores sólidos. La MRD es un proceso dinámico, donde existen fluctuaciones del número de células tumorales residuales a lo largo del tiempo (Mordant et al., 2012).

Las células tumorales residuales pueden persistir localmente como células madres del cáncer (CSCs = del inglés cancer stem cells) o célula tumoral en estado de latencia, en la sangre como células tumorales circulantes y en órganos distantes como células tumorales diseminadas (DTCs = del inglés disseminated tumor cells) o micrometástasis que por lo general mantienen un estado de latencia hasta tener las condiciones adecuadas para su crecimiento (Creighton et al., 2009).

Las células tumorales diseminadas que persisten después del tratamiento oncológico constituyen la fuente de recidiva de la enfermedad. La recidiva puede ser local, regional o a distancia. Se entiende como recidiva la aparición de células tumorales originarias del cáncer primitivo, en cualquier parte del organismo, tras haber realizado cirugía o cualquier modalidad de tratamiento primario con intención curativa. La recurrencia o recidiva sólo puede ocurrir cuando tras completar un tratamiento radical adecuado, permanecen células tumorales viables en el paciente.

La monitorización de la MRD en el seguimiento evolutivo de un cáncer está adquiriendo mayor importancia, puesto que nos ayuda a distinguir pacientes de alto riesgo que necesitan una terapia más intensiva y potencialmente más tóxica, de otros que no la necesitan. También nos ayuda a predecir una recaída clínica y nos indica si un tratamiento oncológico está siendo efectivo o no. Además, los ensayos de MRD pueden detectar algunos tumores tempranos.

Los avances en el diagnóstico precoz y tratamiento del cáncer han mejorado considerablemente las posibilidades de supervivencia de las personas afectadas de patología oncológica. A pesar de estos avances, el riesgo de recurrencia sigue siendo un obstáculo importante para su curación (Mimeault & Batra, 2014; Toloudi, Apostolou, Chatziioannou, & Pappasotiriou, 2011).

1.2.1. Célula Tumoral Circulante, célula tumoral diseminada y célula madre del cáncer

Existen muchas evidencias de que células tumorales del tumor primario ingresan en vasos linfáticos periféricos y en la circulación sanguínea en estadios muy tempranos, durante el desarrollo del cáncer. Este proceso de diseminación depende en gran medida del origen celular, alteraciones genéticas y agresividad del subtipo de cáncer (Kuipers, Rösch, & Bretthauer, 2013; Melchior et al., 1997; Rhim et al., 2012). Por este motivo algunos pacientes con una completa resección del tumor, por cirugía, con márgenes negativo, pueden mostrar células tumorales circulantes (CTCs) en sangre periférica y células tumorales diseminadas en (DTCs) en nódulos linfáticos, medula ósea y en tejidos distantes u órganos. Consecuentemente las CTCs, tienen la capacidad de sobrevivir en el torrente sanguíneo y diseminar a sitios distantes, pudiendo persistir y contribuyendo a la metástasis o generando recaídas luego de una supuesta cirugía curativa del tumor primario.

Con respecto a esto, un creciente número de evidencias experimentales, han revelado que las células progenitoras del cáncer poseen propiedades de células madre, también llamadas iniciadoras de cáncer, tumor o metástasis (CSCs). Pueden poseer importantes funciones en el crecimiento tumoral, metástasis, resistencia al tratamiento y recaídas de la enfermedad oncológica. De hecho, se ha demostrado que la mayoría de los cánceres pueden proceder de la transformación maligna de las

células madres/progenitoras inmaduras, residentes en tejidos o su progenie temprana, que posee alta capacidad de auto renovación y potencial de diferenciación aberrante (Mimeault & Batra, 2010a, 2010b) .

Las CSCs expresan marcadores específicos, tales como CD133, CD44, nestina, aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1) y altos niveles de transportador de multidrogas ABC, estos marcadores han sido identificados en tumor primario, metástasis y líneas celulares de cáncer (Baker et al., 2014; C. F. B. Kim et al., 2005; Mimeault & Batra, 2013). Su detección en CTCs y en DTCs tiene gran significancia clínica, ya que pueden ser utilizadas como herramienta pronostica en pacientes bajo tratamiento o luego de una cirugía con intención curativa (Lowes, Hedley, Keeney, & Allan, 2012; Nadal et al., 2013).

Numerosos estudios han indicado que las células madres del cáncer pueden ser más resistentes al tratamiento quimioterapéutico que su progenie y mucho más indiferenciada (Frank et al., 2005; Nadal et al., 2013; Pantel & Brakenhoff, 2004).

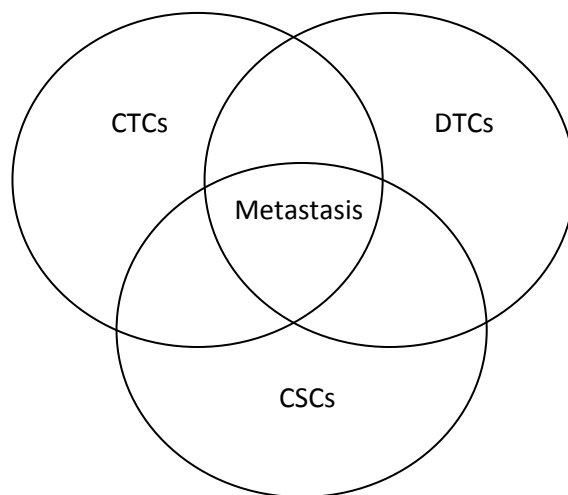


Figura 3. Representación esquemática de los tres grupos celulares que componen el proceso metastásico

1.2.2. Células Tumorales Circulantes.

Las células tumorales circulantes, son células que circulan en la sangre de los pacientes con cáncer, son originadas en el tumor primario o las respectivas metástasis. El descubrimiento de las CTCs, data de 1869 (Ashworth, 1869), desde entonces se ha convertido en un campo de investigación, muy prometedor, ya que a partir de una sencilla muestra de sangre periférica se puede detectar el número de CTCs por volumen de sangre. La monitorización serial de las CTCs durante y luego del tratamiento, puede servir como un parámetro del grado de enfermedad circulante en el tiempo y dilucidar los mecanismos involucrados en los procesos de agresividad, metástasis y resistencia a las diferentes terapias. Teniendo en cuenta el origen de las CTCs, es de esperar que ellas presenten una heterogeneidad, respecto a sus fenotipo y genotipo, similar o mayor a una biopsia. (Hoon et al., 2011; M.-Y. Kim et al., 2009; Pantel & Brakenhoff, 2004). Cabe destacar que la mayor parte de las CTCs no poseen la capacidad de generar metástasis y ni siquiera sobrevivir por un tiempo prolongado, pero existen hallazgos recientes de que un grupo de ellas con marcadores específicos, tales como marcadores de células madre, pueden ser inductoras de metástasis (Bacelli et al., 2013), se ha visto además CTCs en división activa durante su paso por el torrente sanguíneo, en muestras de sangre de pacientes (M J Serrano et al., 2011). Estos hallazgos sitúan a las CTCs, como un importante componente en la cascada metastásica y una herramienta potencial como biomarcador con valor pronóstico y predictivo. Las CTCs son también una importante diana en la terapéutica del cáncer, pudiendo ser consideradas en el futuro como masa tumoral a erradicar por medio de tratamientos especializados.

1.2.3 Relevancia Clínica de las CTCs

La identificación de nuevos y más importantes factores pronóstico y predictivos, es uno de los campos de investigación, más activos en la oncología. Los actuales sistemas pronósticos (Ej. TNM, caracterización molecular del tumor primario y los marcadores séricos) con inadecuados para una elección optima de la terapéutica a seguir con los pacientes de cáncer. Un ejemplo de esto son los pacientes que no se consideran elegibles para terapias adyuvantes (debido a la falta de evidencia de enfermedad residual acorde a los métodos de estadiaje convencionales) que experimentan luego enfermedad recurrente y otros pacientes que son sometidos a terapias adyuvantes y solo tienen bajo riesgo de recurrencia de la enfermedad (es decir muy pocos de ellos pueden verse beneficiados por el tratamiento complementario) (Mocellin, Lise, & Nitti, 2005; Pantel et al., 2003). Por otra parte no existe ningún método fiable para predecir la sensibilidad a la mayoría de las terapias. En lo que respecta a los tratamientos adyuvantes, la eficacia solo puede medirse en ensayos clínicos a gran escala, después de un periodo de tiempo mayor a 5 años, lo que hace que el progreso en este campo sea extremadamente lento.

La detección de CTCs es una atractiva estrategia para el diseño de un tratamiento antitumoral individualizado, si se tienen en cuenta los siguientes aspectos.

- a) La presencia de CTCs es un paso necesario en la metástasis de tumores sólidos. En consecuencia, cualquier avance en el conocimiento de la biología de las CTCs podría dar lugar a avances en el desarrollo de medicamentos anti cáncer y mejorar el pronóstico del paciente.
- b) Las CTCs podrían significar una herramienta pronostica ideal, por su papel activo en la metástasis

- c) Las células metastásicas pueden tener un perfil molecular diferente al tumor primario de origen, la sensibilidad a las drogas de la quimioterapia y las dianas terapéuticas pueden ser testadas en CTCs del mismo modo que se realiza en el tumor primario.
- d) Si se confirma el valor pronostico, la detección de las CTCs podría ser de gran importancia para el seguimiento de la terapia adyuvante y neo-adyuvante como así también para la identificación de pacientes que necesitarían un tratamiento adyuvante.
- e) Las CTCs son detectadas en sangre periférica, que es fácil de obtener y que genera un sufrimiento mínimo para el paciente, comparado con otros sitios donde la enfermedad mínima residual podría estar presente (medula ósea y ganglios linfáticos) (Mocellin, Keilholz, Rossi, & Nitti, 2006).
- f) Recientes avances en la tecnologías de detección y caracterización de CTCs podrían servir para caracterizar observando la evolución del tumor a tiempo real y utilizar esto para el diseño del tratamiento (Biopsia Liquida) (Ignatiadis & Dawson, 2014).

1.2.4 Métodos para la detección y separación de CTCs

1.2.4.1 Principios y requerimientos para la detección y separación de CTCs

Cualquier metodología de detección, tienen que tener la capacidad de detectar un pequeño número de células tumorales entre millones de células sanguíneas. La mayoría de los métodos de enriquecimiento y detección para CTC utiliza una o más propiedades de las CTCs, que las distinguen de las células normales de la sangre:

a) Propiedades biológicas: Las células son reconocidas a partir de la expresión de proteínas estructurales y de superficie, presencia de mutaciones, expresión de genes específicos, viabilidad y capacidad de invasión.

b) Propiedades físicas: Tamaño, densidad, carga eléctrica y deformabilidad.

La propiedad biológica de uso más extendido, se encuentra en la expresión de proteínas, tales como la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM) y citoqueratina (CK) entre otros. No obstante, como hemos visto anteriormente, estas proteínas pueden perderse en el proceso de diseminación (EMT), perdiendo así la capacidad de detectar las CTCs que no expresen estas proteínas de tipo epitelial. Este cambio de marcadores en el proceso EMT justifica, en gran medida, la utilización de metodologías que se basan en las propiedades físicas de las CTCs. La propiedad física más utilizada para separar CTCs es el mayor tamaño que existe en estas, comparado con las células normales de la sangre. Aunque existe el inconveniente, según algunas investigaciones, que el tamaño de las CTCs puede variar entre 4 y 30 μm (Allard et al., 2004) con lo que estos métodos dejarían escapar las CTCs con tamaños similares a leucocitos.

1.2.4.2 Métodos inmunológicos

Los métodos por lo general consisten en un enriquecimiento previo, por lo general por gradiente de densidad, para obtener células nucleadas, que luego de ser inmunomarcadas y visualizadas luego de un cytopspin (Fehm et al., 2006; Riethdorf et al., 2007). La baja concentración de las CTCs ha provocado la realización de metodologías donde se utilizan doble enriquecimiento, por gradiente de densidad y posteriormente por selección inmunomagnética. (Carcinoma cell enrichment kit of miltenyi) (Nadal et al., 2012).

La tecnología del Cell Search ha automatizado el enriquecimiento inmunomagnético y el marcaje de las CTCs (Cristofanilli et al., 2004; Riethdorf et al., 2007). Con esta tecnología las CTCs son enriquecidas con anticuerpos contra EpCAM unidos a ferrofluidos magnéticos y a continuación las células son teñidas para CK y se realiza una contra tinción de CD45 (antígeno leucocitario común) para evitar falsos positivos.

Recientes plataformas de microfluídica, como es el CTC chip. Utilizan anticuerpos contra EpCAM que se encuentran recubriendo micro columnas que son atravesadas por un flujo laminar de sangre total (Uhr, 2007). Otro método aún más novedoso es el I.Chip que combina la separación por tamaños, por densidad y por separación inmunomagnética al tiempo que la sangre total viaja a través de un chip sometido a un campo magnético. (Karabacak et al., 2014). Con la aparición de sistema llamado escaneo de fibra óptica (FAST) se puede detectar 300.000 células por segundo, luego de haber sido reconocidas por anticuerpos conjugados con un fluorocromo (Hsieh et al., 2006; Krivacic et al., 2004).

1.2.4.3 Separación por tamaño

En cuanto a la separación por tamaños, existen muchos sistemas sencillos de separación de CTCs que utilizan membranas porosas (Pinzani et al., 2006; Yusa et al., 2014; Zheng et al., 2007), entre ellos el sistema Screen cell que en tan solo 10 minutos separa las CTCs de mayor tamaño del resto de células sanguíneas.

En la tabla 1 se muestran las principales tecnologías que se comercializan para la detección de CTCs.

Tabla 1. Principales métodos utilizados para la detección de CTCs

Tecnología	Método de enriquecimiento	Método de detección	Referencia
Captura de CTCs Basada en Anticuerpos o Características Biológicas			
CellSearch	Anti-Ep-CAM unido a microperlas magnéticas	Inmunocitoquímica	(Gertler et al., 2003)
MACS	Anti Ep-CAM CK unido a microperlas magnéticas	Inmunocitoquímica	(Griwatz, Brandt, Assmann, & Zänker, 1995)
Oncoquick	Densidad celular	Inmunocitoquímica	(Sell, 2003)
ISET	Ferrofluido y tamaño celular	Inmunocitoquímica	(Mejean et al., 2000)
GILUPI cell collector	Alambre de uso médico funcionalizado con Anti Ep-CAM	Inmunocitoquímica	(Carmeliet & Jain, 2011)
Iso Flux	Anti EpCAM unido a microperlas y combinado con microfluido	Inmunocitoquímica	(Harb et al., 2013)
EPISPOT	Eliminación de células CD 45+ y cultivo en placas recubiertas con anticuerpos contra MUC1. PSA o CK 19C	Inmunocitoquímica de marcadores de superficie de CTCs viable	(Alix-Panabières, 2012)
Captura de CTCs basada en características físicas			
ScreenCell	Filtración por tamaño	Inmunocitoquímica	(Desitter et al., 2011)
ISET	Filtración por Tamaño	Inmunocitoquímica	(Ma, Wang, & Yu, 2013)
CAM	Gradiente de densidad y cultivo de células en una matriz de colágeno	Inmunocitoquímica de CTCs viables	(Lu et al., 2010)

1.3. FACTORES DE SUPERVIVENCIA Y PROGRESIÓN DE LA CÉLULA TUMORAL

1.3.1. Receptores esteroides

Los receptores de hormonas esteroideas son proteínas que pueden ser encontradas en la membrana plasmática, en el citosol y en el núcleo celular de las células en las que juegan algún papel. La mayoría de ellos son receptores intracelulares (normalmente citoplasmáticos) y son responsables de iniciar una transducción de señales al unir una hormona esteroidea, dando lugar a variaciones de la expresión génica en un periodo de horas a días. Algunos receptores esteroideos pertenecen a la familia de receptores nucleares que incluye un grupo de receptores homólogos (TIPO II) los cuales unen ligandos no esteroideos tales como la hormona tiroidea, vitamina A, vitamina D y receptores huérfanos. Todos estos receptores son factores de transcripción. Dependiendo de dónde se localice la hormona esteroidea que unen, estos receptores se localizarán en el citoplasma y se translocarán al núcleo tras la activación, o bien se mantendrán en el núcleo esperando que entre la hormona en cuestión y lo active. Esta translocación al núcleo debe producirse con una señal de localización nuclear (NLS) que se encuentra en una región del receptor. En la mayoría de los casos, esta señal está cubierta por las proteínas de choque térmico (Hsp), que se unen al receptor hasta que aparece la hormona esteroidea. Tras la unión de la hormona, el receptor sufre un cambio conformacional, las Hsp se despegan y el complejo receptor/hormona penetran en el núcleo para activar la transcripción. Recientemente, ha sido descrita una nueva clase de receptores esteroideos en la membrana celular. Nuevos estudios sugieren que, junto con los receptores intracelulares, estos receptores de membrana están presentes

para reconocer diversas hormonas esteroideas, y sus respuestas celulares son mucho más rápidas que las de los receptores intracelulares (Norman, Mizwicki, & Norman, 2004).

1.3.1.1 Receptores de tipo I

Receptores de hormonas sexuales (hormonas sexuales)

Receptor androgénico

Receptor de estrógeno

Receptor de progesterona

Receptor de glucocorticoides (glucocorticoides)

Receptor de mineralocorticoides (mineral corticoides)

1.3.1.2 Receptores de tipo II

Receptor de vitamina A (vitamina A)

Receptor de vitamina D (vitamina D)

Receptores retinoides

Receptor de hormona tiroidea

Receptores huérfanos

1.3.1.3 Receptores de estrógenos

El receptor de estrógeno hace referencia a un grupo de receptores celulares que son activados por la hormona denominada 17β -estradiol o estrógeno (Dahlman-Wright et al., 2006). Se han descrito dos tipos de receptores de estrógeno: ER (del inglés: estrogen receptor), que es un miembro de la familia de los receptores nucleares, y el receptor de estrógeno acoplado a proteínas G GPR30 (GPER), que pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G.

La principal función del receptor de estrógeno es la de actuar como factor de transcripción que se une al ADN con el fin de regular la expresión génica. Sin embargo, el receptor de estrógeno presenta funciones adicionales independientes de la unión a ADN (Levin, 2005).

Existen dos formas diferentes del receptor de estrógeno, normalmente referidas como las formas α y β , ambas codificadas por genes diferentes e independientes (ESR1 y ESR2 respectivamente). La conformación activada del receptor de estrógeno forma un dímero y, puesto que ambas variantes son coexpresadas en diversos tipos de células, los receptores pueden formar homodímeros del tipo ER α ($\alpha\alpha$) o ER β ($\beta\beta$), o heterodímeros del tipo ER $\alpha\beta$ ($\alpha\beta$) (Li et al., 2004). Los receptores de estrógeno α y β muestran una significativa similitud de secuencia, y ambos se componen de siete dominios.

Se han descrito diversas isoformas del receptor de estrógeno obtenidas mediante splicing alternativo, concretamente hasta 3 formas del ER α y 5 formas del ER β . Las isoformas del receptor ER β pueden transactivar la transcripción únicamente cuando se forma un heterodímero con el receptor funcional ER β 1 de 59 kDa. El receptor ER β 3 ha sido detectado en los testículos a elevadas concentraciones. En peces, pero no en humanos, se ha descrito otra forma denominada receptor de estrógeno gamma (ER γ). (Yaghmaie et al., 2005).

El receptor ER α es expresado mayoritariamente en endometrio, células de cáncer de mama, células del estroma ovárico e hipotálamo.

El receptor ER β es expresado mayoritariamente en riñones, cerebro, hueso, corazón, pulmones, mucosa intestinal, próstata y células del endotelio (Babiker et al., 2002).

Los receptores de estrógeno son sobre-expresados en alrededor del 70% de los casos de cáncer de mama, referidos como "ER positivos". Se ha propuesto dos hipótesis para explicar por qué esto causa tumorigénesis, y las evidencias que apoyan cada una de dichas hipótesis:

En primer lugar, la unión de estrógeno al receptor estimula la proliferación de las células de las glándulas mamarias, con el resultado de un incremento en la división celular y así, de la replicación del ADN, con el consiguiente riesgo de sufrir mutaciones.

En segundo lugar, el metabolismo del estrógeno produce residuos genotóxicos.

El resultado de ambos procesos es la interrupción del ciclo celular, la apoptosis y la reparación del ADN, con la consecuente posibilidad de la formación de un tumor. ER α se encuentra asociado con multitud de tumores de diverso origen, mientras que la implicación de ER β aún es controvertida. Se han identificado diferentes versiones del gen ESR1 (con polimorfismo de nucleótido simple), asociadas con diferentes porcentajes de riesgo de desarrollar cáncer de mama y ESR2 en cáncer colorrectal (Deroo & Korach, 2006; Rudolph et al., 2014).

La terapia endocrina para tratar el cáncer de mama requiere el uso de moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERMs), los cuales se comportan como antagonistas de los receptores de estrógeno en el tejido mamario, o bien inhibidores de aromatasa. El estatus de ER es utilizado para determinar la sensibilidad del cáncer de mama al tamoxifeno y a los inhibidores de aromatasa (Clemons, Danson, & Howell, 2002). Otro SERM, el raloxifeno, ha sido utilizado como quimioterapia preventiva para mujeres que posean un alto riesgo de desarrollar cáncer de mama.(Fabian & Kimler, 2005). Otro quimioterapéutico anti-estrógeno es el ICI

182,780 (Faslodex), que actúa como un antagonista y promueve además la degradación del receptor de estrógeno.

El estrógeno y sus receptores también se encuentran implicados en cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de próstata y cáncer de endometrio. El cáncer de colon avanzado se encuentra asociado a la pérdida de ER β , el receptor de estrógeno predominante en el tejido intestinal, con lo que el tratamiento consiste en la administración de agonistas específicos de ER β .

1.3.1.3 Receptor de progesterona

El receptor de la progesterona (PR = del inglés progesterona receptor), hace referencia a un grupo de receptores que son activados por la hormona progesterona. El gen del PR se encuentra en el cromosoma 11 q22-23. Presenta tres isoformas como resultado de la transcripción de este gen, y el uso de tres sitios de inicio transcripcional diferentes (Horwitz, Sheridan, Wei, & Krett, 1990; Kastner et al., 1990). El PR-B es la isocora larga de la proteína (116 Da), PR-A es la isocora truncada que carece de 165 aminoácidos en la región N-terminal (94 Da) y el PR-C (60 Da), contiene una región N-terminal larga truncada que interrumpe el dominio de unión al ADN.[159] Es así que, sólo PR-A y PR-B contienen componentes críticos para la función del receptor, que incluyen el dominio de unión al ligando (LCD= del inglés ligand binding union), la región de bisagra (H), dominio de unión al ADN y dos de tres dominios con función activadora (AF= activation function). Datos experimentales sugieren que las dos isoformas de PR-A y PR-B, tienen funciones diferentes en el crecimiento celular del cáncer de mama. Por otra parte, en la práctica clínica ya se han utilizado anti-progestinas en las pacientes que han fracasado con otras terapias. Se postula que la terapia anti-progestina puede ser

adecuada, para pacientes con altos niveles de RP-A. (Couse, Lindzey, Grandien, Gustafsson, & Korach, 1997).

Los PR pueden ejercer sus efectos biológicos a través de varios mecanismos potenciales. En ausencia de hormona, una gran proporción del PR se encuentra en el citoplasma, formando complejos proteicos con chaperonas y proteínas de choque térmico (Hsp), incluyendo Hsp40, Hsp70 y Hsp90. El incremento del PR nuclear ocurre en presencia de progesterona (Hopp et al., 2004).

Evidencias clínicas sugieren un papel directo para los PR en cáncer de mama. El estudio de la Iniciativa de Salud de las Mujeres (Women's Health Initiative) y el estudio de un Millón de Mujeres (Million Women Study), demostraron que las mujeres posmenopáusicas que recibieron Terapia de restitución hormonal a base de progesterona en combinación con estrógenos, experimentaron un mayor riesgo relativo de desarrollar cáncer de mama en comparación con las que sólo tomaron estrógenos. Además, los tumores fueron más grandes y de alto grado, también mostraron un mayor riesgo para morir por cáncer de mama. Los datos preclínicos sugieren fuertemente un papel importante de los RP, en la biología del cáncer de mama (Anderson et al., 2012).

En conclusión, la progesterona juega un papel importante en el desarrollo y progresión del cáncer de mama. Esto abre la posibilidad del uso de nuevas terapias alternas, como es el uso de anti-progestinas en combinación con el tamoxifeno en un subgrupo de pacientes con cáncer de mama.

1.3.2 Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR = del inglés epidermal growth factor receptor)

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB-1 o HER1 en el ser humano) es el receptor celular de superficie de los miembros de la familia del factor

de crecimiento epidérmico (EGF). Se encuentra codificado en humanos por el gen EGFR. El factor de crecimiento epidérmico es un miembro de la familia de receptores ErbB, una subfamilia relacionada con los receptores tirosina quinasa: EGFR (ErbB-1), HER2/c-neu (ErbB-2), Her 3 (ErbB-3) y Her 4 (ErbB-4). Las mutaciones que afectan a la expresión o actividad del EGFR pueden provocar cáncer, como así también la sobreexpresión de EGFR (HER-1) es una característica molecular de numerosos tumores humanos sólidos (carcinoma escamoso de cabeza y cuello, carcinoma de ovario, carcinoma colorectal, neoplasias del sistema nervioso central, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, etc) (Ciardiello & Tortora, 2008). La desregulación en la cascada de señalización del EGFR se encuentra asociada con el cancer de mama (Davis et al., 2014).

1.3.3 Receptor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR = del inglés vascular endothelial growth factor receptor)

EL VEGFR hace referencia a un grupo de receptores que son activados por los factores de crecimiento vascular endotelial (VEGFs). Estos factores de crecimiento regulan el desarrollo y homeostasis en vasos sanguíneos y linfáticos. Los VEGFs son predominantemente producidos por células endoteliales, hematopoyéticas o del estroma en respuesta a hipoxia o bajo estimulación de factores de crecimiento, tales como TGFB, interleuquinas o factores de crecimiento derivados de plaquetas.

Existen tres tipos de receptores para VEGFs (VEGFR-1, -2, -3) VEGFR son activados mediante unión a ligando, generándose un dímero activo a través de la transfosforilación. VEGFR-1 es requerido para el reclutamiento de células madres hematopoyéticas y la migración de monocitos y macrófagos, VEGFR-2 regula la función vasculo-endotelial y VEGFR-3 regula la función endotelial linfática. Algunos

tumores expresan VEGFR2 donde este tiene un rol de mediar la señalización por unión a VEGF (Goel & Mercurio, 2013).

1.4. CÁNCER DE MAMA, GENERALIDADES

1.4.1. Factores de Riesgo

El riesgo de padecer un cáncer de mama aumenta con la edad, siendo el riesgo estimado de padecerlo a lo largo de la vida para una mujer blanca de 13,1%; desde el momento del nacimiento, la probabilidad de fallecer de un cáncer de mama es del 3,4% (Hankey et al., 2000). En los últimos años ha habido un aumento en la práctica de mamografías con el fin de conseguir un diagnóstico precoz del cáncer de mama (Blanks, Moss, McGahan, Quinn, & Babb, 2000; Duffy et al., 2003; Greenlee et al. 2000; Otto et al., 2003), lo cual ha supuesto que, si bien la mortalidad por cáncer de mama en España presenta una tendencia a la disminución, el número total de diagnósticos ha aumentado a favor de estadios mucho más tempranos y curables a largo plazo, al menos en el grupo de mujeres de 40 a 59 años.

No se ha considerado un factor de riesgo la edad, por que el envejecer es un proceso normal de todas las personas. Los verdaderos factores de riesgo para padecer cáncer de mama se exponen a continuación:

1.4.1.1. Agregación familiar.

Globalmente, existe un riesgo 1,5-3 veces superior al de la población normal para aquellas pacientes cuyo familiar de primer grado (hermana o madre) hayan padecido un cáncer de mama (Ottman, Pike, King, & Henderson, 1983). La historia familiar es un factor de riesgo heterogéneo que depende del número de familiares afectados con la enfermedad, del número de familiares no afectados, de la edad en la que se

ha diagnosticado en los familiares y del grado de parentesco. En innumerable ocasiones, en ausencia de una predisposición hereditaria conocida, las pacientes con historia familiar positiva tienen incrementado el riesgo, ya que pueden existir factores genéticos, no definidos, factores ambientales o combinación de ambos en una misma familia.

1.4.1.2. Predisposición hereditaria.

La predisposición hereditaria ocurre sobre todo cuando una mujer padece cáncer de mama en edades tempranas (por debajo de 45 años) y cuando tiene historia familiar positiva para cáncer mama y/u ovario. En el año 1994 se clonaron los genes de susceptibilidad genética al cáncer de mama y ovario BRCA, el gen BRCA1 está localizado en la región 17q21 y BRCA2 en la región 13q13.

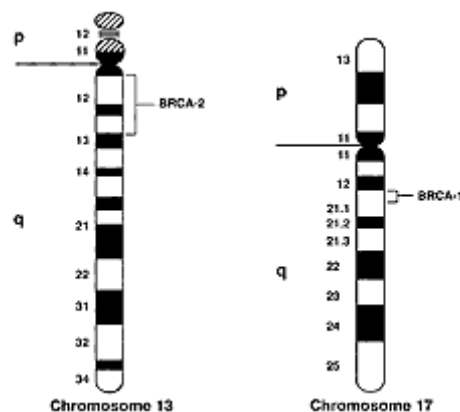


Figura 4. Ubicación de los genes BRCA1 y BRCA2

Las mutaciones en estos genes se transmiten de forma autosómica dominante y se asocian a un riesgo de hasta un 85% de desarrollo de cáncer de mama a lo largo de la vida, sobre todo a edades tempranas (Chang-Claude, Eby, & Becher, 1994). Es importante conocer que la posibilidad de padecer cáncer de ovario aumenta si estas mutaciones están presentes, especialmente en BRCA1 (Struewing et al., 1997). Las proteínas derivadas de la transcripción de los genes BRCA1 y BRCA2 tienen la

función de inhibir las señales originadas por las hormonas esteroideas, la alteración en la función de estas proteínas provoca una falta de control sobre la activación estrogénica, predisponiendo a la carcinogénesis (S. Fan et al., 1999). Las pacientes con los síndromes de Li-Fraumeni (Birch, 1990), Cowden (Liaw et al., 1997), Muir-Torre (Srivastava, McKinnon, & Wood, 2001) o la enfermedad ataxia-telangiectasia, tienen mayor susceptibilidad a padecer cáncer de mama; este aumento está relacionado con un deterioro en la capacidad de reparación del DNA a nivel de todos los tejidos, por lo tanto, no se trata de síndromes específicos de cáncer de mama.

1.4.1.3. Factores hormonales.

Los estudios epidemiológicos revelan que a mayor tiempo de exposición a estrógenos existe un mayor riesgo de padecer cáncer de mama. Una menarquía a edades tempranas, una menopausia tardía y, por sobre todo, una edad tardía al primer embarazo o la nuliparidad, está íntimamente relacionado con un aumento en la incidencia (Gail et al., 1989; Rosner & Colditz, 1996). La intensidad de la exposición juega un papel importante: en mujeres posmenopáusicas, cuyos estrógenos provienen fundamentalmente de la aromatización en tejidos periféricos de los andrógenos suprarrenales, la obesidad se asocia a un incremento del riesgo (la aromatización de andrógenos se produce sobre todo en el tejido graso (Huang et al., 1997)). En cuanto al uso de terapia hormonal sustitutiva se genera un aumento del riesgo (Gray, 2003). En definitiva, cualquier proceso que aumente las cantidades de estrógenos circulantes generará un mayor riesgo de padecer cáncer de mama (Folkerd & Dowsett, 2013). La incidencia de cáncer de mama se incrementa con la edad. Dicho incremento persiste tras la menopausia, pero a una velocidad 6 veces

menor. Esto sugiere la importancia de la función ovárica en cuanto a síntesis de estrógenos en el riesgo de cáncer de mama (Folkerd & Dowsett, 2013).

1.4.1.4. Estilo de vida y factores dietéticos.

Con respecto a los factores dietéticos, el consumo de grasa per cápita se ha relacionado con incidencia y mortalidad por cáncer de mama (Sonnenschein et al., 1999). La práctica de ejercicio físico regular parece proteger del cáncer de mama en mujeres premenopáusicas debido a la pérdida de grasa periférica y al aumento de ciclos anovulatorios; ambos factores conducen a una menor exposición a estrógenos (Thomson et al., 2014).

Los resultados de un gran metaanálisis que estudió la relación del consumo de alcohol con la incidencia de cáncer de mama, evidenciaron que el riesgo relativo para las pacientes que consumían 1, 2, o 3 unidades de bebida alcohólica al día era de 1,1, 1,2 y 1,4 veces superior respectivamente respecto a las mujeres abstemias (Bagnardi, Blangiardo, La Vecchia, & Corrao, 2001). Las mujeres que ingieren pocas cantidades pero con mucha frecuencia también poseen una pequeña predisposición a desarrollar cáncer de mama, siendo indiferente si han comenzado a beber temprana o tardíamente (W. Y. Chen, Rosner, Hankinson, Colditz, & Willett, 2011).

1.4.1.5. Factores ambientales

El efecto sobre la incidencia del cáncer de mama de la mayoría de los factores ambientales, aún no están del todo dilucidados por el momento solo se puede aceptar que la exposición a radiaciones ionizantes incrementa el riesgo de cáncer de mama (Cooke et al., 2013).

1.4.1.6 Tejido mamario denso

Se ha evidenciado también que las mujeres con senos densos radiológicamente (Ottman et al., 1983) tienen tres a seis veces mayor riesgo de cáncer de mama que las mujeres que tienen pechos grasos.

1.4.1.7. Enfermedades benignas de la mama

Las enfermedades benignas de la mama se dividen en no proliferativas y proliferativas (hiperplasia ductal, adenosis esclerosante, atipia ductal con hiperplasia y carcinoma lobulillar *in situ*). Solo las enfermedades proliferativas están asociadas con el cáncer de mama. Si en una biopsia de enfermedad proliferativa no observamos atipias histológicas, el riesgo de cáncer está aumentado 1,5-2, mientras que si lo que observamos es una hiperplasia con atipia, el riesgo relativo es de 5. Para hacerse una idea de lo que estos datos representan, el riesgo a 15 años de presentar cáncer de mama para una mujer con una biopsia de hiperplasia con atipia e historia familiar positiva es del 20% (Dupont & Page, 1985).

1.4.2. Recuerdo clínico

Para situarnos en los aspectos clínicos del cáncer de mama, es necesario hacer una pequeña introducción a la anatomía de la glándula mamaria.

La glándula mamaria es de origen ectodérmico y constituye la característica fundamental de los mamíferos.

En la mujer, la glándula mamaria se encuentra en la estructura anatómica denominada mama. La histología de la glándula mamaria está compuesta por un parénquima glandular, compuesto de lobulillos y ductos.

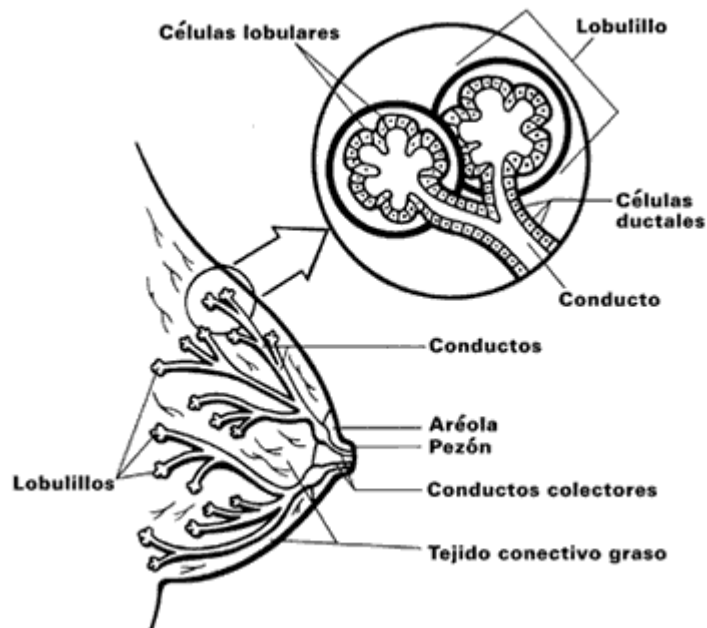


Figura 5. Anatomía de la glándula mamaria

Las mamas están situadas en la parte anterior del tórax y pueden extenderse en medida variable por su cara lateral. Su forma varía según características personales, genéticas y en la misma mujer de acuerdo a la edad y paridad. La mayor parte de la masa de la mama está constituida por tejido glandular y adiposo.

La cara superficial de la mama está cubierta por piel. Aproximadamente en el centro de esta cara se encuentra el pezón que está en relación al cuarto espacio intercostal en la nulípara. La base del pezón está rodeada por una zona de piel hiperpigmentada, denominada areola.

La glándula mamaria está formada por tres tipos de tejidos: glandular de tipo túbulo-alveolar, conjuntivo que conecta los lóbulos, y adiposo que ocupa los espacios interlobulares (Janet E Joy, Edward E Penhoet, 2005).

En cáncer de mama, un diagnóstico temprano puede mejorar sustancialmente el pronóstico de la enfermedad. Los nódulos y masas en la mama son detectables en el 90% de los pacientes con cáncer de mama, y constituyen el signo más frecuente en la historia clínica y en la exploración física. La masa típica del cáncer de mama

suele ser solitaria, unilateral, solida, dura, irregular, fija y no dolorosa. La descarga de leche se produce en aproximadamente el 3% de las mujeres con cáncer de mama, pero el 90% de los casos de descarga por el pezón traducen patología benigna. Las descargas lechosas, purulentas o pegajosas no suelen corresponder a patología tumoral, pero las descargas serosas, sero-sanguinolentas, hemorrágicas o acuosas han de ser investigadas. Otras manifestaciones de presentación incluyen cambios cutáneos, adenopatías axilares o signos locales de enfermedad avanzada o diseminada. En general, en la enfermedad avanzada, los síntomas se deberán al deterioro orgánico que generan las metástasis, así como a las manifestaciones de cualquier cáncer avanzado (caquexia, astenia, deterioro del estado general progresivo, pérdida de peso)(Janet E Joy, Edward E Penhoet, 2005). El cáncer de mama es una enfermedad excesivamente heterogénea, el tumor crece a velocidades distintas en pacientes diferentes y en muchas ocasiones es una enfermedad sistémica en el momento del diagnóstico inicial (Advanced Breast Cancer, 2009).

Conociendo el tiempo de duplicación tumoral del cáncer de mama obtenemos una idea de la magnitud del problema. Un tumor de mama de 1 cm contiene aproximadamente 1×10^9 células. El tiempo de duplicación de la lesión en el cáncer de mama varía de 25-200 días. Por eso, un tumor de 1 cm. puede llevar en la mama de 2 a 17 años de evolución antes de ser diagnosticado. En este tiempo el fenotipo de las células tumorales no es estático ni homogéneo, sino que va ganando agresividad como potencial metastásico, inhibición de apoptosis en respuesta a citotóxicos, etc. (Calaf et al., 2015).

Para realizar un pronóstico, la clínica convencional está influida por marcadores bioquímicos, la presencia de ciertos marcadores moleculares en lesiones aparentemente localizadas y completamente resecaadas se relaciona con rápidas

recaídas a distancia por existencia de enfermedad que esta oculta al momento del diagnostico (Lang, Wecsler, Press, & Tripathy, 2015).

En cuanto al tratamiento, la supervivencia mediana de pacientes no tratadas es de 2,5 años. Las pacientes tratadas solo con tratamientos locales (cirugía con o sin radioterapia local) tienen una expectativa de vida mejor que las pacientes que no han recibido ningún tipo de tratamiento, pero existen diferencias significativas respecto del tiempo de vida de personas que no han sufrido nunca la enfermedad. Cualquiera que sea la causa de muerte, el 75-85% de las pacientes con historia de cáncer de mama presenta evidencia de tumor en la autopsia.

Los ganglios regionales afectos son predictores de enfermedad sistémica, y no barreras para la diseminación tumoral, la exéresis de los ganglios linfáticos axilares en la cirugía no altera la tasa de recurrencias, el desarrollo de metástasis a distancia o las tasas de supervivencia. Hasta el 50% de todas las pacientes con cuatro o más ganglios linfáticos axilares afectos tendrán evidencia de enfermedad metastásica clínica antes de que transcurran 18 meses.

Cabe concluir que el amplio espectro clínico de la enfermedad, cuyos puntos extremos son el cáncer lobulillar in situ y el cáncer metastásico con invasión visceral (se verá más detalladamente) no define más que la heterogeneidad del cáncer de mama. Por esta razón es importante, no solo saber en qué punto se encuentra la paciente en cada momento, sino tener en cuenta los factores pronósticos, cuya presencia o ausencia nos indica cual va a ser el curso de la enfermedad con altas probabilidades, como así también los factores predictivos, cuya presencia o ausencia nos indica a que tratamientos va a responder o no la enfermedad de una paciente en concreto. En la actualidad existen múltiples factores predictivos y pronósticos, pero en su mayoría son insuficientes, es necesario el desarrollo de

nuevos biomarcadores que independientemente o acompañados de los clásicos, ayuden a mejorar la supervivencia y el bienestar de las pacientes con cáncer de mama (Reiss, 1989).

1.5. CÁNCER DE COLON, GENERALIDADES

1.5.1. Factores de Riesgo.

Edad. El riesgo de contraer cáncer colorrectal se incrementa al aumentar la edad. La mayoría de los casos ocurren entre los 60 y 70 años, mientras que antes de los 50 años es poco común, a menos que haya una historia familiar de aparición temprana de cáncer colorrectal.

La aparición de pólipos de colon, en particular la presencia de pólipos adenomatosos, es un factor importante de riesgo de cáncer. La eliminación de pólipos del colon durante la colonoscopia reduce el riesgo subsecuente de cáncer de colon (Brenner, Kloor, & Pox, 2014)

1.5.1.1. Cáncer colorrectal hereditario.

Entre el 5 y el 10 % de los pacientes con cáncer de colon desarrollan los denominados síndromes de cáncer hereditario. Los más conocidos son el cáncer colorrectal hereditario sin poliposis y poliposis adenomatosa familiar (Brenner et al., 2014).

1.5.1.2. Poliposis adenomatosa familiar

La poliposis adenomatosa familiar es una enfermedad autosómica dominante, en el 80% de individuos afectados es producida por una mutación en el gen de la poliposis adenomatosa de colon (APC = del inglés adenomatous polyposis coli). Tiene una

prevalencia de 1 en 10.000. Cerca del 100% de los pacientes con poliposis adenomatosa familiar, desarrollaran cáncer colorrectal antes de los 40 años, si no son tratados. El gen APC humano se encuentra situado en el brazo largo del cromosoma 5, entre las posiciones 21 y 22. La severidad de la enfermedad está asociada con la proximidad de la mutación a la región central del gen APC, con mutaciones en entre el codón 1445 y 1578 generan un incremento en el riesgo de generar tumores desmoides. Una variante de esta patología es la poliposis adenomatosa familiar atenuada, que son pacientes con menos de 100 adenomas, estos pacientes poseen mutaciones localizadas en las terminaciones 5' o 3' del gen APC (Fearnhead, 2001).

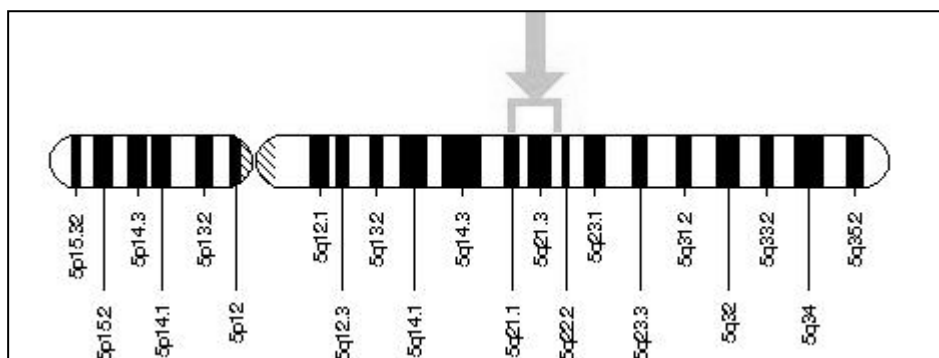


Figura 6. Ubicación del gen APC

1.5.1.3. Cáncer colorrectal hereditario sin poliposis o síndrome de Lynch

El síndrome de Lynch es el desorden hereditario asociado al cáncer colorrectal más común, este muestra un patrón hereditario autonómico dominante. El inicio de la enfermedad a los 45 años en promedio a diferencia de los 63 años en la población general (Brenner et al., 2014). El síndrome de Lynch está relacionado con mutaciones germinales en genes de reparación de errores en el DNA, como son MLH1, MSH2 o MSH6 (Chung & Rustgi, 2003; Lynch & de la Chapelle, 2003). Las

diferencias patológicas entre estos pacientes y pacientes con cáncer colorrectal esporádico, son poco apreciables, puede haber un exceso de células mucosa y en anillo de sello, reacción similar a Crohn's y una gran infiltración de linfocitos dentro del tumor.

1.5.1.4. Estilo de vida y factores dietéticos.

El consumo de tabaco está relacionado con una mayor probabilidad de desarrollar cáncer colorrectal. En un reciente estudio de la Sociedad Americana de Cáncer se pudo observar, que en las mujeres fumadoras es un 40% más probable que desarrollasen cáncer colorrectal que una mujer no fumadora. Los fumadores masculinos tienen un riesgo 30% mayor de padecer esta enfermedad (Aleksandrova et al., 2014).

La dieta es otro factor importante, las dietas altas en carnes rojas, al igual que aquellas bajas en fibra, están asociadas a un riesgo de cáncer colorrectal. Aquellas personas que frecuentemente comen pescado tienen un menor riesgo (E. Kim, Coelho, & Blachier, 2013). En cuanto a la actividad física, el sedentarismo y la falta de actividad deportiva son factores de riesgo en el desarrollo de cáncer colorrectal.

Por otra parte, se ha comprobado que el abuso en el consumo de bebidas alcohólicas puede aumentar el riesgo de cáncer colorrectal, así lo demuestran algunos estudios epidemiológicos en los que se ha notado una leve, aunque consistente asociación del consumo dosis-dependiente de alcohol y el cáncer de colon (Cai, Li, Ding, Chen, & Jin, 2014; Willett) independientemente de que se controlen otros factores como el consumo de fibra y otros factores dietéticos (Kune, Kune, & Watson, 1987; Potter & McMichael, 1986).

1.5.1.5. Enfermedades asociadas

Aproximadamente 30% de las personas con colitis ulcerosa crónica o enfermedad de Crohn, desarrollan cáncer colorrectal a partir de los 25 años, si el colon entero está afectado. Una enfermedad infecciosa como es la producida por el virus del papiloma humano puede estar asociada con cáncer colorrectal. Por último la colangitis esclerosante primaria, ofrece un riesgo independiente.

Los individuos que previamente hayan sido diagnosticados y tratados por tener cáncer tienen un mayor riesgo que la población general de contraer cáncer colorrectal en el futuro. Las mujeres que hayan tenido cáncer de ovario, útero o del seno tienen un riesgo aumentado de la aparición de cáncer de colon.

A pesar de la gran cantidad de factores de riesgo, es la edad y la presencia de pólipos lo que más predispone a las personas a contraer cáncer colorrectal. El riesgo de contraer cáncer colorrectal se incrementa al aumentar la edad. La mayoría de los casos ocurren entre los 60 y 70 años, mientras que antes de los 50 años es poco común, a menos que haya una historia familiar de aparición temprana de cáncer colorrectal. Con respecto a los pólipos de colon, en particular pólipos adenomatosos, la eliminación de pólipos del colon durante la colonoscopia reduce el riesgo subsecuente de cáncer de colon (Anderloni, Jovani, Hassan, & Repici, 2014).

1.5.2. Recuerdo clínico

Para situarnos en los aspectos clínicos del cáncer colorrectal, es necesario hacer una pequeña introducción a la anatomía del colon.

El colon consta de 4 secciones: colon ascendente, colon transversal, colon descendente, colon sigmoideo. El colon, el recto y el ciego componen el intestino grueso (Rouviere, 1959).

El colon está situado inmediatamente después del ciego y mide 1,5 metros, sus funciones principales son las de almacenar residuos, extraer agua, mantener el equilibrio de hidratación y absorber algunas vitaminas como la vitamina K.

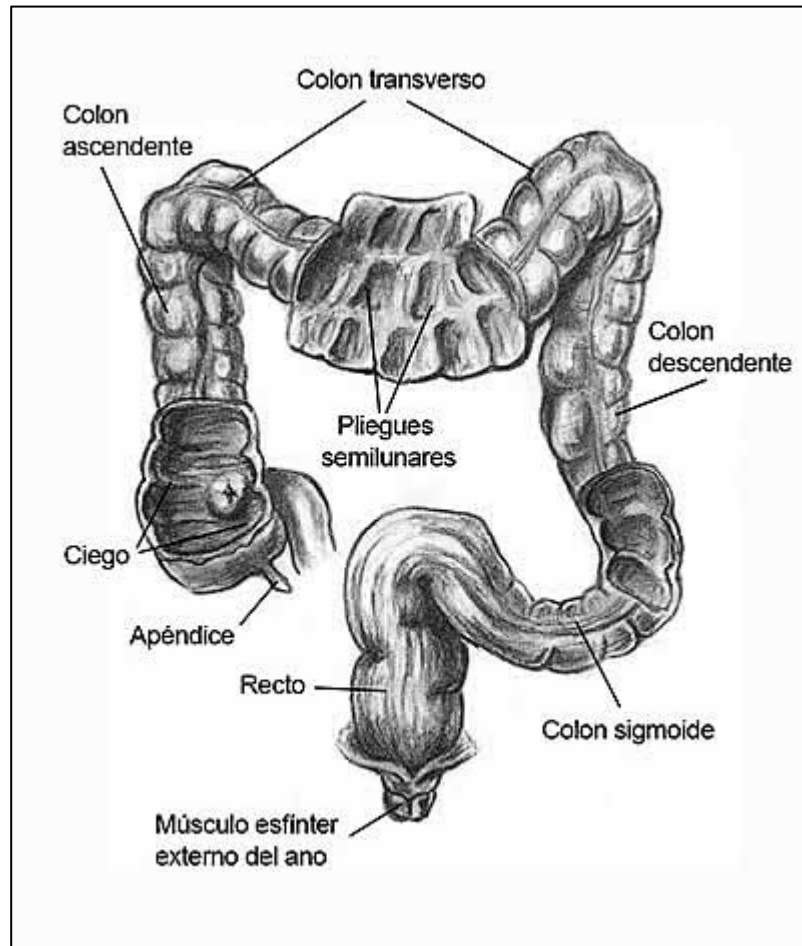


Figura 7. Anatomía del intestino grueso

El cáncer colorrectal (CRC = del inglés colorrectal cáncer) constituye una enfermedad caracterizada por un largo estadio preclínico, la progresión desde adenomas tempranos a cáncer invasivos tiene una duración de varios años (Kuntz et al.). El 40-50% de los pacientes que comienzan a tener síntomas de la enfermedad, presentan enfermedad metastásica en el momento del diagnóstico (Jacques Ferlay et al., 2010). Esta característica hace que sea necesario realizar controles periódicos en la población sana y/o con mayor edad.

a). Los pruebas existentes se pueden clasificar en pruebas de detección temprana o en pruebas para la prevención (Oort et al., 2010). Las pruebas de prevención sirven para encontrar pólipos y lesiones que pueden progresar a estadios avanzados. En cambio en la determinación temprana existe una serie de metodologías que sirven solo para detectar cáncer colorrectal y no se utilizan para detectar lesiones premalignas. Dentro de las herramientas necesarias para realizar una adecuada prevención se encuentran la sigmoidoscopia flexible, la colonoscopia, el enema con doble contraste de bario y la CT-colonografía. Para la detección de CRC en estadios tempranos se realizan los test de sangre oculta en materia fecal (Adler et al., 2012) y/o inmunoquímica en materia fecal para la detección de globinas. Se puede también diagnosticar por técnicas de imágenes (de Wijkerslooth et al., 2012; Spada et al., 2010) que pueden incluir la el uso de endoscopia con colon-capsula, permitiendo, de esta forma, la toma de imágenes de la pared intestinal de de todo el tracto digestivo (Eliakim, 2013; Groth et al., 2012).

b). Los marcadores moleculares de colon medidos en suero, son por lo general glicoproteínas anormales debido a una aberrante secreción de moco (Oort et al., 2010). Metilación de septin-9 sirve para discriminar entre tejido normal y canceroso (G. P. Young & Bosch, 2011). La expresión de MMP7 (metaloproteinasa de la matriz 7) y PTGS2 (prostaglandina 2 sintasa) son también utilizadas. El CEA (antígeno carcinoembrionario) ha sido analizado también en heces (Hamilton, Round, Sharp, & Peters, 2005). De todas maneras es necesario seguir validando la utilización de estos marcadores como herramienta diagnóstica.

c) La mayoría de los diagnósticos de CRC se realiza luego de la aparición de los primeros síntomas, que son: Cambios en los hábitos intestinales, sangrado rectal, dolor abdominal, debilidad y pérdida de peso (Brenner et al., 2014).

d) El pronóstico está influido por el grado de penetración del tumor en la membrana basal e invasión de la lámina propia, la presencia de metástasis y/o diseminación regional a nódulos linfáticos (Bruinvels et al., 1994). La evaluación sérica de CEA es utilizado como marcador pronostico porque es muy económico y fácil de detectar (Bruinvels et al., 1994; Carrato, 2008; Harrison, Guillem, Paty, & Cohen, 1997).

e) El tratamiento depende en gran modo del grado del estadio de la enfermedad. La cirugía es la única modalidad curativa para el CRC localizado o con poco numero de metástasis. En algunos casos la cirugía solo sirve para paliar algunos síntomas, tales como la obstrucción. Las terapias adyuvantes sirve para minimizar los riesgos de recidivas, en pacientes con alto riesgo de tener recaídas (K.-M. Kim et al., 2011) y los tratamientos neoadyuvante se utilizan para generar una reducción considerable del tumor, para su posterior extracción por cirugía. En cuanto a la enfermedad metastásica, el tratamiento solo es paliativo y se explicará en profundidad más adelante.

En el cáncer de colon como en la gran mayoría de las enfermedades oncológicas, no se puede ofrecer a un paciente, información exacta sobre cuál va a ser el curso natural de su enfermedad. El amplio espectro clínico cuyos puntos extremos son el cáncer localizado in situ y el cáncer metastásico Durante el transcurso de la enfermedad, es de gran importancia, determinar en qué punto se encuentra el paciente, en cada momento, evaluando marcadores con valor pronósticos y predictivos para determinar cuál va a ser el curso de la enfermedad y si va a responder a los tratamientos que se le apliquen.

1.6 BIOLOGÍA DEL CRECIMIENTO TUMORAL

El desarrollo de los tumores malignos puede dividirse en cuatro fases: transformación, crecimiento, invasión local y metástasis a distancia. La

transformación engloba los mecanismos genéticos y epigenéticos por los que una célula benigna pasa a ser maligna (Croce, 2008).

1.6.1. Transformaciones genéticas asociadas.

El cáncer es generado por alteraciones en oncogenes, genes supresores de tumores y microRNAs. Estas alteraciones son usualmente eventos somáticos. Un simple cambio genético es raramente suficiente para el desarrollo de un tumor maligno. Generalmente es un proceso que involucra varios pasos o alteraciones.

Los tumores generalmente poseen diferentes clones como consecuencia de alteraciones genéticas secundarias y terciarias. Esta heterogeneidad supone una diferencia en cuanto al comportamiento clínico de la enfermedad. Las diferentes poblaciones celulares pueden diferir en cuanto a la respuesta al tratamiento. Es por estas razones que los pasos de la iniciación del cáncer tienen una considerable importancia clínica para el desarrollo de un tratamiento racional (Byler et al., 2014).

1.6.1.1 Transformaciones en el Cáncer de Mama

Las alteraciones moleculares que envuelven la vía de señalización PIK3/AKT ocurren en más del 30% los tumores invasivos de mama. Alteraciones en la señalización de PI3K incluyen una ganancia de función de PIK3CA (subunidad catalítica p110 α), mutaciones en AKT1, amplificación de AKT2 y pérdida de PTEN fosfatasa (Engelman, Luo, & Cantley, 2006; Owens, Horten, & Da Silva, 2004).

La amplificación del gen del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2, Erb2) ocurre en un 18-20% de los casos (Slamon et al., 1987). HER2 activado fosforila sus sustratos, mediando la activación de numerosas vías de señalización dentro de la célula, incluyendo la vía PI3K-AKT-mTOR y la vía RAS-RAF-MEK-ERK involucrada en la proliferación celular.

Las alteraciones de PTEN producen la pérdida de su actividad fosfatasa y con ella una disminución negativa de la regulación de la vía PI3K-AKT. La pérdida de la actividad de PTEN puede generarse por cambios epigenéticos o por modificaciones post traslacionales (Hollander, Blumenthal, & Dennis, 2011).

El receptor de estrógenos (ER) se expresa en la mayoría de los cánceres de mama y es un importante factor predictivo. El receptor de la progesterona (PR) se expresa en el 50% de los casos, La expresión de estos dos receptores puede considerarse un objetivo para la terapia (Deroo & Korach, 2006; Sukocheva, Yang, & Gierthy, 2009).

1.6.1.2. Transformaciones en el Cáncer de Colon

El adenocarcinoma es el principal subtipo de cáncer colorrectal, aparece tras la adquisición de una serie de mutaciones que ocurren durante varios años (J. Young et al., 2001).

Los microsatélites son secuencias cortas y repetidas que se encuentran en el genoma y son susceptibles a errores durante los procesos de replicación. El sistema de reparación de errores del DNA (MMR) es el responsable de reconocer y reparar errores durante el proceso de replicación DNA y la incapacidad de reparar estos errores se traduce en la aparición de inestabilidad de microsatélites. La inestabilidad de microsatélite (MSI) está ocasionada por fallos en MMR. EL MMR incluye los genes MSH2, MLH1, MSH6, MLH3, MSH3 o PMS1. Dependiendo del número de genes que se encuentran afectados, se puede hablar de MSI-alta o MSI-baja, y a mayor MSI se desencadenan mayor número mutaciones en los genes implicados en la carcinogénesis (Knudson, 1996; Morán et al., 2010).

APC es un gen supresor de tumores, se encuentra involucrado en la vía Wnt, donde APC forma un complejo con β -catenina, axina y GSK3 (Glicogeno sintetasa kinasa-3) La pérdida de los dos alelos es un requisito para la pérdida de la función de APC

(Worthley, Whitehall, Spring, & Leggett, 2007), conduciendo a la desregulación de la vía Wnt por la progresiva acumulación de B-catenina citoplasmática, afectando la proliferación celular, Angiogénesis y apoptosis (Markowitz & Bertagnolli, 2009).

P53 es un factor de transcripción que actúa como supresor tumoral, activando genes que actúan en el arresto del ciclo celular, apoptosis, senescencia, autofagia y metabolismo celular. La pérdida de la función de P53 genera una desregulación de los mecanismos de control del daño del DNA (Moran et al., 2010; Xie, Rimm, Lin, Shih, & Reiss, 2003).

SUMAD, SUMAD están involucrados en la vía de señalización de KGF- β , importante en la regulación del crecimiento celular como así también en la apoptosis. La pérdida de la activación de SMAD ocurre aproximadamente en el 10% de cáncer colorrectales (Y. Q. Chen et al., 1999).

DCC es un gen supresor de tumores que codifica para un receptor transmembrana de la superfamilia IgG, para moléculas de netrinas, involucradas en la orientación de axones y el desarrollo del sistema nervioso (Moran et al., 2010). DCC también pueden inducir apoptosis (Al-Sohaily, Biankin, Leong, Kohonen-Corish, & Warusavitarne, 2012; Jones & Baylin, 2007).

La metilación del DNA constituye un mecanismo de regulación de la expresión génica, en el cual no están implicados cambios en la secuencia del DNA. La metilación ocurre en las base de citosina y guanósina que están localizados en un dinucleótido par, CpG. Repetidas series de dinucleótidos CpG se encuentran localizados en una región particular de genes promotores, llamadas islas CpG. La metilación de promotores interrumpe la expresión de genes, directamente por la unión del factor de transcripción (Shchors & Evan, 2007). Los genes APC, MCC,

MLH1 o MGMT pueden ser inactivados por hipermetilación en Cáncer colorrectal (Weitz et al., 2014).

1.7. EVALUACIÓN DE CÁNCER DE MAMA

Cuando se presume que hay cáncer de mama, el tratamiento del paciente suele incluir lo siguiente:

- Confirmación del pronóstico.
- Evaluación del estadio de la enfermedad.
- Selección del tratamiento.

Las siguientes son las pruebas y procedimientos que se usan para diagnosticar cáncer de mama:

- Mamografía.
- Ecografía.
- Imágenes por resonancia magnética (IRM) de la mama por indicación clínica.
- Biopsia.

1.7.1. Estadiaje del cáncer de mama

La estadificación principal incluye:

- Estadio 0: es una enfermedad pre-maligna o con marcadores positivos (a veces llamada CDIS: carcinoma ductal 'in situ'). Sería el momento en que la célula se ha transformado recientemente en cancerígena, pero todavía no ha roto la membrana basal.
- Estadio 1: las células cancerígenas ya han superado la membrana basal, pero el tumor no supera los 2 cm de tamaño.
- Estadio 2: semejante al estadio 1 pero el tumor ya es mayor de 2 cm.

- Estadio 3: dentro de este estadio se tienen distintas clasificaciones en función del tamaño de la masa tumoral y de si los nódulos linfáticos están afectados o no.

Los estadios 1-3 se definen como los 'inicios' del cáncer y son potencialmente curables por ser en muchos casos operables.

- Estadio 4 se define como cáncer en etapa 'avanzada' y/o cáncer metastásico porque el cáncer se diseminó hasta otros órganos del cuerpo. Este tipo de cáncer metastatiza con mayor frecuencia en los huesos, los pulmones, el hígado o el cerebro y tiene un mal pronóstico.

1.7.2 Agrupamientos TNM

La AJCC estableció la estadificación según la clasificación del tumor, ganglio y metástasis (TNM; Tumor, Node, Metastasis) a fin de definir el cáncer de mama (Singletary et al., 2002).

El sistema TNM se basa en tres factores:

- Tamaño (T corresponde a tumor)
- Afectación de los ganglios linfáticos (N corresponde a ganglios: del inglés nodes)
- Si el cáncer se ha metastatizado (M corresponde a metástasis), o se ha extendido más allá de la mama hacia otras partes del cuerpo.

La categoría T (tamaño) describe el tumor original (primario):

- TX significa que no es posible medir o hallar el tumor.
- T0 significa que no hay indicio alguno del tumor primario.
- Tis significa que el cáncer se encuentra "in situ" (el tumor no ha empezado a crecer en el tejido mamario sano).

- T1, T2, T3, T4: estos números se basan en el tamaño del tumor y en qué medida ha invadido tejidos mamarios circundantes. Cuanto más alto es el número T, más grande es el tumor o más tejidos mamarios pudo haber tomado.

La categoría N (afectación de los ganglios linfáticos) indica si el cáncer ha llegado a los ganglios linfáticos cercanos:

- NX significa que no es posible medir o hallar los ganglios linfáticos cercanos.
- N0 significa que los ganglios linfáticos cercanos no presentan cáncer.
- N1, N2, N3: estos números se basan en la cantidad de ganglios linfáticos afectados y qué nivel de cáncer presentan. Cuanto más alto es el número N, mayor es el nivel de afectación de los ganglios linfáticos.

La categoría M (metástasis) indica si hay o no indicios de que el cáncer se ha propagado hacia otras partes del cuerpo.

- MX significa que no es posible medir o hallar metástasis.
- M0 significa que no hay metástasis distante.
- M1 significa que se ha detectado metástasis distante.

Una vez que el patólogo conoce tus factores T, N y M, puede utilizarlos para asignarle un estadio a la enfermedad. Por ejemplo, un cáncer de mama T1 N0 M0 significa que el tumor primario mide menos de 2 centímetros (T1), no ha afectado a los ganglios linfáticos (N0) ni se ha propagado hacia partes distantes del cuerpo (M0). Este cáncer puede clasificarse como de estadio I.

1.7.3 Factores pronósticos del cáncer de mama

1.7.3.1 Clásicos

Estado de los nódulos linfáticos: en caso de que estuvieran contaminados sería signo de un mal pronóstico.

Tamaño del tumor: en general un tumor grande suele ir ligado a un mal pronóstico, aunque no siempre es así, ya que en realidad es más importante la capacidad de invasión.

Estado proliferativo: a mayor proliferación peor prognosis. Este parámetro puede estudiarse realizando análisis histológicos (con tinción con hematoxilina y eosina (HE), por análisis inmunohistológico (Ki67) o análisis por FACS (en el que se estudien las células en fase S).

Grado histológico: para determinarlo se tiene en cuenta una combinación de varios factores como son la estructura de los túbulos (más o menos definida), el estado proliferativo (% de células mitóticas) y el pleomorfismo nuclear (número, forma y tamaño de núcleos y nucleolos). Existen dos sistemas para clasificar el cáncer de mama según el grado histológico: el sistema SBR (Scarff-Bloom-Richardson (E.E.U.U.)) y el sistema de Nottingham (Europeo) que no es más que el SBR modificado por Elston y Ellis. La diferencia entre ambos sistemas serían los límites de cada parámetro entre cada grado.

CA 15-3: Es un antígeno derivado de la mucina epitelial polimórfica. Niveles superiores de CA 15-3 a las 30 unidades/mililitro están relacionados con una supervivencia global menor, pero no tienen relación con el tamaño del tumor, el estado ganglionar axilar y la edad del afectado. Se considera un método de post-diagnóstico barato y no-invasivo. El cáncer de mama produce diversos antígenos glicoproteicos de alto peso molecular con diversas cadenas de

oligosacáridos.(Weigelt, Peterse, & van 't Veer, 2005). Otro marcador de cáncer de mama relacionado con el CA 15-3 es el CA 27-29, cuyo hallazgo y análisis aumenta la calidad y sensibilidad del diagnóstico.

uPA y PAI: Se ha demostrado que uPA y PAI son fuertes e independientes factores pronósticos en cáncer de mama. Se ha validado sobre todo en pacientes ganglios-negativos (Janicke et al., 2001; Sturgeon et al., 2008).

1.7.3.2 Sensibilidad a receptores

Todas las células tienen receptores en su superficie, en su citoplasma y el núcleo celular. Ciertos mensajeros químicos tales como las hormonas se unen a dichos receptores y esto provoca cambios en la célula. En el cáncer de mama hay tres receptores que son usados como marcadores tumorales: receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) y HER2/neu. Las células que tengan alterada la expresión de alguno de estos receptores se son clasificadas como positivas o negativas para la alteración específica del receptor. Aquellas células que no sobre-expresen ninguno de estos receptores se denominan basales o triple negativos. Todos de estos receptores son identificados por inmuno-histoquímica y genética molecular.

En torno al 70% de los cánceres de mama son sensibles a los estrógenos, esto quiere decir que son tumores ER + y por lo tanto significa que el estrógeno hace que el tumor canceroso mamario crezca. El cáncer de mama ER+ puede ser tratado con terapia adyuvante (Miller et al., 2014) mediante medicamentos que bloquean la activación de los receptores de estrógeno (SERMs), como el tamoxifeno, o bien con inhibidores de aromatasa (AIs), como el anastrozol. Este tipo de terapia se combina con cirugía y puede ir o no, seguida de un tratamiento con quimioterapia.

Aproximadamente 30% de las pacientes con cáncer de mama tienen cáncer de mama positivo para HER2 (Incorvati, Shah, Mu, & Lu, 2013; Thibault, Khodari, Lequoy, Gligorov, & Belkacémi, 2013). HER2 es un oncogén que ayuda a que genera crecimiento, división y reparación celular. Cuando las células tienen demasiadas copias de este gen se multiplican más rápidamente. Las mujeres con cáncer de mama positivo para HER2 tienen una enfermedad más agresiva, tienen una mayor resistencia a los tratamientos convencionales de quimioterapia y un riesgo mayor de recurrencia que aquellas que no tienen este tipo de cáncer. Sin embargo el cáncer de mama HER2+ responde a los medicamentos basados en terapias biológicas, utilizando una anticuerpo monoclonal, por ejemplo el trastuzumab en combinación con la quimioterapia convencional (Thibault et al., 2013).

1.7.4. Estado de receptores

El estado de receptor se utiliza para dividir el cáncer de mama en cuatro clases moleculares

- Subtipo basal (o triple negativo): caracterizado por la ausencia o mínima expresión de receptor de estrógeno (RE) y HER2 (triple negativo), elevada expresión de citoqueratinas 5/6 y 17 (mioepiteliales), laminina, y proteína 7 de unión a ácidos grasos. A diferencia de otros subtipos, este grupo de tumores presenta alta frecuencia (82%) de mutaciones en TP53 (en tirosina) y expresión de proteína p53 (TP53 funciona como punto de control (checkpoint)) en el ciclo celular desencadenando respuestas ante el daño sobre el DNA, incluyendo reparación y apoptosis). Los tumores de tipo basal reciben este nombre por su perfil de expresión genómica similar a la de un epitelio celular basal normal y a las células mioepiteliales

mamarias normales. También comparte características histológicas con las células epiteliales basales de la mama normal, y muestra una tasa proliferativa elevada, necrosis central y margen infiltrativo, así como estroma escaso, frecuentes células apoptóticas y respuesta estromal linfocítica, características similares a las también observadas en los carcinomas que aparecen en mujeres portadoras de mutación en el gen BRCA1(Livasy et al., 2006).

- Subtipo HER2+: ausencia o mínima expresión de RE, elevada expresión de HER2. El perfil de expresión revela no solo copias aumentadas de ARNm de HER2/neu, sino también un aumento en la transcripción de otros genes adyacentes que están amplificados en este segmento de ADN, como GRB7.

- Luminal A: caracterizado por la elevada expresión de RE, proteína 3 de unión a GATA, proteína de unión a caja-X, factor 3, factor nuclear 3 alfa de hepatocito y LIV-1 regulada por estrógeno. Comparte características con las células epiteliales luminales que se desarrollan a partir de la capa interna de revestimiento del ducto mamario.

- Luminal B y C: expresión baja a moderada de genes específicos de perfil luminal incluyendo los de grupo de RE (Mohsin et al., 2004).

Para concluir, el estado de receptor se ha convertido en una evaluación crítica de todos los cánceres de mama, ya que determina la idoneidad del uso de tratamientos específicos, por ejemplo, tamoxifeno y/o trastuzumab. En la actualidad estos tratamientos son muy eficaces en el cáncer de mama. No obstante el cáncer de mama triple negativos (es decir, sin receptores positivos), al carecer de receptores como posibles dianas terapéuticas, se piensa que puede ser un indicativo de mal pronóstico.

1.8. EVALUACIÓN DE CÁNCER DE COLON

Cuando se presume que hay cáncer de colon, al igual que en el cáncer de mama, el tratamiento del paciente incluye:

- Confirmación del pronóstico.
- Evaluación del estadio de la enfermedad.
- Selección del tratamiento.

Además el diagnóstico va acompañado de diferentes pruebas que ayuden a la confirmación del resultado, entre las que se destacan:

- Prueba de sangre oculta en materia fecal.
- Sigmoidoscopia.
- Examen digital del recto.
- Colonoscopia.
- Biopsia.

1.8.1. Estadiaje del cáncer de colon

La estadificación principal incluye:

- Estadio 0: es una enfermedad pre-maligna o con marcadores positivos. Sería el momento en que la célula se ha transformado recientemente en cancerígena, pero todavía no ha roto la membrana basal.
- Estadio 1: las células cancerígenas ya han superado la membrana basal, pero el tumor no supera los 2 cm de tamaño.
- Estadio 2: semejante al estadio 1 pero el tumor ya es mayor de 2 cm.
- Estadio 3: dentro de este estadio se tienen distintas clasificaciones en función del tamaño de la masa tumoral y de si los nódulos linfáticos están afectados o no.

Los estadios 1-3 se definen como los 'inicios' del cáncer y son potencialmente curables por ser en muchos casos operables.

Estadio 4 se define como cáncer en etapa 'avanzada' y/o cáncer metastásico porque el cáncer se diseminó hasta otros órganos del cuerpo. Este tipo de cáncer metastatiza con mayor frecuencia en los huesos, los pulmones, el hígado o el cerebro y tiene un mal pronóstico.

1.8.2. Factores pronósticos del cáncer de colon

La AJCC (American Joint Committee on Cancer) ha establecido un grupo de trabajo, que ha evaluado el rol de diferentes factores con valor pronóstico (Markowitz & Bertagnolli, 2009). Los diferentes factores han sido clasificados respecto a la existencia de evidencias concluyentes. Las categorías van desde I a IV, siendo la categoría I la que incluye los factores mejor caracterizados y actualmente utilizados en forma rutinaria en la clínica y la categoría IV

1.8.2.1 Factores Clásicos o de categoría 1

Estado de los nódulos linfáticos: al igual que en la mayoría de los tumores sólidos, en caso de que estuvieran contaminados sería signo de un mal pronóstico.

Grado tumoral: El grado tumoral hace referencia al grado de diferenciación celular, células más diferenciadas, son las de menor grado, con una tasa de crecimiento menor y baja agresividad.

Grado I. Estructura glandular bien diferenciada y compacta, los núcleos se mantienen cerca de la capa basal, las células tienen poca tendencia a extenderse al tejido contiguo, son raras las mitosis.

Grado II. Todavía conserva disposición glandular, pero algunas glándulas tienen disposición laxa, células con núcleos dispersos, en más de tres capas, células difunden hacia el tejido adyacente. Las mitosis son más numerosas.

Grado III. Se pierde la estructura glandular por completo, partes del tumor muestran células neoplásicas que crecen en masas sólidas, se pierde casi toda la polaridad de las células, las mitosis son muy frecuentes.

Carcinomas mucinosos: Los carcinomas colorrectales que producen mucina tienen mayor tendencia a diseminarse tanto localmente como a distancia. El carcinoma con células en anillo de sello, un carcinoma mucinoso intracelular raro, también tiene un pronóstico grave.

Presencia de invasión vascular: Los tumores con gran número de vasos linfáticos o sanguíneos tienen mal pronóstico.

Tumores Residuales: Existencia de pequeñas tumoraciones que originan en su mayoría recurrencia y metástasis

Elevación sérica de CEA: El CEA es el antígeno carcinoembrionario una elevación en este marcador sérico es indicio de mal pronóstico.

Elevación sérica del CA 19-9: El CA 19-9 es el antígeno carbohidratado 19-9. La elevación de este marcador tumoral está estrechamente relacionada con los tumores gastrointestinales, especialmente el carcinoma de páncreas

Marcadores tisulares: Un gran número de marcadores han sido evaluados como factor con valor pronóstico y predictivo. Entre ellos se encuentra la timidilato sintetasa, MSI, uPA/PAI-1 (urokinasa activador del plasminogeno/inhibidor del activador del plasminógeno 1) y mutaciones en ras y p53. Ninguno de ellos ha sido

recomendado, debido a que no hay evidencia científica que demuestre su significancia, solo se ha evidenciado que k-RAS wt está asociado con un beneficio de la terapia Anti-EGFR (cetuximab y panitumumab) (Segnan et al., 2005; Sturgeon et al., 2008; "World Journal of Methodology-Baishideng Publishing).

1.9 QUIMIOTERAPIA

Los medicamentos quimioterapéuticos se pueden dividir en varios grupos basándose en factores tales como su mecanismo de acción, su estructura química y su relación con otros medicamentos. Algunos medicamentos actúan en más de una forma, por lo que pueden pertenecer a más de un grupo.

Es importante saber el mecanismo de acción de un medicamento para predecir sus efectos secundarios. Esto ayuda a decidir qué medicamentos pueden funcionar bien en combinación. Si se va a usar más de un medicamento, esta información también les ayuda a planear exactamente cuándo se debe administrar cada medicamento (el orden y la frecuencia) (American college of radiology, 2007).

1.9.1. Agentes alquilantes

Estos dañan directamente el ADN evitando la reproducción de las células cancerosas. Estos agentes no son específicos de la fase y se usan para tratar muchas clases diferentes de cánceres, incluso la leucemia, el linfoma, la enfermedad de Hodgkin, el mieloma múltiple y el sarcoma, al igual que cánceres de pulmón, de mama y de ovarios.

A largo plazo pueden causar daños a la médula ósea originando leucemias. El riesgo de leucemia después de la administración de agentes alquilantes es el mayor aproximadamente de 5 a 10 años después del tratamiento y depende de la dosis.

Existen diferentes clases de agentes alquilantes, entre ellos:

- Mostazas nitrogenadas: como mecloretamina (mostaza nitrogenada), clorambucil, ciclofosfamida (Cytosan®), ifosfamida y melfalán.
- Nitrosoureas: que incluyen estreptozocina, carmustina (BCNU) y lomustina.
- Alquil sulfonatos: busulfan.
- Triazinas: dacarbazina (DTIC) y temozolomida (Temodar®).
- Etileniminas: tiotepa y altretamina (hexametilmelamina).

Los medicamentos con platino (cisplatino, carboplatino y oxaliplatino) algunas veces se agrupan con los agentes alquilantes porque destruyen las células de manera similar. Estos medicamentos tienen menos probabilidades de causar leucemia en el futuro que los agentes alquilantes.

1.9.2. Antimetabolitos

Los antimetabolitos son una clase de medicamentos que interfieren con el crecimiento del ADN y del ARN al sustituir los elementos fundamentales de estas moléculas. Estos agentes dañan las células durante la fase S. Se usan comúnmente para tratar leucemia, cáncer de mama, de ovario y del tracto intestinal.

Algunos ejemplos de antimetabolitos incluyen:

- 5-fluorouracilo (5-FU).
- 6-mercaptopurina (6-MP).
- Capecitabina (Xeloda®).
- Cladribina.
- Clofarabina.
- Citarabina (Ara-C®).
- Floxiridina.
- Fludarabina.
- Gemcitabina (Gemzar®).

- Hidroxiurea.
- Metotrexato.
- Pemetrexed (Alimta®).
- Pentostatin.
- Tioguanina.

1.9.3. Antibióticos contra el cáncer

1.9.3.1. Antraciclinas

Las antraciclinas interfieren con las enzimas involucradas en la replicación de ADN. Estos medicamentos ejercen su acción en todas las fases del ciclo celular y se usan ampliamente para tratar varios tipos de cáncer. Una consideración importante que se debe tomar en cuenta en la administración de estos medicamentos es que pueden dañar permanentemente el corazón si se administran en altas dosis.

Algunos ejemplos de antraciclinas incluyen:

- Daunorubicina.
- Doxorubicina (Adriamycin®).
- Epirubicina.
- Idarubicina.

1.9.3.2 Antibióticos contra el cáncer que no son antraciclinas

- Actinomicina D.
- Bleomicina.
- Mitomicina-C.

La mitoxantrona es un antibiótico contra el cáncer que es similar a la doxorubicina en muchos aspectos, incluso en su potencial para causar daños al corazón. Este

medicamento también actúa como inhibidor de la topoisomerasa II, y puede ocasionar leucemia relacionada con el tratamiento. La mitoxantrona se usa para tratar cáncer de próstata, cáncer de mama, linfoma y leucemia.

1.9.4. Inhibidores de la topoisomerasa

Estos medicamentos interfieren con las enzimas topoisomerasas, que ayudan a separar las hebras de ADN para que se puedan copiar. Se usan para tratar leucemias, así como cáncer de pulmón, de ovario, gastrointestinal y de otro tipo.

Los ejemplos de inhibidores de la topoisomerasa I son el topotecan e irinotecán (CPT-11).

Por otro lado, los ejemplos de inhibidores de la topoisomerasa II son etopósido (VP-16) y tenipósido. La mitoxantrona también inhibe la topoisomerasa II.

El tratamiento con inhibidores de la topoisomerasa II aumenta el riesgo de un segundo cáncer, la leucemia mieloide aguda (AML). Con este tipo de medicamento, una leucemia secundaria se puede observar tan pronto como 2 a 3 años después de que se administra el medicamento.

1.9.5. Inhibidores de la mitosis

Son de origen natural, generalmente alcaloides u otros productos, pueden detener la mitosis o evitar que las enzimas sinteticen las proteínas necesarias para la reproducción de las células.

Estos medicamentos ejercen su acción durante la fase M del ciclo celular, pero pueden dañar las células en todas las fases, y se utilizan para tratar muchos tipos de cáncer como cáncer de mama, de pulmón, mielomas, linfomas y leucemias. Estos medicamentos pueden causar daños en los nervios periféricos, este efecto secundario limita la dosis a utilizar.

Los ejemplos de inhibidores de la mitosis incluyen:

- Taxenos: paclitaxel (Taxol®) y docetaxel (Taxotere®).
- Epotilones: ixabepilone (Ixempra®).
- Los alcaloides de la vinca: vinblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®) y vinorelbina (Navelbine®).
- Estramustina (Emcyt®).
- Corticoesteroides.

Los esteroides son hormonas naturales y medicamentos similares a las hormonas que son útiles en el tratamiento de algunos tipos de cáncer (linfoma, leucemias y mieloma múltiple), así como de otras enfermedades. Cuando estos medicamentos se usan para destruir células cancerosas o disminuir su crecimiento, se consideran medicamentos quimioterapéuticos.

Los ejemplos incluyen prednisona, metilprednisolona (Solumedrol®) y dexametasona (Decadron®).

1.9.6. Otros medicamentos quimioterapéuticos

Algunos medicamentos quimioterapéuticos ejercen su acción de manera ligeramente diferente y no se pueden clasificar bien en ninguna de las otras categorías.

Los ejemplos de estos medicamentos incluyen L-asparaginasa, que es una enzima, y el inhibidor del proteosoma bortezomib (Velcade®).

1.10. MEDICAMENTOS NO QUIMIOTERAPÉUTICOS CONTRA EL CÁNCER

Se usan otros medicamentos y tratamientos biológicos para tratar el cáncer, pero usualmente no se consideran quimioterapéuticos. Mientras los medicamentos quimioterapéuticos aprovechan el hecho de que las células cancerosas se dividen rápidamente, estos otros medicamentos se dirigen hacia otras propiedades que

pueden diferenciar las células cancerosas de las normales. Con frecuencia tienen menos efectos secundarios que los comúnmente causados por los medicamentos quimioterapéuticos porque ejercen su acción principalmente en las células cancerosas, no en las células sanas normales. Muchos de estos medicamentos se usan junto con quimioterapia (Gasparini, Longo, Torino, & Morabito, 2005).

1.10.1. Terapias dirigidas

A medida que se sabe más sobre el funcionamiento interno de las células cancerosas, se han creado nuevos medicamentos que inhiben las células cancerosas más específicamente que los medicamentos quimioterapéuticos tradicionales. La mayoría de ellos ataca las células con mutaciones en ciertos genes, o que expresan demasiadas copias de un gen en particular (amplificaciones). Estos medicamentos se pueden usar como parte del tratamiento principal o después del tratamiento para mantener la remisión o reducir la probabilidad de recurrencia.

Los ejemplos de terapias dirigidas incluyen imatinib (Gleevec®), gefitinib (Iressa®), sunitinib (Sutent®) y bortezomib (Velcade®).

1.10.2. Agentes de diferenciación

Estos medicamentos actúan sobre las células cancerosas haciéndolas madurar como células normales. Los ejemplos incluyen los retinoides, tretinoína (ATRA o Atralin®) y bexaroteno (Targretin®), así como el trióxido de arsénico (Arsenox®).

1.10.3. Terapia hormonal

Los medicamentos que pertenecen a esta categoría son hormonas sexuales, o medicamentos similares a hormonas, que cambian la acción o la producción de hormonas femeninas o masculinas. Se usan para disminuir el crecimiento del cáncer de mama, próstata y endometrial (uterino), que normalmente crecen en respuesta a las hormonas naturales del cuerpo (Hooper et al. 2002).

Los ejemplos incluyen:

- Los antiestrogénicos: fulvestrant (Faslodex®), tamoxifeno y toremifeno (Fareston®).
- Inhibidores de la aromatasa: anastrozol (Arimidex®), exemestano (Aromasin®) y letrozol (Femara®).
- Progestinas: acetato de megestrol (Megace®).
- Estrógenos.
- Antiandrógenos: bicalutamida (Casodex®), flutamida (Eulexin®) y nilutamida (Nilandron®). Actualmente se han desarrollado fármacos de nueva generación como es la abiraterona (Zytiga®) y la enzalutamina (Xtandi®).
- Los agonistas de la hormona liberadora de la hormona gonadotropina (GNRH), también conocida como agonistas o análogos de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH): leuprolida (Lupron®) y goserelin (Zoladex®).

1.10.4 Inhibidores de la tirosin quinasa

En este grupo se ubican una serie de moléculas dirigidas a bloquear los cambios químicos que ocurren en el dominio intracelular de los receptores de membrana.

Cuando el receptor de membrana, sea del tipo que sea, recibe la señal desde el exterior, experimenta un cambio en su parte o dominio intracelular que activa una reacción enzimática. En muchos casos, la reacción enzimática asociada al dominio intracelular de los receptores de membrana es del tipo tirosin quinasa.

Por lo general son fármacos orales, habitualmente bien tolerados y que se pueden tomar de continuo, hasta que la enfermedad se haga resistente a ellos.

1.10.4.1. Inhibidores de la tirosin quinasa asociada al EGFR

Este tipo de inhibidores tienen una gran importancia para el tratamiento de tumores epiteliales, en la actualidad se están utilizando en cáncer de pulmón de células no pequeñas.

- Erlotinib (Tarceva®)
- Gefitinib (Iressa®)

1.10.4.2. Inhibidores de la actividad tirosin quinasa de tres tipos de receptores de membrana: PDGFR, c-kit y VEGFR.

Estos fármacos generan una doble inhibición a través de la inhibición del crecimiento celular y de la neoangiogénesis.

- Sunitinib (Sutent®)
- Sorafenib (Nexavar®)
- Axitinib (Inlyta®)
- Pazopanib (Votrien®)

1.10.4.3. Inhibidor de la tirosin quinasa asociada a HER2.

Estos fármacos son eficaces en tumores con sobreexpresión de Her-2, se utilizan básicamente en cáncer de mama

- Lapatinib (Tyverb®)

1.10.5 Inmunoterapia

Son utilizados para estimular el sistema inmunitario de las personas con cáncer, para que pueda reconocer y atacar las células cancerosas. Es una forma de tratamiento relativamente nueva, que debe seguir siendo investigada.

Existen diferentes tipos de inmunoterapia (Penault-Llorca, Etessami, & Bourhis, 2002). Las inmunoterapias activas estimulan el sistema inmunitario del cuerpo para combatir la enfermedad. Las inmunoterapias pasivas no dependen del cuerpo para atacar la enfermedad, sino que utilizan los componentes del sistema inmunitario (como antibióticos) que se sintetizan afuera del cuerpo.

Algunos ejemplos de los diferentes tipos de inmunoterapia:

- Terapia con anticuerpos monoclonales (inmunoterapias pasivas), tal como rituximab (Rituxan®), alemtuzumab (Campath®) y Bevacizumab (Agente antiangiogénico Avastin®).
- Inmunoterapias y adyuvantes no específicos (otras sustancias o células que estimulan la respuesta inmunitaria), como BCG, interleucina-2 (IL-2), interferón-alfa.
- Medicamentos inmunomodulantes, por ejemplo, talidomida y lenalidomida (Revlimid®).
- Vacunas contra el cáncer (inmunoterapias activas específicas). En 2010, la FDA aprobó la primera vacuna para tratar el cáncer (la vacuna Provenge®)

para el cáncer de próstata avanzado); se han estado estudiando otras vacunas para muchos tipos de cáncer.

2. HIPÓTESIS

El proceso de transformación epitelio mesénquimal puede generar células que escapan a los métodos actuales de detección y que pueden ser en gran medida responsables de recaídas y de un aumento resistencia a la quimioterapia. La detección de CTCs bajo proceso EMT puede tener importancia clínica y correlacionar significativamente con los datos del seguimiento del paciente.

Las CTCs en cáncer de mama han sido ampliamente estudiadas en fase IV, se sabe que en estadios metastásicos, la aparición de CTCs, es de mal pronóstico y su aparición durante el tratamiento predice una mala respuesta. En cáncer de mama localmente avanzado, con estadios comprendidos entre 1 y 3, es poco conocido el valor o significancia clínica de las CTCs. El desarrollo de estudios para dilucidar la importancia clínica de su aparición es de gran importancia; incorporar elementos tales como extracciones seriadas y caracterización de las CTCs podrían ayudar a identificar su valor.

En el cáncer de colon en estadio metastásicos la aparición de CTCs está reconocida a nivel clínico, pero la caracterización fenotípica de VEGFR en las CTCs podría tener valor pronóstico en pacientes tratados con bevacizumab, el estudio de la detección y caracterización de CTCs en forma seriada en pacientes bajo tratamiento específico de FOLFOX y Bevacizumab podrían ser un indicador pronóstico y de predicción de respuesta.

3. OBJETIVOS

1. Observar la presencia de CTCs con fenotipo mesenquimal que hayan escapado a los métodos de detección inmunológicos basados en marcadores mesenquimales. En muestras negativas para CTCs con fenotipo mesenquimal. Observar si existe alguna tipo de correlación estadística entre la presencia de estas células y los distintos datos clínicos y experimentales.
2. Desarrollar un modelo in vitro de transformación epitelio mesénquimal partiendo de líneas tumorales de mama, a fin de usarlo como control en el estudio de la plasticidad celular y de las CTCs como consecuencia del proceso EMT. Observar la presencia de receptores y marcadores en los distintos grados de transformación.
3. Diseñar una metodología con la cual detectar CTCs con fenotipo epitelial y mesénquimal a partir de 10 ml de sangre periférica.
4. Determinar el valor pronóstico y factor predictivo de la caracterización fenotípica de las CTCs en pacientes con cáncer de mama bajo tratamiento neoadyuvante.
5. Determinar el valor pronóstico y factor predictivo de la caracterización fenotípica de las CTCs en pacientes con cáncer de colon metastásico bajo terapia combinada de FOLFOX y bevacizumab.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 DETERMINACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES CON FENOTIPO EMT EN MUESTRAS NEGATIVAS PARA CK.

4.1.1 Pacientes.

Desde Marzo del 2009 hasta Setiembre del 2010, 78 pacientes con cáncer de mama, identificadas desde la unidad de cáncer de mama del Hospital Universitario de Jaén y el hospital del Mar de Barcelona (Granada, España) fueron incluidas en este estudio prospectivo.

El criterio de inclusión fue: diagnóstico histológico de estadio II a III C con posibilidad de extraer tejido para realización de estudio de biomarcadores.

El procedimiento Quirúrgico y el uso de terapia dirigida fue acorde a los criterios establecidos por el grupo de oncólogos y cirujanos, todas las pacientes positivas para la expresión de Factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) fueron tratadas con trastuzumab. Los receptores hormonales y expresión de HER2 fueron determinados en tejido de las pacientes a fin de identificar los tres tipos moleculares más importantes en el cáncer de mama (HR+HER2-, HER2+ y HR-HER-). Todos los datos clínicos de estas pacientes fueron cuidadosamente seleccionados e incluidos en la bases de datos. Todas 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.

Las edades de las pacientes estaban comprendidas entre los 26 y 77 años (edad media=55 años).

4.1.2 Líneas celulares de cáncer de mama y fiabilidad del método

Las líneas celulares de cáncer de mama utilizadas en este estudio, fueron obtenidas de la colección europea de cultivos celulares (ECACC, Salisbury, UK). Utilizando las líneas MCF7, SKBR3 y T47D en los experimentos de recuperación de células, analizamos muestras control con 10, 5 y 1 célula. Las células tumorales fueron picadas en 10ml de sangre venosa de voluntarios sanos, cada muestra control fue realizada por triplicado. Los controles fueron procesados de igual forma que las muestras de los pacientes, como se explicará en el siguiente punto.

4.1.3. Procesamiento de la muestra.

El procesamiento de la muestra incluyó varios pasos a seguir:

- 1- Enriquecimiento por gradiente de densidad
- 2- Permeabilización y fijación
- 3- Selección inmunomagnética
- 4- Fijación en portaobjeto por centrifugación
- 5- Tinción cromogénica con Fast Red y Hematoxilina

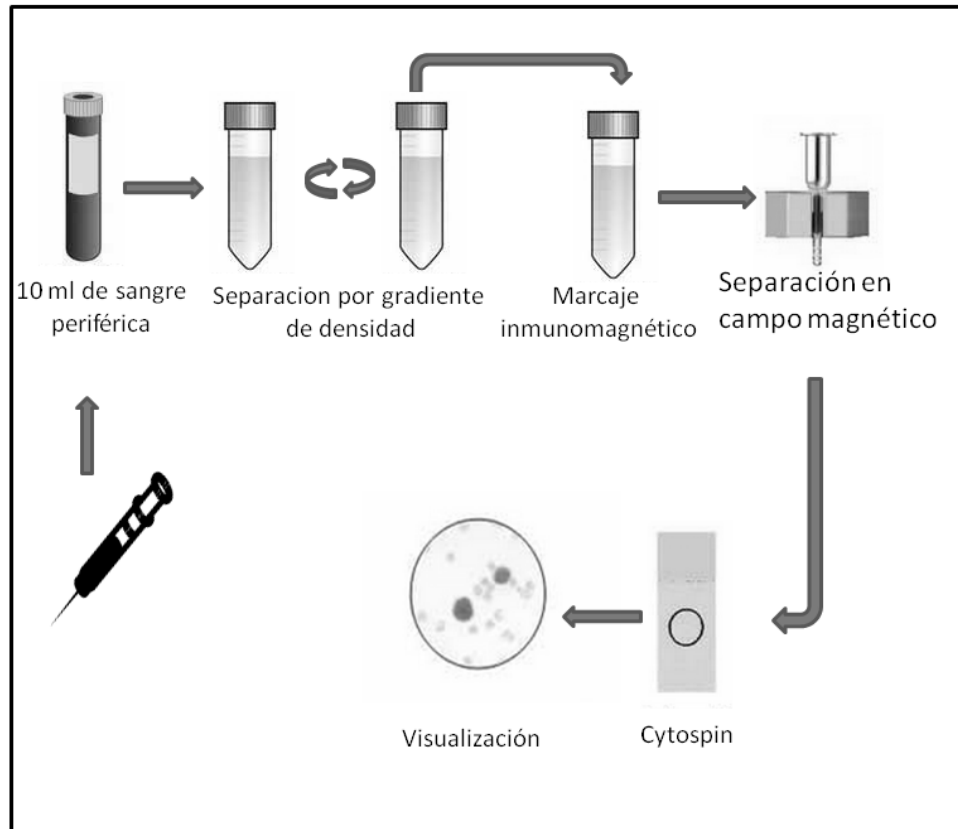


Figura 8. Representación esquemática de la metodología empleada para la detección de CTCs^{CK+}

- Enriquecimiento por gradiente de densidad

10ml de muestra se diluyen con 5 ml de PBS, luego se deposita la mezcla cuidadosamente sobre 10 ml de una solución de 1,119 g/ml de densidad denominada Histopaque®1119(sigma). Se centrifuga a 700 g durante 40 minutos a temperatura ambiente y sin la utilización de freno.

Tras la centrifugación, la muestra queda dividida en tres fases, una fase de glóbulos rojos, de mayor densidad que el Histopaque®, una fase de Histopaque® y una fase de plasma sanguíneo. Entre estas dos últimas fases se encuentran las células blancas de la sangre, conjuntamente con las CTCs. Se recolecta esta capa de células y se las deposita en un tubo para su procesamiento.

- Permeabilización y fijación.

Las células son lavadas con PBS y centrifugadas a 350 g durante 10 minutos, para eliminar el Histopaque® residual del paso anterior. El pellet se resuspende en Buffer de dilución (Miltenyi, Biototech), se agrega el permeabilizante y se deja actuar durante 5 minutos. A continuación se agrega el reactivo fijante Cell Fix (Miltenyi, Biototech) y se deja actuar durante 30 minutos. Por último se centrifuga a 350 g durante 10 minutos y se elimina el sobrenadante.

- Selección inmunomagnética

Las células son resuspendidas en una solución denominada Cell Stain (Miltenyi Biototech) y bloqueadas con reactivo de bloqueo, luego se agrega un anticuerpo anti-citoqueratinas unido a microperlas magnéticas (Miltenyi Biototech). Se incuba 45 minutos y luego se añade un anticuerpo anti-citoqueratina unido al fluorocromo FITC y se deja actuar 15 minutos más. Luego se lava con 5 ml de Cell Stain centrifugando a 350 g durante 10 minutos, se descarta el sobrenadante y se vuelve a incubar con un anticuerpo secundario dirigido contra FITC unido a la enzima alcalin fosfatasa. Luego de una incubación de 15 minutos la muestra es pasada por columnas que están sometidas a un campo magnético, en la cual se retienen las células que tengan unidos anticuerpos con microperlas magnéticas. Para recolectar las células de interés se retira la columna del campo magnético y se hace eluir 500µl de PBS para recuperar finalmente el contenido en un tubo eppendorf de 2 ml.

- Fijación en Portaobjeto

La muestra es colocada en un embudo de citospin y centrifugada a 1800 rpm durante 15 minutos. Al finalizar la centrifugación se extraen los portaobjetos y se dejan secar a temperatura ambiente para su posterior tinción.

- Tinción Cromogénica

Se realiza un círculo, alrededor de las células fijadas, con lápiz hidrofóbico. Los portaobjetos son incubados en PBS durante 15 minutos con el fin de rehidratar la muestra. 100 μ l de solución de Fast Red en buffer bicarbonato es depositado sobre la muestra. Se incuba en cámara húmeda durante 15 minutos a temperatura ambiente, luego se lava con PBS durante 5 minutos en jarra coplin. Finalmente se coloca una gota de hematoxilina sobre el porta, se deja actuar 30 segundos y se lava rápidamente en agua destilada. Luego de seca la muestra se observa al microscopio en busca de células con citoplasma rojo (Fast Red).

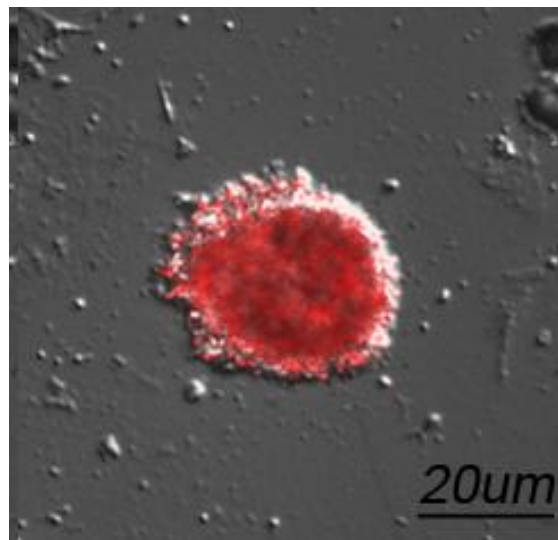


Figura 9. Imagen de microscopía confocal que muestra una CTC obtenida con la metodología empleada en esta tesis

4.1.4. Inducción de EMT por TGFB1 y/o EGF

Se sembraron 2×10^5 células MCF-7, en placas de 6 pocillos, un día antes de iniciar el tratamiento a una confluencia del 40 % aproximadamente. Se estimuló con TGFB1 y EGF a concentraciones de 0, 5, 10 ng/ml y 0 y 20 ng/ml respectivamente. La distribución del tratamiento fue la siguiente:

Pocillo	TGFB1(ng/ml)	EGF(ng/ml)
1	0	0
2	5	0
3	10	0
4	0	20
5	5	20
6	10	20

Tabla 2. Descripción del tratamiento aplicado a cada pocillo, para la inducción de proceso EMT, en células MCF7

4.1.5 Análisis de Western Blot

La extracción de proteínas fue realizada luego de 72 hs de haber sido estimuladas como se explica en el punto anterior. Las células fueron incubadas en 50 μ l de tampón de lisis durante 5 minutos, se centrifugó a 14000 g durante 10 minutos y se recuperó en sobrenadante.

La proteínas se separaron en SDS- PAGE, 50 μ g de proteínas fueron colocados por cada pocillo. Luego de la separación se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue bloqueada con leche y a continuación se incubó con los respectivos anticuerpos primarios y secundarios a fin de identificar las siguientes proteínas: VIM, SLUG, BCL-2, caspasa 9, multi-CK, TGFBR2 y EGFR. La visualización fue realizada por quimioluminiscencia, utilizando luminol y las imágenes registradas por el fotodocumentador fueron analizadas con Image J

4.1.6 Actividad de caspasas 3/7 y 8

La actividad de las caspasas fue medida por quimioluminiscencia utilizando los kits caspase-Glo® 3/7 y caspase-Glo® 8 (Promega, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las células fueron sembradas en placas de 96 y tratadas con las mismas concentraciones de TGFB1y EGFR que se utilizaron en los ensayos anteriores. Tras 72 horas de incubación Los reactivos caspase-Glo® fueron añadidos a cada pocillo e incubados durante 1 hora. Finalmente se realizó la lectura de quimioluminiscencia en luminómetro.

4.1.7 Microscopia confocal

Las imágenes de microscopía confocal fueron obtenidas utilizando un microscopio Zeiss LSM 710. 1×10^4 células MCF7 fueron crecidas en monocapa, en cristales de cultivo (BD Falcon™), fueron estimuladas con TGFB1 y EGF en las concentraciones descritas anteriormente. Luego de 72 horas las células fueron marcadas por inmunofluorescencia utilizando FITC como marcador y DAPI como contratinción nuclear. Las células fueron lavadas con PBS, bloqueadas con 10 % BSA en PBS durante 15 minutos. Después se incubó con el anticuerpo primario a 4 °C durante una noche y luego con el secundario conjugado con el respectivo fluorocromo durante una hora a temperatura ambiente. Al finalizar los portaobjetos fueron lavados con PBS y montados con medio de montaje con DAPI (Vectashield®). Las imágenes fueron tomadas usando objetivos de inmersión de 60X de aumento.

4.1.8 Extracción de RNA y análisis por PCR a tiempo real

Para observar el efecto en la expresión génica de la estimulación con TGFB1 y EGF en EGFR, CK 8, VIM y SLUG. Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos

e incubadas con 0 y 10 ng/ml de TGF beta1 y/o EGF a concentración de 0 y 20 ng/ml. A las 48 horas fue extraído el RNA total utilizando RNA easy Mini Kit (Quiagen). Para la síntesis de cDNA se utilizó el Kit Quanti Tect Reverse Transcription Kit (QIAGEN). Por último la PCR a tiempo real fue realizada usando el kit SYBR Fast qPCR (KAPA biosystems). Para normalizar los valores se utilizó GAPDH. Los valores son expresados como expresión relativa respecto de las muestras control.

4.1.9. Prueba de la cura de la herida

Para medir la migración de las células tumorales inducida para EMT se realizó una herida, levantando una franja de células adheridas a las 24 horas luego de la siembra. Cada 24 horas y durante 72 se fueron tomando imágenes de las heridas realizadas en cada pocillo a diferentes concentraciones de los citados factores de crecimiento. Las visualizaciones se realizaron con un objetivo de 10X de un microscopio Axiovert 40 CFC de Zeiss. (Carl Zeiss, Alemania). Las imágenes fueron adquiridas con AxioCam ICc3 de Zeiss. La determinación del área de la herida fue realizada utilizando Imaje J y fue representada en pixeles.

4.1.10 Datos estadísticos

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Los resultados fueron expresados como la media +/- la desviación estándar. Para observar significancia estadística se aplicaron los test de la t de student y χ^2 . La presencia de una o más CTCs cada 10 ml fue considerada positiva de acuerdo con el límite de detección establecido para nuestro ensayo (María José Serrano, Sánchez-Rovira, Delgado-Rodriguez, & Gaforio, 2009).

4.2 ESTUDIO DE CÁNCER DE MAMA LOCALMENTE AVANZADO BAJO TRATAMIENTO NEOADYUVANTE

4.2.1 Selección de las pacientes

Tabla 3 Características de los pacientes

Nº de pacientes 94

Edad	
Media (rango)	49 (29–70)
Estado Menopáusico N (%)	
Pre	58 (61.7)
Post	36 (38.3)
UN	0 (0)
ER N (%)	
Positivo	68 (72.3)
Negativo	26 (27.7)
UN	0 (0)
PR N (%)	
Positivo	56 (59.6)
Negativo	38 (40.4)
UN	0 (0)
HER2 N (%)	
Positivo	21 (22.3)
Negativo	73 (77.7)
UN	0 (0)
Grado histológico N (%)	
1	23 (24.5)
2	41 (43.6)
3	14 (14.9)
UN	16 (17)
Respuesta Clínica a 12 semanas	
PD	2 (2.1)
ED	9 (9.6)
PR	45 (47.9)
CR	22 (23.4)
UN	16 (17)

Desde Julio del 2011 hasta Mayo del 2014, 94 pacientes con cáncer de mama, identificadas desde la unidad de cáncer de mama del Hospital San Cecilio (Granada, España) fueron incluidas en este estudio prospectivo.

El criterio de inclusión fue: diagnóstico histológico de estadio I, II y III bajo tratamiento neoadyuvante, con posibilidad de extraer tejido para realización de estudio de biomarcadores. La quimioterapia neoadyuvante consistió en 4 ciclos de doxorubicina ($60\text{mg}/\text{m}^2$) y ciclofosfamida ($60\text{ mg}/\text{m}^2$) cada 2 semanas, filgastim ($5\mu\text{g}/\text{kg}$) en el día 3 al 10 de cada ciclo, luego del cuarto ciclo se administraron 4 ciclos de docetaxel ($100\text{ mg}/\text{m}^2$). En caso de que HER2 estuviese sobreexpresado se administró Trastuzumab ($6\text{ mg}/\text{kg}$) cada 3 semanas durante 10 ciclos.

Tras la cirugía, todas las pacientes positivas para la expresión de receptores hormonales fueron tratadas con tamoxifeno o inhibidores de la aromatasa. Todos los datos clínicos de estas pacientes fueron cuidadosamente seleccionados e incluidos en la bases de datos. 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. Las edades de las pacientes estaban comprendidas entre los 26 y 77 años (edad media=55 años)

4.2.2 Líneas Celulares

Para establecer la sensibilidad y eficacia de la metodología empleada en este estudio hemos utilizado dos 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: MCF7 y T47D.

4.2.3 Análisis realizados sobre las muestras de sangre

Se extrajeron 10 ml de sangre por cada muestra. En ellas se analizó la expresión de citoqueratinas, mediante tinción cromogénica enzimática procesadas como se ha explicado en el punto 2.1.2 sobre las muestras positivas para CK se practicó la determinación de EGFR por marcaje fluorescente.

4.2.4 Análisis realizados sobre las biopsias del tumor primario

La caracterización del tumor primario fue llevada a cabo siguiendo los protocolos de inmunotinción establecidos en el Hospital San Cecilio y fueron llevados a cabo sobre muestras de tejidos parafinados. Se analizaron los siguientes marcadores: RE y RP usando los anticuerpos 6F11 y 312 respectivamente, de acuerdo con la guía de la *Sociedad Americana de Oncología Clínica* (Hammond, Hayes et al. 2010). KI-67 se analizó utilizando el anticuerpo monoclonal de ratón MIB-1 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 (Nococastra Lab, Reino unido); donde cualquier grado de tinción se considera positivo. Estado de HER2 mediante inmunohistoquímica usando 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).

4.2.5. Marcaje Inmunofluorescente

Las muestras consideradas positivas para CTCs^{CK+} fueron seleccionadas para su posterior marcaje. Los portaobjetos son sumergidos en PBS durante 15 minutos a fin de hidratar la preparación. Luego se pinta con lápiz hidrofóbico la periferia de la impronta celular y se incuba durante 30 minutos con solución bloqueante compuesta de PBS, SBF, Bloking Reagent (Miltenyi, Biotech) y suero de la especie del segundo anticuerpo. Se descarta la solución bloqueante y se agregan 100 µl de una solución que contenga el anticuerpo primario en buffer Cell Stain (Miltenyi, Biotech). Se deja incubando durante toda una noche a 4°C en cámara húmeda, a continuación se lava con BPS en jarra coplin y finalmente se incuba con el anticuerpo secundario en buffer Cell Stain a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego se lava en PBS y se monta con solución de montaje compuesta de glicerol. El cubre es sellado con laca de uña y visualizado en microscopio de fluorescencia Zeiss Axiolmge. (Carl Zeiss, Alemania).

4.2.6. Procesamiento de los datos

Los datos clínicos recolectados fueron incorporados a la base de datos, la determinación y caracterización de las CTCs fueron introducidas y comparadas con los datos clínicos al finalizar el estudio con el fin de evitar que el investigador se vea influenciado por los datos de la clínica de los pacientes.

Se realizaron tablas de contingencia a fin de comparar las diferentes variables clínicas respecto de la detección y la caracterización de las CTCs. Las agrupaciones se realizaron bajo estricto razonamiento clínico y estadístico. Se aplicó el χ^2 como test estadístico. Las correlaciones con p-valor menor de 0.05 fueron consideradas significativas.

Se analizó, también, el tiempo supervivencia global y el tiempo de enfermedad libre de progresión respecto de la presencia y caracterización de CTCs. Se generaron tablas de supervivencia y curvas de Kaplan Meier. El test estadístico de contraste fue log-Rank.

4.3 DETERMINACIÓN DE CTCS CON FENOTIPO EPITELIAL Y EMT EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA LOCALMENTE AVANZADO.

4.3.1 Pacientes

Para este estudio se identificaron pacientes con tumor de mama localmente avanzado, estos pacientes son el mismo grupo de mujeres reclutadas en 3.2.1. (n=94).

4.3.2 Procesamiento de las muestras

Las muestras fueron obtenidas bajo consentimiento informado, 10 ml de sangre venosa fueron extraídos en tubos CellSave® (Jansen) por cada paciente. Las muestras fueron enviadas al centro GENYO y procesadas dentro de las 72 hs posteriores a la extracción.

Las muestras fueron enriquecidas por gradiente de densidad, fijadas, permeabilizadas y seleccionadas magnéticamente como se ha explicado en el punto 4.1.3.

El eluido que se obtiene a partir de las columnas cuando son sometidas a un campo magnético es recolectado y guardado refrigerado a 4 °C para su posterior procesamiento.

Las muestra retenida en las columnas, son separadas del campo magnético y recolectadas en tubos eppendorf.

Con ellas se realiza un cytospin, para fijarlas en porta objetos, se coloca 500 µl de muestra en un embudo para cytospin y se centrifuga en 1800 rpm durante 15

minutos. A continuación se realiza la tinción como se ha explicado en el punto 4.1.3.

Con el eluído almacenado a 4 °C se realiza el siguiente procedimiento:

Se lava agregando 10 ml de PBS y centrifugando a 300 g durante 10 minutos, se descarta en sobrenadante y se resuspende en 150 µl de buffer CellStain®, se incuba una hora a temperatura ambiente y en agitación con los anticuerpos: anti-VIM-FITC producido en ratón y anti-EGFR producido en cabra. Luego se realiza otro lavado en PBS, se vuelve a resuspender en Cell Stain y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos: anti-FITC-Microbead y anti-IgG de cabra-Cy3 producido en burro. A continuación la muestra es pasada por la columna, en presencia de un campo magnético, con el fin de retener las células Vimentina positivas. Para finalizar las columnas son separadas del campo magnético y la fracción de células retenida es recuperada en un tubo de 1,5 ml. A continuación se fijan en portaobjeto, centrifugando a 1800 rpm durante diez minutos en cytospin (Heattrik). Por último se monta entre porta y cubre usando medio de montaje con DAPI (vektashied). Se visualiza en microscopio de fluorescencia ZEISS® y se cuenta el número de células positivas para VIM y EGFR.

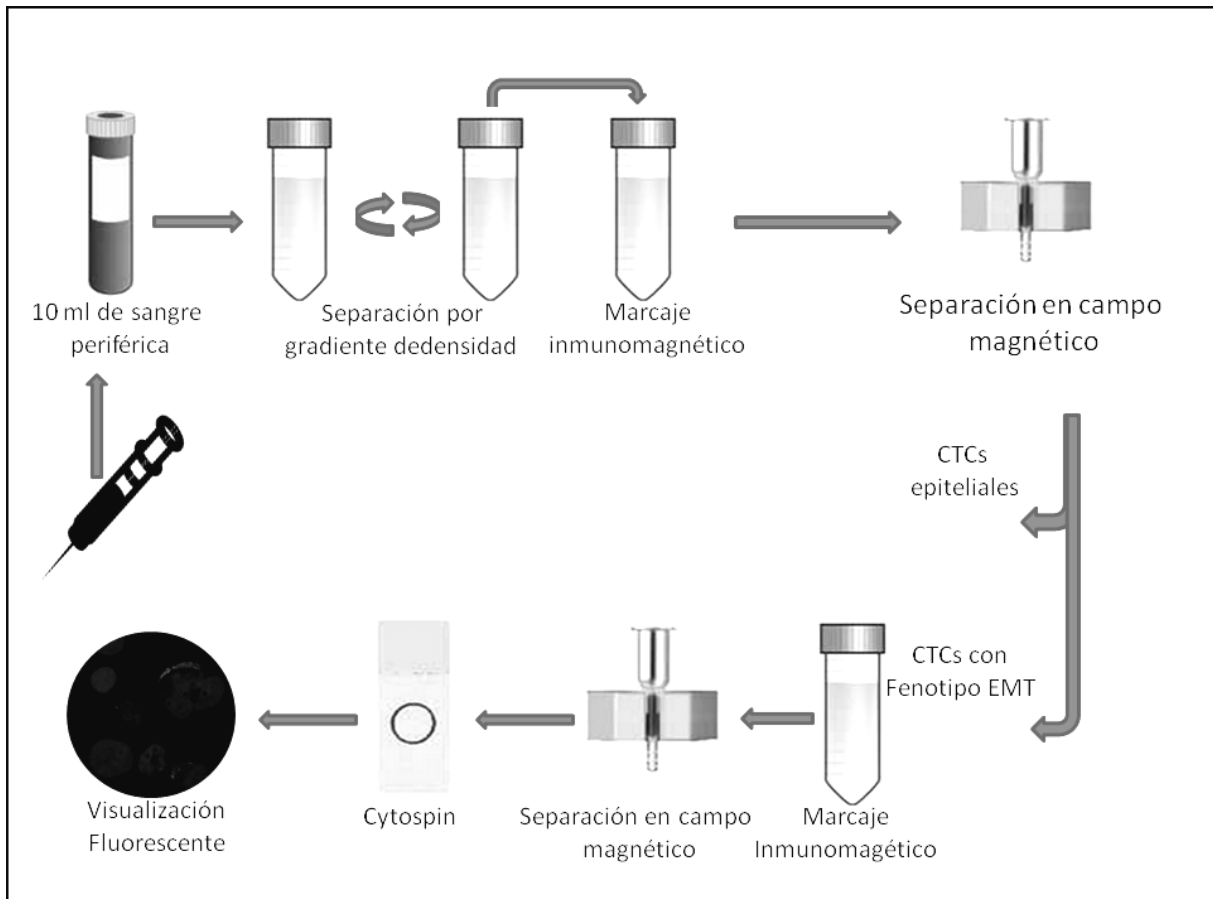


Figura 10. Esquema de la metodología empleada para la detección de CTCs^{CK-VIM+EGFR+}

4.3.3 FICTION

FICTION es una técnica de citogenética clásica que combina el análisis fenotípico y genético de las células de interés. En el presente trabajo se ha realizado una técnica de hibridación fluorescente in situ sobre las células detectadas en pasos anteriores. Esta técnica se basa en la formación, bajo determinadas condiciones físicas, se generan uniones específicas entre sondas marcadas fluorescentemente y secuencias complementarias del DNA celular.

Para el FISH utilizamos la tres sondas HER2/TOPO2/CEP17 (Kreatech, Durham, NC, USA) que marca en rojo el HER2, en verde la TOPO-2 α y en celeste el centrómero 17.

El procedimiento de marcaje se realiza de la siguiente manera: Colocar

previamente los portaobjetos que contienen las muestras en PBS por no menos de 5 minutos, luego se lava a 75°C durante 2 minutos en 2xSSC al 0,3% de IGPack, en jarra coplin. Se deshidratan las muestras en concentraciones crecientes de etanol: 70%, 3min; 80%, 3min; 100%, 3min. A continuación se agregan 7ul de sonda, se coloca un cubreobjeto y se sella con Fixogum. Luego en un thermobrite® se desnaturaliza a 80°C durante 5 minutos y se incuba, a continuación, a 37°C durante 14Hs con el fin de unir las sondas al DNA. A continuación se retira el cubre y se hidrata la muestra en PBS, se lava la muestra en Buffer de lavado post hibridación (Máster Diagnóstica) a 75 grados durante 2 minutos, se enjuaga la muestra en agua destilada durante 15 segundos y se monta con DAPI entre porta y cubre. Se refrigera a 4 °C durante 20 minutos. Por último la muestra es observada en microscopio confocal (ZEISS).

4.3.4. Determinación de EGFR en muestras parafinadas de tejido tumoral de mama

Las muestras fueron extraídas durante la cirugía, luego del tratamiento adyuvante, se realizaron bloques de parafina y se remitieron al centro GENYO.

Los bloques de parafina fueron cortados por micrótomos y fijados en portaobjeto cubierto de una fina película de polilisina. A continuación se llevó a cabo una serie de procedimientos que se explican a continuación:

- Desparafinado
- Desenmascaramiento de antígenos
- Marcaje inmunofluorescente

Desparafinado

El desparafinado se realiza utilizando xilol para disolver la parafina. Se coloca la muestra de en xilol durante 5 minutos en jarra coplin, se repite la operación dos

veces más luego se coloca dos veces durante 5 minutos en etanol al 100%, 2 veces en etanol al 96% y 2 veces en etanol al 70% una vez, 5 minutos en agua destilada y por ultimo en PBS hasta su posterior procesamiento.

Desenmascaramiento de antígenos

Para el desenmascaramiento de los antígenos presentes en las proteínas de la muestra, es necesario hervir durante 10 minutos la muestra en buffer Tris/HCl 0.5M pH 10. La muestra sumergida en el buffer es introducida al el microondas y calentada a 600W. A continuación se espera 20 minutos.

Marcaje inmunofluorescente

Las muestras son colocadas en PBS previamente a su marcaje. Para realizar el marcaje las muestras son bloqueadas con suero de la especie del anticuerpo secundario. En este caso se bloquea con suero de burro al 10% en Buffer Cell Stain. Se deja incubar a temperatura ambiente durante durante 15 minutos. Luego se descarta el liquido bloqueante y sin lavar se agrega el anticuerpo primario anti-EGFR producido en cabra. La muestra se deja incubando durante la noche a 4°C. Al día siguiente la muestra se lava 3 veces durante 5 minutos en PBS. Finalizados los lavados, la muestra es incubada con el anticuerpo secundario anti-IgG de cabra-FITC producido en burro, se deja incubar durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente se realizan tres lavados de 5 minutos en PBS y se monta con medio de montaje con DAPI, para la tinción nuclear. Por último las muestras fueron observadas en microscopio de epifluorescencia Zeiss.

Las muestras fueron observadas y clasificadas respecto de la expresión de EGFR. Las muestras con mayor expresión fueron consideradas (++), las de expresión baja (+) y las muestras que no tenían expresión se clasificaron como negativas (-).

4.4 ESTUDIO DE CÁNCER DE COLON METASTÁSICO, BAJO TRATAMIENTO COMBINADO CON FOLFOX Y BEVACIZUMAB.

4.4.1 Selección de las pacientes

Desde Julio del 2011 hasta Diciembre del 2014, se reclutaron pacientes con cáncer de colon metastásico; diagnosticados y tratados en la Unidad de Oncología del Hospital San Cecilio (Granada, España).

El criterio de inclusión fue: diagnóstico histológico de estadio IV con determinación de mutación K-RAS y bajo tratamiento combinado de FOLFOX y Bevacizumab. Todos los pacientes recibieron quimioterapia administrada por perfusión intravenosa de Oxaliplatino (85 mg/m^2 , en día 1), Acido Folínico ($200 \text{ mg/m}^2/\text{día}$, en día 1 y 2), Fluorouracilo ($400 \text{ mg/m}^2/\text{día}$, en día 1 y 2) y fluorouracilo de 22 hs ($600 \text{ mg/m}^2/\text{día}$). La dosis de Avastin (Bevacizumab) es de 5 mg/kg o 10 mg/kg . Los ciclos se repiten hasta progresión de la enfermedad o hasta toxicidad inaceptable.

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.

Las edades de las pacientes estaban comprendidas entre los 31 y 75 años (edad media=58 años).

Tabla 4. Características de los pacientes

Nº de pacientes 64

Edad	
Media (rango)	58 (31–75)
Sexo N (%)	
Hombre	39 (60.9)
Mujer	25 (39.1)
ND	0 (0)
Invasión vascular N (%)	
Positivo	8 (12.5)
Negativo	26 (40.6)
ND	30 (46.9)
Invasión linfática N (%)	
Positiva	1 (1.6)
Negativa	33 (51.6)
ND	30(46.8)
Invasión perineural N (%)	
Positiva	9 (14.1)
Negativa	25 (39.1)
ND	30 (46.8)
Grado histológico del Tumor N (%)	
I	5 (7.8)
II	26 (40.6)
III	5 (7.8)
ND	28 (43.7)
Clinical response at 12 weeks N (%)	
PD	11 (2.1)
ED	14 (9.6)
PR	24 (47.9)
CR	5 (23.4)
UN	10 (17)
K-ras N (%)	
Mut	24 (37.5)
Wt	32 (50)
UN	8 (12.5)

4.4.2 Líneas Celulares

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

Las líneas celulares que se utilizaron en la investigación fueron HT29 y HCT116

4.4.3 Toma de muestras, aislamiento y detección de CTCs

A cada paciente se le extrajeron 10 ml de sangre por cada muestra. Se obtuvieron muestras antes de iniciar el tratamiento (Basal), a las 6 semanas, a las 12 semanas y a las 24 semanas de haberse iniciado. En caso de progresión, toxicidad o muerte del paciente, se suspendió la obtención de muestras.

El aislamiento y detección de las CTCs mediante la expresión de citoqueratinas, mediante tinción cromogénica enzimática procesadas como se ha explicado en el punto 2.1.2 sobre las muestras positivas para CK se practicó la determinación de VEGFR2 por marcaje fluorescente.

4.4.4 Marcaje Inmunofluorescente

Las muestras consideradas positivas para CTCs con expresión de CK fueron seleccionadas para su posterior caracterización con VEGFR2.

La metodología empleada fue la siguiente:

Los portaobjetos fueron sumergidos en PBS durante 15 minutos a fin de hidratar la preparación. Luego se pintó con lápiz hidrofóbico la periferia de la impronta celular, y se incubó durante 30 minutos con solución bloqueante compuesta de PBS, SBF, blocking reagent (Miltenyi) y suero de burro (Sigma). Se descartó la solución bloqueante y se agregó 100 µl de una solución que contenga el anticuerpo primario

anti VEGFR, generado en cabra, en una solución 1/100 con buffer Cell Stain (Miltenyi) y se dejó incubando durante toda una noche a 4°C en cámara húmeda. A continuación se lavó con PBS en jarra coplin y finalmente se incubó con el anticuerpo secundario Alexa 350 Anti IgG de Cabra, generado en burro, en una solución 1/500 en buffer Cell Stain, a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego se lava en BPS y se monta con solución de montaje compuesta de glicerol. El cubre objeto es sellado con laca de uña y visualizado en microscopio de fluorescencia Zeiss AxioImage. (Carl Zeiss, Alemania).

4.4.5. Identificación de proteínas y calidad de Anticuerpos por Western Blot

Las células fueron incubadas en 50 µl de tampón de lisis durante 5 minutos, se centrifugó a 14000 g durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante.

La cuantificación de proteínas se realizó mediante la incubación de 2 horas, a temperatura ambiente, con BCA (ThermoFischer) y posterior lectura en espectrofotómetro a 562 nm de longitud de onda. Conjuntamente se colocaron diluciones de albumina de concentración conocida a fin de obtener una curva, donde se extrapolan los resultados obtenidos en el espectrofotómetro para las muestras, a fin de determinar la concentración proteínica en ellas.

Las proteínas se separaron en SDS-PAGE, 50 µg de proteínas fueron colocados por cada pocillo. Luego de la separación se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue bloqueada con solución de leche descremada al 5 % en PBS/tween 0.5% y a continuación se incubó con los respectivos anticuerpos primarios y secundarios a fin de identificar las siguientes proteínas VEGFR, CK y Beta Actina. La visualización fue realizada por quimioluminiscencia, utilizando luminol y las imágenes registradas por el fotodocumentador fueron analizadas con Image J.

4.4.6. Procesamiento y análisis de los datos

Los datos clínicos que se consideraron más relevantes para el estudio, fueron incorporados a la base de datos, los resultados de la determinación y caracterización de las CTCs, en las muestras de sangre de los pacientes participantes, fueron introducidas y comparados con los datos clínicos.

A fin de comparar las diferentes variables clínicas respecto de la detección y la caracterización de las CTCs con los principales datos clínicos, se realizaron tablas de contingencia. Las agrupaciones se realizaron bajo estricto razonamiento clínico y estadístico. Se aplicó el χ^2 como test estadístico. Las correlaciones con p menor de 0.05 fueron consideradas significativas.

Se analizó también el tiempo supervivencia global y el tiempo de enfermedad libre de progresión respecto de la presencia y caracterización de CTCs. Se generaron tablas de supervivencia y curvas de Kaplan Meier. El test estadístico de utilizado fue log-Rank.

5. RESULTADOS

5.1 CORRELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE VIMENTINA Y SLUG EN CTCs^{CK low/-} CON LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y PATOLÓGICAS DE LOS PACIENTES

5.1.1 Correlación de la expresión de vimentina y SLUG en CTCs con las características clínicas y patológicas de los pacientes

Las pacientes de este estudio tenían cáncer de mama en estadio temprano y localmente avanzado. Las características clínico-patológicas fueron correlacionadas con la expresión de VIM y SLUG en células negativas o con baja expresión de CK.

Tabla 5. Relación entre las variables clínicas y las detección y caracterización de CTCs con VIM y SLUG

		N (%) VIM+	N (%) VIM-	p(χ^2)	N (%) SLUG+	N (%) SLUG-	p(χ^2)
Edad	≤ 50	8 (33.33)	16 (66.67)	0.270	8 (30.77)	18 (69.23)	0.305
	> 50	10 (23.26)	33 (76.74)		9 (20)	36 (80)	
Histología	Ductal	17 (29.31)	41 (70.69)	0.258	16 (25.81)	46 (74.19)	0.309
	Otras	1(11.11)	8 (88.89)		1 (11.11)	8 (88.89)	
Tamaño del Tumor	≤ 2cm	10 (31.25)	22 (68.75)	0.048*	10 (31.25)	22 (68.75)	0.047*
	> 2-5cm	3 (12)	2 (88)		3 (10.34)	26 (89.66)	
	> 5cm	5 (50)	5 (50)		4 (40)	6 (60)	
Afectación Nodular	N0	17 (29.82)	40 (70.18)	0.182	16 (26.67)	44 (73.33)	0.196
	N +	1 (10)	9 (90)		1 (9.09)	10 (90.91)	

		N (%) VIM+	N (%) VIM-	p(χ^2)	N (%) SLUG+	N (%) SLUG-	p(χ^2)
Grado	I	2(13.33)	13 (86.67)	0.224	2 (13.33)	13 (86.67)	0.361
	II	10 (37.04)	17 (62.96)		9 (32.14)	19 (67.86)	
	III	4(20)	16 (80)		4 (17.39)	19 (82.61)	
Estatus Hormonal	RH-	3 (21.43)	11 (78.57)	0.442	3 (20)	12 (80)	0.490
	RH +	15 (28.30)	38 (71.70)		14 (25)	42 (75)	
Estatus HER2	HER2 -	16 (28.7)	41 (71.93)	0.460	16 (26.23)	45 (73.77)	0.248
	HER2 +	2 (20)	8 (80)		1 (10)	9 (90)	
Estatus P53	P53 -	10 (27.03)	27 (72.97)	0.569	9 (23.68)	29 (76.32)	0.483
	P53 +	3(30)	7(70)		3 (30)	7 (70)	
Ki67	(KI67-)< 14%	7 (28)	18 (72)	0.544	7 (28)	18 (72)	0.377
	(KI67+) \geq 14%	11 (26.19)	31 (73.81)		10 (21.14)	36 (78.26)	

El tamaño tumoral mostró una correlación estadística con CTC VIM + SLUG+ y CK-CTCs ($p= 0.048$ and $p= 0.047$, respectivamente) y no se encontraron diferencias significativas respecto a la edad, histología, estado de los nódulos linfáticos, grado del tumor, expresión de Receptores hormonales, p53 y Ki67.

5.1.2. Correlación de VIM y SLUG en CTCs con baja expresión de CK respecto de la expresión de EGFR, CD133, TOPO2/HER2

Un total de 78 muestras negativas para CTCs positivas para CK fueron procesadas. 11 de las muestras fueron descartadas por observarse excesivo fondo y autofluorescencia que interfería con el análisis. Un total de 67 muestras fueron consideradas para el análisis de VIM. Un total de 18 (26.9%) muestras fueron consideradas positivas para la expresión de VIM. De las 78 muestras iniciales se analizaron 71 muestras para la expresión de SLUG, de los cuales 17 (23.9%) fueron positivos. Todas las muestras positivas para SLUG fueron también positivas para VIM.

Adicionalmente se correlacionó EGFR y TOPO2/HER2 con CTCs positivas para VIM y SLUG, en muestras negativas para la expresión de CTCs^{CK+}, antes de iniciado el tratamiento.

Tabla 6. Relación entre la detección y caracterización de CTCs CK+ con EGFR y TOPO2/HER2 respecto de la detección de CTCs caracterizadas con VIM y SLUG.

Marcadores EMT		VIM+ N (%)	VIM- N (%)	<i>p</i>	SLUG+ N (%)	SLUG- N (%)	<i>P</i>
EGFR	EGFR+	8 (44.5)	10 (55.5)	0.044	8 (42.1)	11 (57.9)	0.030
	EGFR-	9 (18.4)	40 (81.6)		9 (17.3)	43 (82.7)	
TOPO/HER2	TOPO2/HER2+	3 (37.5)	5 (62.5)	0.366	3 (25)	9 (75)	0.592
	TOPO2/HER2-	15 (25.4)	44 (74.6)		14 (23.7)	45 (76.3)	

Se analizaron muestras de 67 pacientes, en las muestras que fueron negativas para la expresión de EGFR se encontraron 9 CTCs (18.4%) VIM+. En las muestras positivas para EGFR 8 fueron positivas para VIM (44.5%) con una significancia de $p=0.044$. Adicionalmente se observó la expresión de de SLUG en las CTCs de 71 pacientes, donde se observaron 9 muestras con CTCs SLUG positivas (17.3%) en muestras negativas para EGFR y 8 muestras fueron positivas para muestras EGFR positivas (42.1%) ($p=0.030$). Cuando SLUG fue positivo para CTCs negativas para CK, también lo fue para VIM en un 94% (17/18). Todas las CTCs VIM negativas también fueron negativas para SLUG. La molécula SLUG se encontraba ubicada mayoritariamente en el citoplasma celular y minoritariamente en el núcleo.

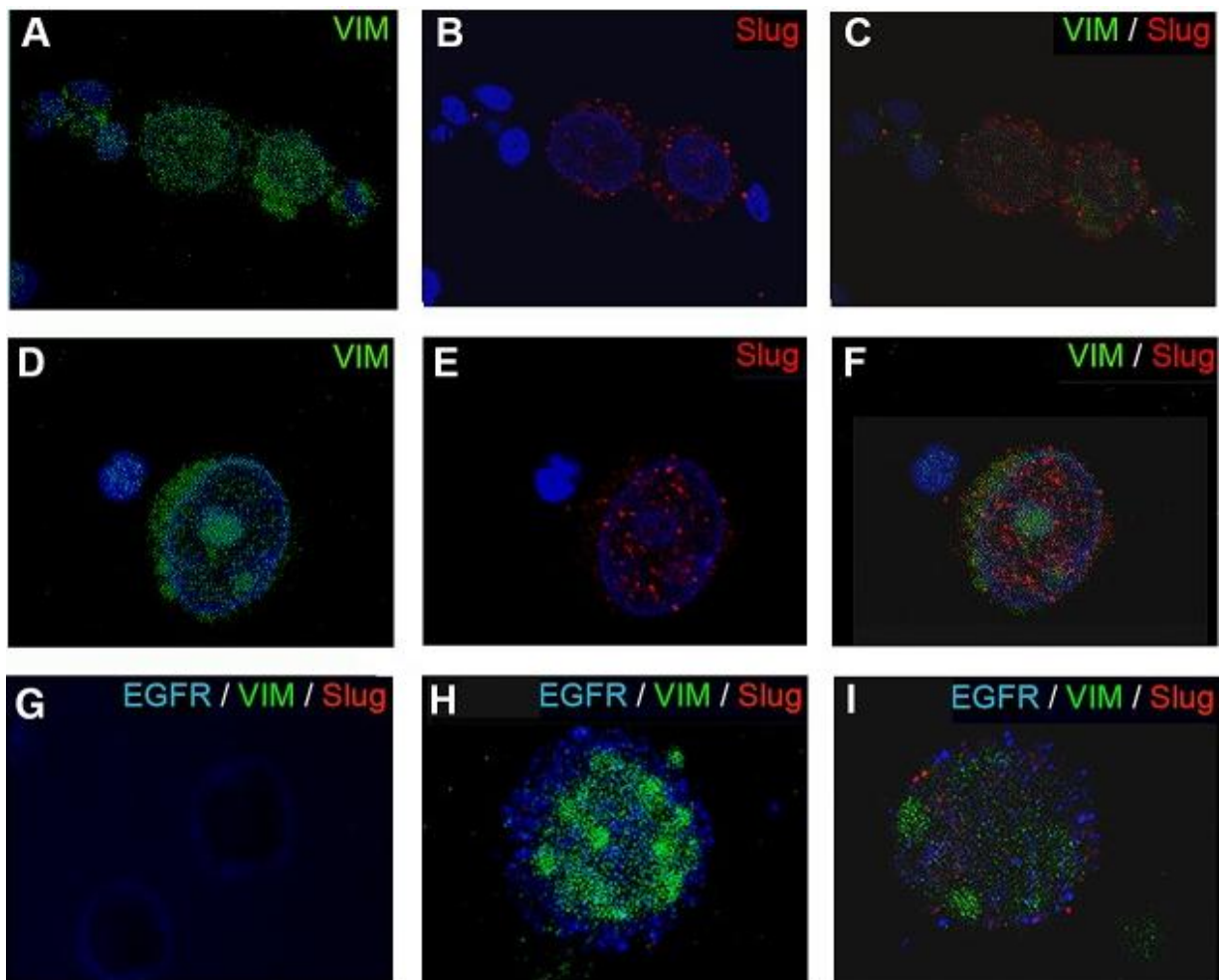


Figura 11. Imágenes de microscopía confocal donde se observan CTCs caracterizadas con VIM, SLUG y EGFR

5.1.3. Modificación de marcadores luego de la inducción del proceso EMT en células MCF7.

Para observar, in vitro, la relación de la expresión de EGFR en CTCs^{CK-} y el proceso EMT desarrollamos un modelo experimental donde las células MCF7 fueron estimuladas con TGFB1 y/o EGF, a diferentes concentraciones, durante 72 hs. En primer lugar analizamos por western blot los cambios en los niveles de expresión de VIM, SLUG, Pan-CK y EGFR, también se observaron los cambios en mediadores de apoptosis, tales como Bcl-2 y pro-caspasa 9

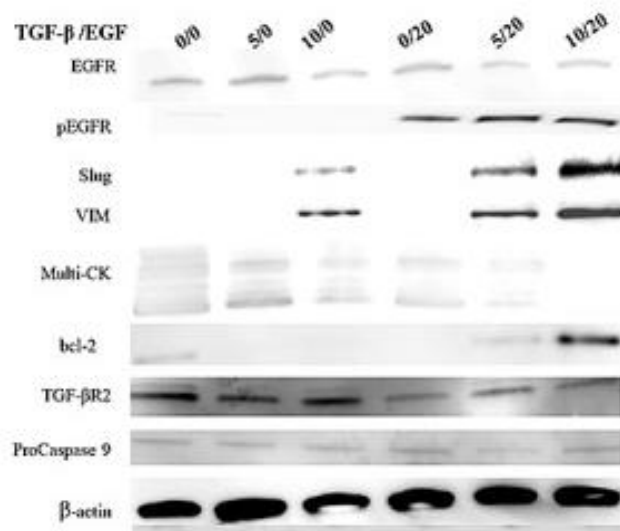


Figura 12. Imagen obtenida a partir del ensayo de Western Blot a fin de detectar concentraciones de algunas proteínas, tras la estimulación de células MCF7 con diferentes concentraciones de TGB1 y EGF

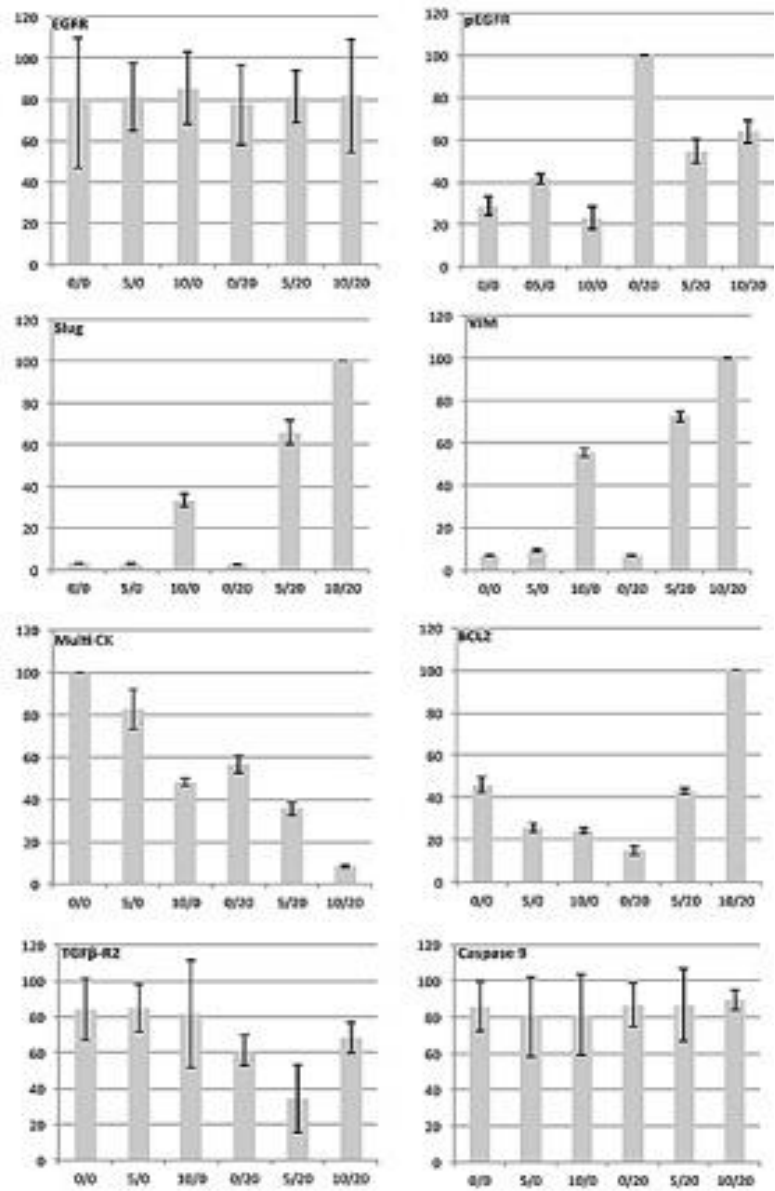


Figura 13. Cuantificación con Image J de las imágenes obtenidas por WB. Con el fin de reflejar las variaciones producidas en las diferentes muestras, se realizó una comparación porcentual, siendo el 100% la muestra de mayor concentración.

Los resultados muestran que TGFβ1/EGF actúan en forma sinérgica para la inducción de EMT y que esta inducción se acentúa mas a mayor concentración de TGFβ1, por otra parte la expresión de EGFR no parece disminuir en forma tan acentuada como en otros marcadores epiteliales tales como pan-CK.

Respecto de marcadores de apoptosis, hemos observado que la estimulación de TGFB1/EGF incrementa los niveles de BCL-2 y respecto de procaspasa 9, no se observan cambios.

La observación de la actividad de caspasas por un método quimioluminiscente mostró que la actividad de caspasa 3/7 y 8 se incrementa luego de la inducción con TGFB1 y decrece significativamente cuando se agrega EGF.

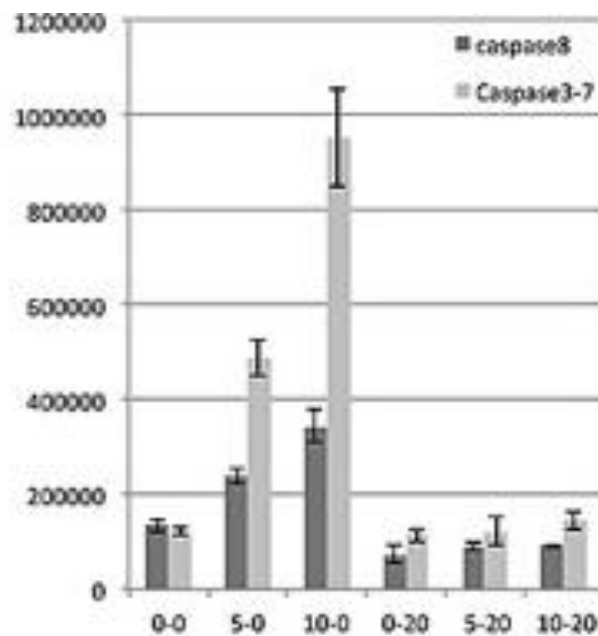


Figura 14. Gráfica comparativa donde se observa los niveles de actividad de caspasas en las células MCF7 tras la estimulación con diferentes concentraciones de TGFB1 y EGF.

Por último, el análisis de las muestras de cultivos confirman los datos obtenidos por western blot. Los cambios morfológicos de las células MCF7 luego del proceso EMT inducido por TGFB1/EGF se vieron reflejados en un alargamiento considerable de las células. La visualización de las muestras con microscopia confocal, mostró que la expresión de VIM y SLUG se vio altamente incrementada, la presencia de CK fue considerablemente disminuida y la detección de EGFR permaneció constante.

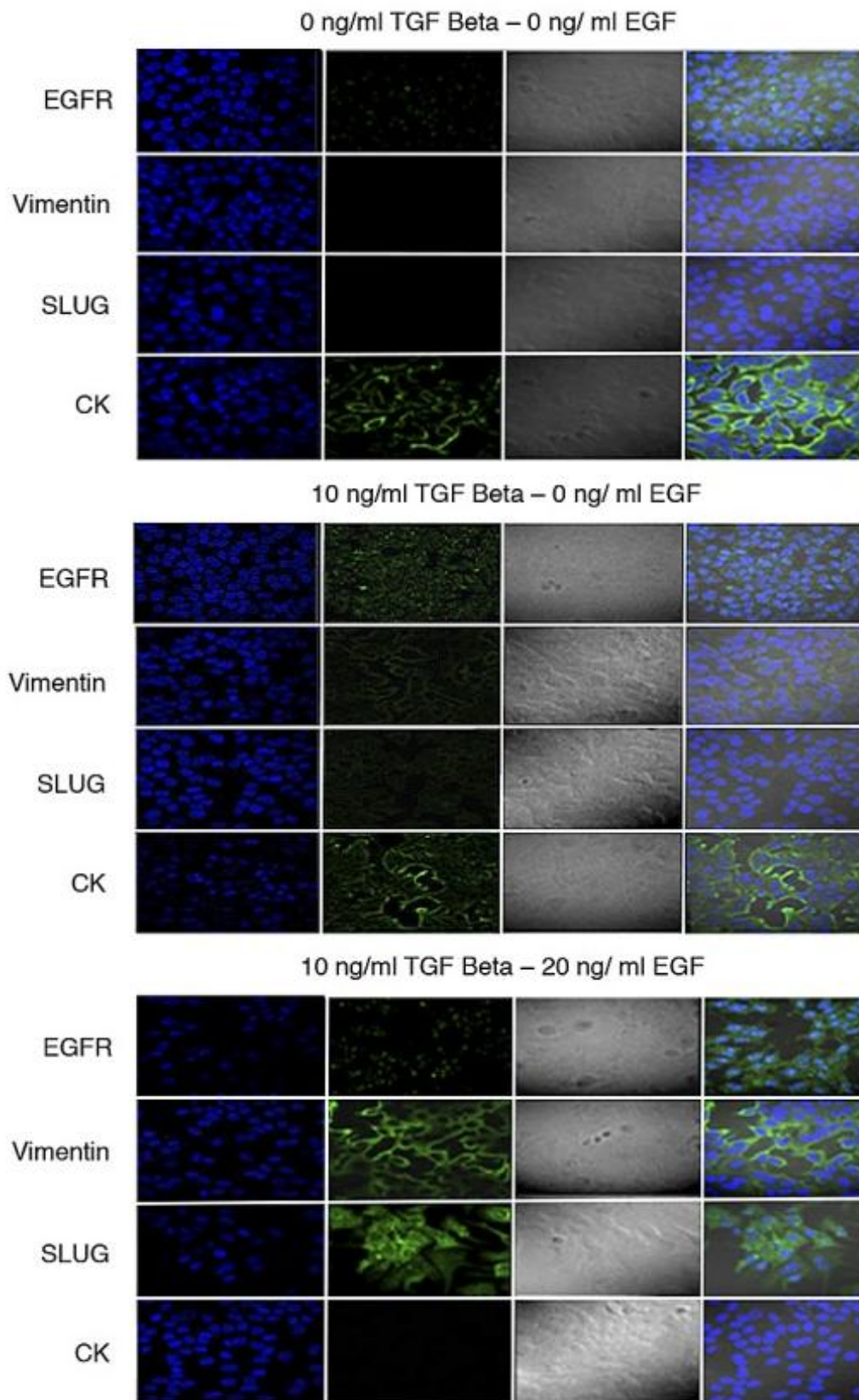


Figura 15. Imágenes de microscopía confocal sobre muestras con marcaje inmunofluorescente de EGFR, VIM (Vimentin), SLUG y CK. Observesé la aparición de células de citoplasma alargado a medida que se estimula con TGFB1 y EGF.

Para validar los datos observados, se realizó un análisis de expresión génica por RT-qPCR. En ellos se observó que los niveles relativos de mRNA de VIM y SLUG se vieron incrementados significativamente, los niveles de CK 8 disminuyeron acentuadamente y los niveles de EGFR disminuyeron levemente, tras el tratamiento con TGFB1/EGF.

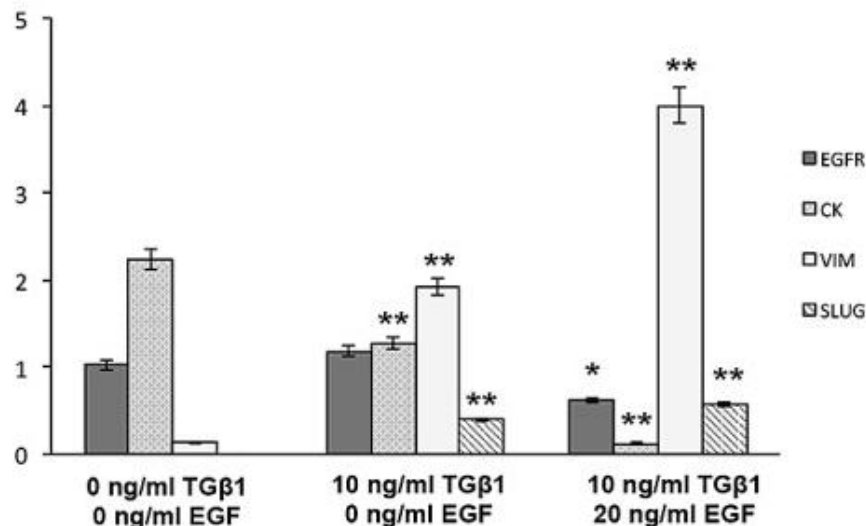


Figura 16. Expresión de mRNA obtenido de muestras que fueron estimuladas con diferentes concentraciones de TGFB1 (TGβ1) y EGF. Los valores corresponden al $\Delta\Delta C_t$ obtenido por Real time PCR

5.1.4. El proceso EMT inducido por TGFB1/EGF promueve la movilidad celular

El proceso EMT generalmente está asociado con la generación de un fenotipo invasivo, con elevada migración celular, el cual es indispensable en el proceso de metástasis. En la prueba de cierre o cura de la herida realizada en cultivos de células MCF7 hemos observado que las células estimuladas poseen mayor movilidad, invaden más rápidamente la herida y en definitiva cierran la herida con mayor eficacia que las células sin inducción de EMT con TGFB1/EGF. Nuevamente se observó sinergismo respecto de la movilidad de las células estimuladas solamente con TGFB1.

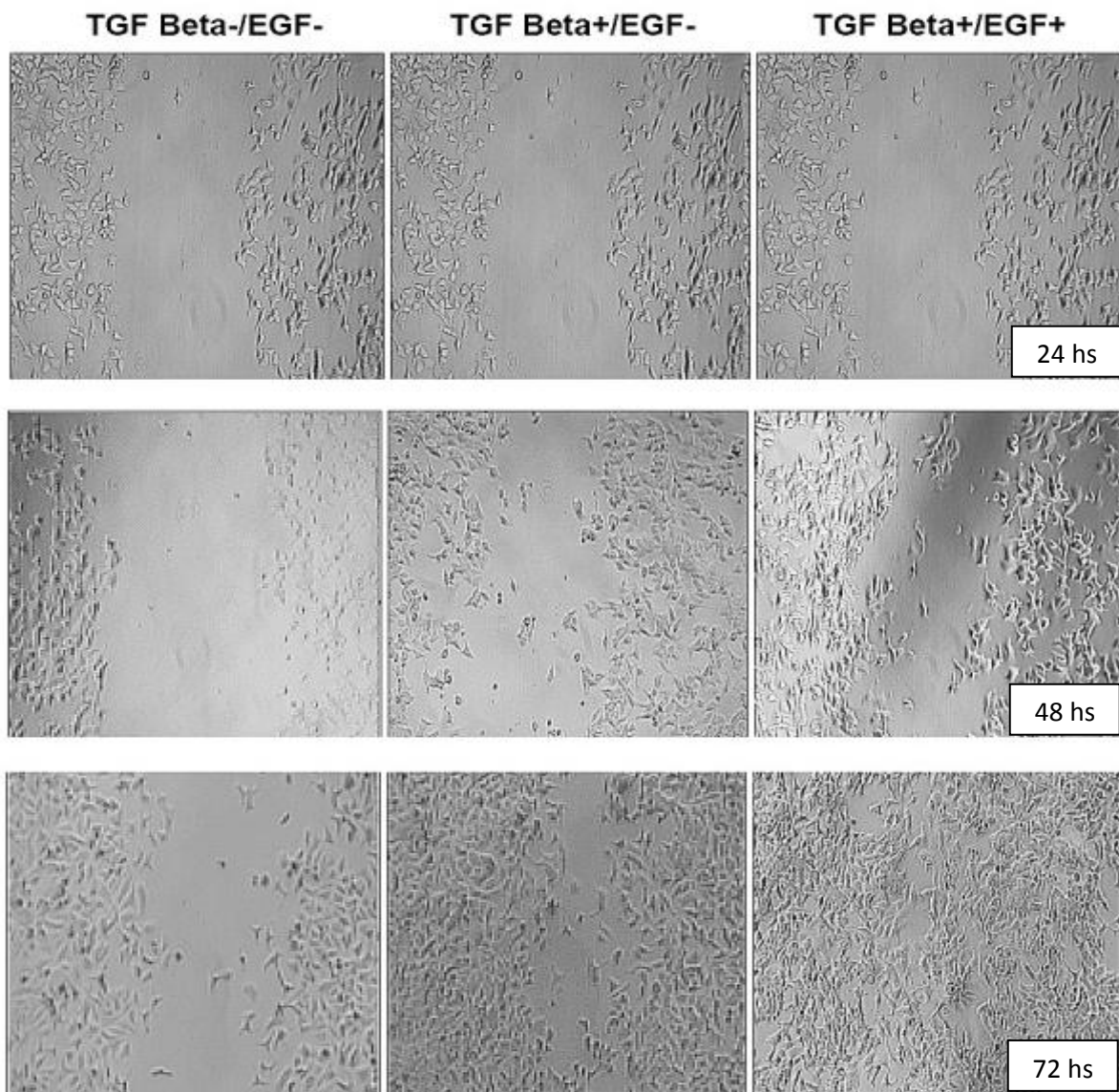


Figura 17. Imágenes de la herida obtenidas por microscopía invertida, donde se puede observar el grado de movilidad celular de las diferentes muestras a 24, 48 y 72 horas

El área de la herida, medida con el programa, procesador de imágenes, Image J demuestra que la invasión se genera más rápidamente, más eficientemente y sinérgicamente con la inducción de TGFB1 y EGF.

5.2 DETECCIÓN DE CTCs EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA LOCALMENTE AVANZADO

5.2.1 Detección y correlación de CTCs

En nuestro estudio se captaron 94 pacientes con cáncer de mama localmente avanzados. Todos los pacientes recibieron quimioterapia como se describirá a continuación, a los pacientes con tumor HER2+ (13.8%) se administró, además, Trastuzumab, en los pacientes con tumor positivo para HRs se administró, además, inhibidores de la aromataasa (44.8%) y tamoxifeno (23.4%) hasta 3 años después de la cirugía.

La correlación que existe entre la detección de CTCs en estadio basal (antes de iniciar el tratamiento) y los principales datos anatomopatológicos del paciente, son mostrados en la siguiente tabla:

Tabla 7. Relación entre las variables clínicas y la detección CTCs^{CK+}

N=86		N		P	N		P	N		P
		(%) Antes del tratamiento	CTC+		(%) Mitad del tratamiento	CTC+		(%) Después del tratamiento	CTC+	
		CTC-	CTC+	PX ²	CTC-	CTC+	PX ²	CTC-	CTC+	PX ²
Edad	≤50	34 (69.4)	15 (30.6)	0.717	31 (67.4)	15 (32.6)	0.116	24 (72.7)	7 (27.3)	0.452
	>50	27 (73)	10 (27)		29 (82.8)	6 (17.2)		23 (85.2)	4 (14.8)	
Estado menopáusico	Pre	35 (68.6)	16 (31.4)	0.570	35 (61.5)	13 (38.5)	0.774	24 (80)	6 (20)	0.835
	Post	26 (74.3)	9 (25.7)		25 (75.8)	8 (24.2)		23 (82.1)	5 (17.9)	

		N		PX ²	N		PX ²	N		P X ²
		(%) Antes del tratamiento	CTC+		(%) Mitad del tratamiento	CTC+		(%) Después tratamiento	CTC+	
Histología	Ductal	55 (73.1)	21 (26.9)	0.401	50 (61.5)	19 (38.5)	0.734	42 (71.4)	11 (28.6)	0.703
	Lobulillar	5 (62.5)	3 (37.5)		7 (87.5)	1 (12.5)		4 (100)	0 (0)	
	Mucinoso	1 (50)	1 (50)		2 (100)	0 (0)		1 (100)	0 (0)	
Estado ganglionar	NO	24 (72.7)	9 (27.3)	0.789	24 (68.6)	11 (31.4)	0.447	18 (78.3)	5 (21.7)	0.522
	≥N1	35 (70)	15 (30)		34 (77.3)	10 (22.7)		26 (81.2)	6 (18.8)	
Grado	I	13 (65)	7 (35)	0.187	15 (71.4)	6 (28.6)	0.724	12 (92.3)	1 (7.7)	0.001
	II	24 (64.8)	13 (35.2)		28 (80)	7 (20)		24 (92.3)	2 (7.7)	
	III	11 (91.7)	1 (8.3)		9 (69.2)	4 (30.8)		1 (20)	5 (80)	
Tamaño del tumor (cm)	<2	8 (66.7)	4 (33.3)	0.575	8 (66.7)	4 (33.3)	0.775	8 (33.3)	4 (33.3)	0.589
	2-5	44 (80)	12 (20)		37 (58.8)	26 (41.2)		37 (71.4)	15 (28.6)	
	>5	12 (60)	8 (40)		8 (50)	8 (50)		12 (60)	8 (40)	

Grado expresión Her2	-	47 (72.3)	18 (27.7)	0.741	45 (71.4)	18 (28.6)	0.032	41 (61.2)	26 (38.8)	0.021
	+	13 (68.4)	6 (31.6)		16 (94.1)	1 (5.9)		15 (100)	0 (0)	
Ki67	<14%	7 (77.8)	2 (22.2)	0.681	8 (88.9)	1 (11.1)	0.345	8 (100)	0 (0)	0.142
	>14%	47 (71.2)	19 (28.8)		47 (74.6)	16 (25.4)		32 (78)	9 (22)	
Clasificación	Luminales A	1 (100)	0 (0)	0.069	12 (75)	4 (25)	0.459	7 (50)	7 (50)	0.002
	Luminales B	33 (75)	11 (25)		22 (54.5)	18 (45.5)		30 (72.7)	12 (27.3)	
	Her2	0 (0)	9 (100)		4 (50)	4 (50)		5 (100)	0 (0)	
	Triple negativo	30 (80)	8 (20)		26 (70)	12 (30)		15 (66.7)	8 (33.3)	
Estatus p53	-	12 (80)	3 (20)	0.398	15 (93.7)	1 (6.3)	0.126	9 (81.8)	2 (18.2)	0.547
	+	19 (67.9)	9 (32.1)		18 (75)	6 (25)		13 (86.7)	2 (13.3)	
Receptor de estrógenos	-	18 (78.3)	6 (21.7)	0.647	18 (81.8)	4 (18.2)	0.386	1 (25)	3 (75)	0.816
	+	42 (70)	18 (30)		42 (72.4)	16 (27.6)		35 (68.8)	8	
Receptor de Progesterona	-	26 (74.3)	9 (25.7)	0.624	27 (84.4)	5 (15.6)	0.114	16 (76.2)	5 (23.8)	0.510
	+	34 (69.4)	15 (30.6)		33 (68.7)	15 (31.3)		30 (83.3)	6 (16.7)	

Se ha observado que 25 (29.1%), de un total de 86 pacientes, tenían presencia de CTCs^{CK+}, en sus muestras de sangre periférica, en estadio basal. La media de CTCs encontradas fue 24 (rango=1-62) CTCs en 10ml de sangre. Luego de 4 ciclos de tratamiento neoadyuvante, se identificaron 21 (25.9% n=81) muestras con CTCs. Al final del tratamiento. Se identificaron 11 muestras positivas para CTCs de un total de 58 pacientes que llegaron al final del estudio (19%).

5.2.2 Expresión de EGFR en CTCs

Para la determinación de CTCs caracterizadas fenotípicamente por fluorescencia, fue necesario en primer lugar la realización de controles con el fin de poner a punto la metodología y ajustar los parámetros de microscopía a fin de poder discernir fehacientemente entre células negativas y positivas para la expresión de CK y EGFR.

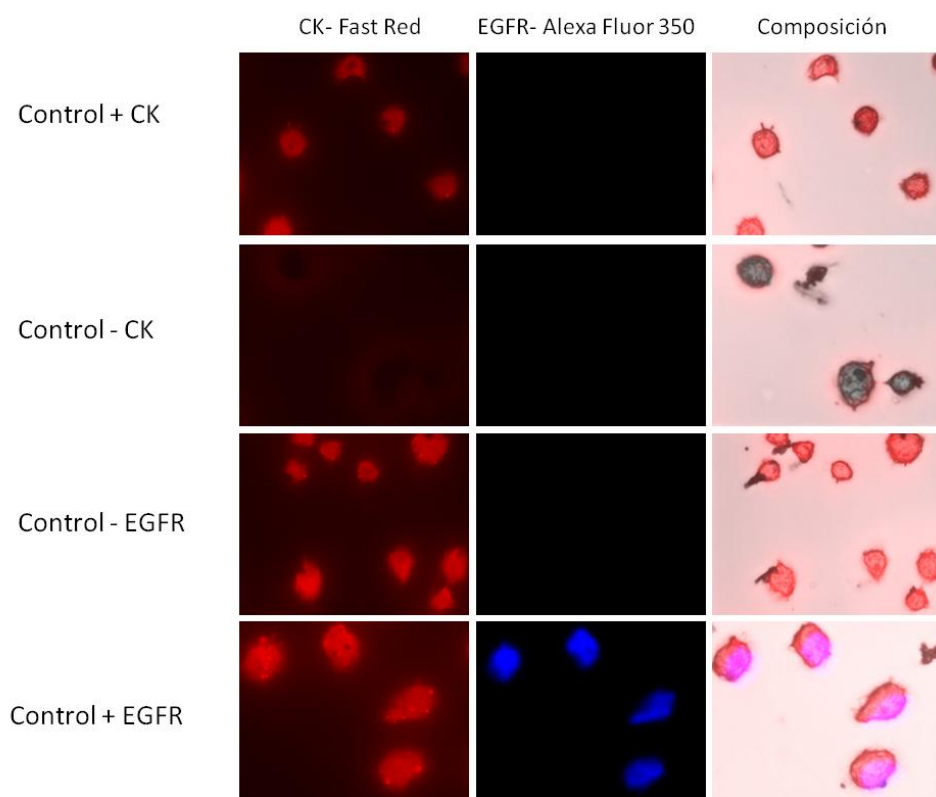


Figura 18. Imágenes de microscopía de Epifluorescencia, donde se observan los controles realizados en las técnicas de inmunofluorescencia.

La tinción doble inmunofluorescente de CK y EGFR revela que 16 de 25 pacientes (64%) tenían CTCs^{CK+EGFR+} en muestras basales. La media de CTCs^{CK+EGFR+} fue de 2 células de media, por muestra (rango=0-8). Las muestras presentaron heterogeneidad para la expresión de EGFR. EGFR se expresó en un promedio del 40 % de las CTCs encontradas. En las muestras clasificadas como EGFR positivas coexistían CTCs^{CK+EGFR+} y CTCs^{CK+EGFR-}.

Cuando analizamos la evolución de las CTC durante el tratamiento, observamos que predominan muestras con CTCs^{CK+EGFR+} en estadios basales, luego de 4 ciclos de la quimioterapia solo el 43% de las muestras que inicialmente presentaban CTCs^{CK+EGFR+} lo seguían haciendo; y al final del tratamiento el 10.7% de ellas presentó CTCs^{CK+EGFR+}.

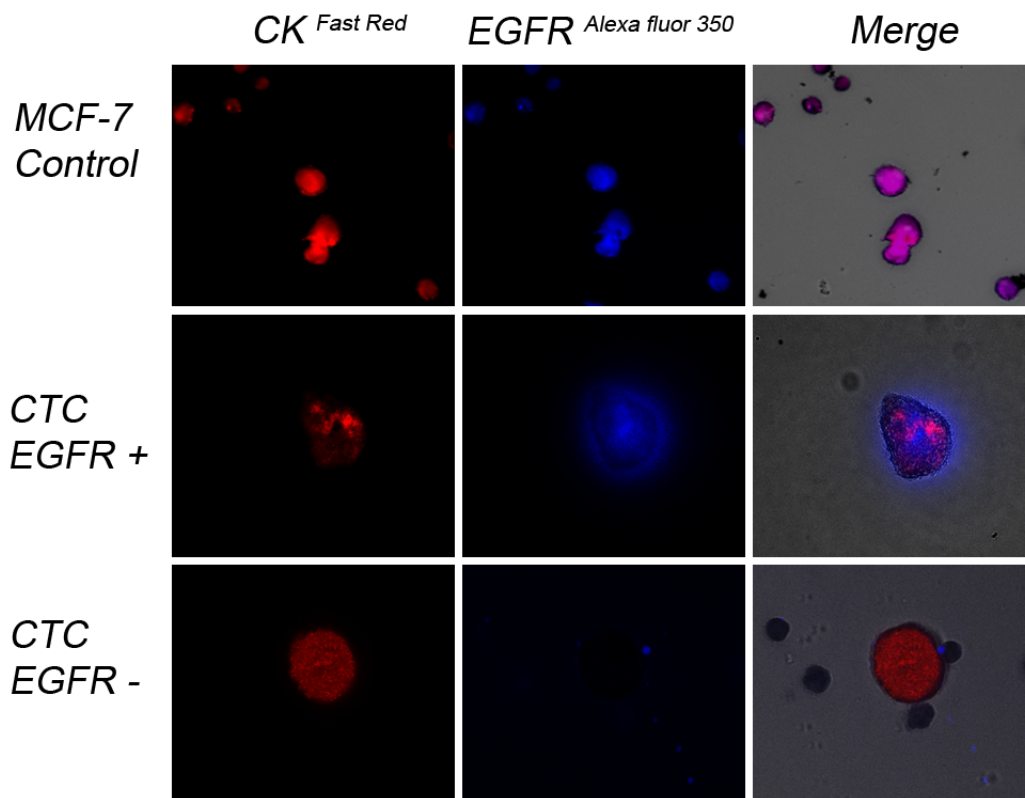


Figura 19. Imágenes de microscopía de epifluorescencia, donde se observa control, CTC^{CK+EGFR+} y CTC^{CK+EGFR-}

Notablemente, en el grupo de 16 pacientes CTCs^{CK+EGFR+} (64%, n=25) en estadios basales 13 cambiaron su estatus a CTCs^{CK+EGFR-} o a CTCs⁻ (81%, n=16) al final del tratamiento y solo 3 (19%, n=16) de estos pacientes mantuvieron el estatus CTCs^{CK+EGFR+}. Al final del tratamiento se encontraron mayoritariamente CTCs^{CK+EGFR-}. Podemos señalar que, de alguna manera, el tratamiento selecciona clones de CTCs^{CK+EGFR-}.

5.2.3 EGFR en CTCs y subtipos histológicos de cáncer de mama.

Se realizaron subgrupos de pacientes respecto de los diferentes subtipos histológicos y se correlacionó con la caracterización de EGFR en CTCs.

Tabla 8. Relación entre las variables clínicas y las detección y caracterización de CTCs^{CK+} con EGFR

	Basal N=25		Mitad del tratamiento N=23		Luego del tratamiento N=28	
	CTC ^{CK+EGFR-}	CTC ^{CK+EGFR+}	CTC ^{CK+EGFR-}	CTC ^{CK+EGFR+}	CTC ^{CK+EGFR-}	CTC ^{CK+EGFR+}
Luminal A	3	1	1	1	5	0
Luminal B	5	10	11	4	14	1
HER2	1	3	0	1	1	1
Triple negativo	0	2	0	1	5	1
P valor X²	P=0.7		P=0.2		P=0.3	

Los tumores HER2 positivos poseen una fracción de muestras EGFR+ superior al resto de los tumores y en ningún momento del tratamiento esta fracción se ve reducida por debajo del 0.5. En cuanto a los tumores triple negativo se observa un incremento del número de CTCs al finalizar el tratamiento, y también se observa una conversión de la fracción EGFR+ que va desde 1 antes del tratamiento a 0.12 al finalizar este.

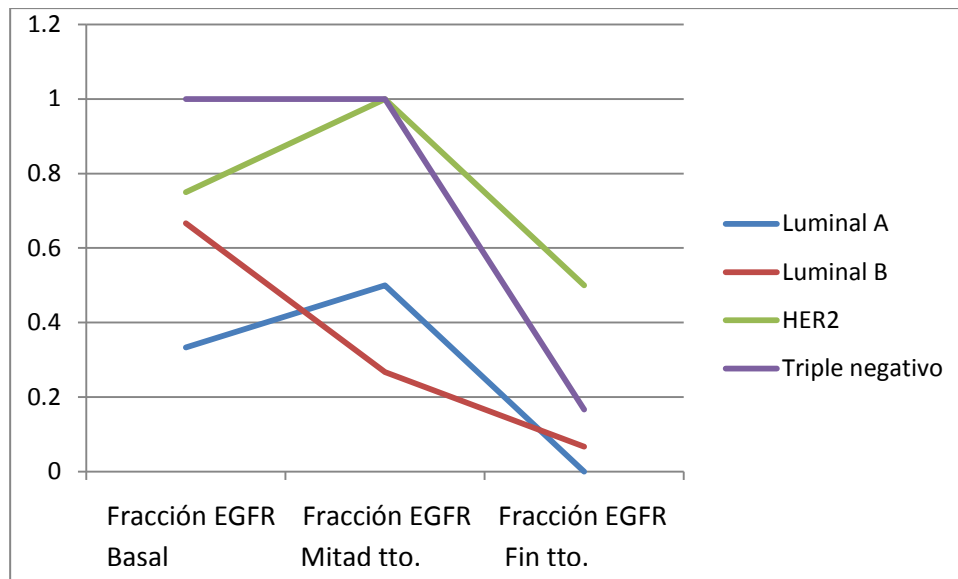


Figura 20. Gráfica representativa dónde se observa la fracción de CTCs^{CK+EGFR+} respecto del tiempo transcurrido luego de iniciado el tratamiento.

5.2.4 CTCs y respuesta a la terapia neoadyuvante: Respuesta patológica, clínica y citológica

Existen por lo general algunas discrepancias para evaluar respuesta por criterios clínicos comparados con la respuestas por criterios patológicos, lo que significa que en esta enfermedad, la respuesta no debe ser medida con un solo criterio, si no con la asociación de existentes y se deben seguir incorporando, además, elementos de evaluación de respuesta.

La respuesta patológica, es determinada observando una muestra de biopsia, se dice que es completa cuando al analizar la muestra obtenida tras la cirugía, no se detectan tejido tumoral. La respuesta clínica se determina con la realización de una mamografía, si no se aprecia masa tumoral, se dice que la respuesta es completa; si el tamaño de la tumoración ha disminuido, se considera respuesta parcial y favorable.

Interesantemente hemos encontrado que la presencia o ausencia de CTCs podría tener valor constante durante el seguimiento de los pacientes.

La mayoría de los pacientes negativos en estadios basales para la presencia de CTCs permanecieron negativos, hasta luego de finalizado el tratamiento. A excepción de 6 pacientes que pasaron de estatus negativo a positivo, esto fue observado única y específicamente en pacientes con tumores triple negativos y luminal A.

Para determinar el valor pronóstico que tiene la detección de CTCs, hemos diseñado un sistema de evaluación de respuesta, respecto de la variación del número de CTCs denominado respuesta citológica o CyCar:

La respuesta citológica es positiva cuando nunca hay CTCs, el número de CTCs desaparece, disminuye o se mantiene constante y la respuesta es citológicamente negativa cuando debutan en la detección de CTCs o su número se ve incrementado.

Hemos encontrado que en 6/6 (100%) de los pacientes tuvieron respuesta patológica grado 0, 1 y 2 (Ogston et al., 2003) se acompañó de un desfavorable análisis de CTCs (de CTCs positivas a CTCs negativas), por otra parte, cuando la respuesta fue de grado 3, 4 y 5, la correlación del análisis de la CTCs durante el tratamiento no fue exclusiva de una predicción favorable.

Tabla 9. Relación entre el grado de respuesta y la respuesta citológica por la detección de CTCs (CyCaR)

		Respuesta citológica		Total
		No favorable	Favorable	
Respuesta Grado	0	1	0	1
	1	1	0	1
	2	4	0	4
	3	21	5	26
	4	11	1	12
	5	12	2	14
Total		50	8	58

5.3 DETECCIÓN DE CTCs CON FENOTIPO EMT

En los ensayo de Western Blot en los que se ha determinado concentración proteica de muestras de células tumorales epiteliales, de células tumorales con fenotipo EMT y leucocitos, se ha observado que VIM se encuentra en altas concentraciones en células con fenotipo EMT, CK se reduce ($p=0.023(T)$ $p=0.250(Levene)$) y la expresión de EGFR no sufre cambios significativos ($p=0.664(T)$ $p= 0.147(Levene)$). En la muestra de lisado de leucocitos, proveniente de una mezcla de muestras de sangre 5 pacientes oncológicos, se observa muy baja expresión de VIM y no se observa expresión de EGFR y CK.

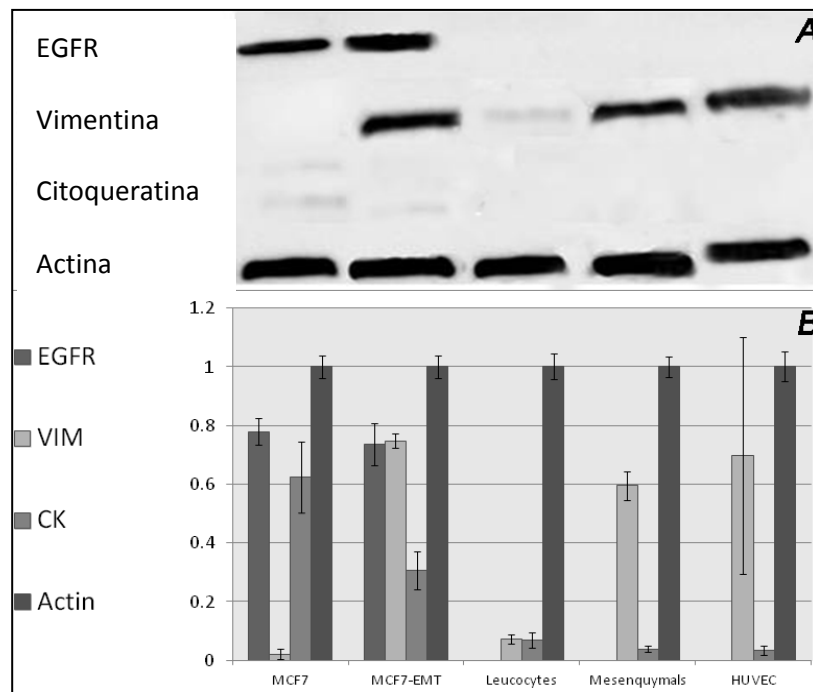


Figura 21. Imagen obtenida por WB y cuantificación con Image J de diferentes muestras. Los valores son relativos respecto a la concentración de Actina (Actin)

Tabla 10. Concentraciones relativas a Actina de las diferentes muestras celulares

	EGFR	Vimentina	CK	Actina
MCF7	0.73	0.06	0.55	1
MCF7-EMT	0.95	0.81	0.30	1
Mesenquimales	0.01	0.94	0.02	1
Leucocitos	0.01	0.66	0.02	1
HUVEC	0.01	0.88	0.01	1

Cabe destacar que la expresión de VIM como único método para seleccionar CTCs con fenotipo EMT puede generar falsos positivos, debido a la presencia de una muy baja, pero existente, cantidad de vimentina en algunos leucocitos. Es por esta razón que utilizamos VIM y EGFR conjuntamente para detectar CTCs con fenotipo EMT en pacientes con cáncer de mama.

Cuando se realizaron los experimentos de picado (en inglés spike) de células de cultivo MCF7 con inducción EMT, en sangre de donantes sanos, se observó que recuperábamos un promedio del 29% de las células usando CK como molécula para su enriquecimiento inmunomagnético (rango 13-60, n=20), un 39% de las células (rango=20-89, n=20) fueron recuperadas usando VIM para el aislamiento y EGFR para su detección.

En los controles negativos de sangre de voluntarios sanos, 2 de 20 (rango 1-2) muestras fueron positivas para la presencia de VIM en células circulantes, pero al caracterizarlas con EGFR, ninguna fue positiva. En ningún caso hemos observado la presencia de células VIM– EGFR+ (Kari, Chan, Rocha de Quadros, & Rodeck, 2003; Krawczyk et al., 2014; Real et al., 2002; Shiomi-Mouri et al., 2014).

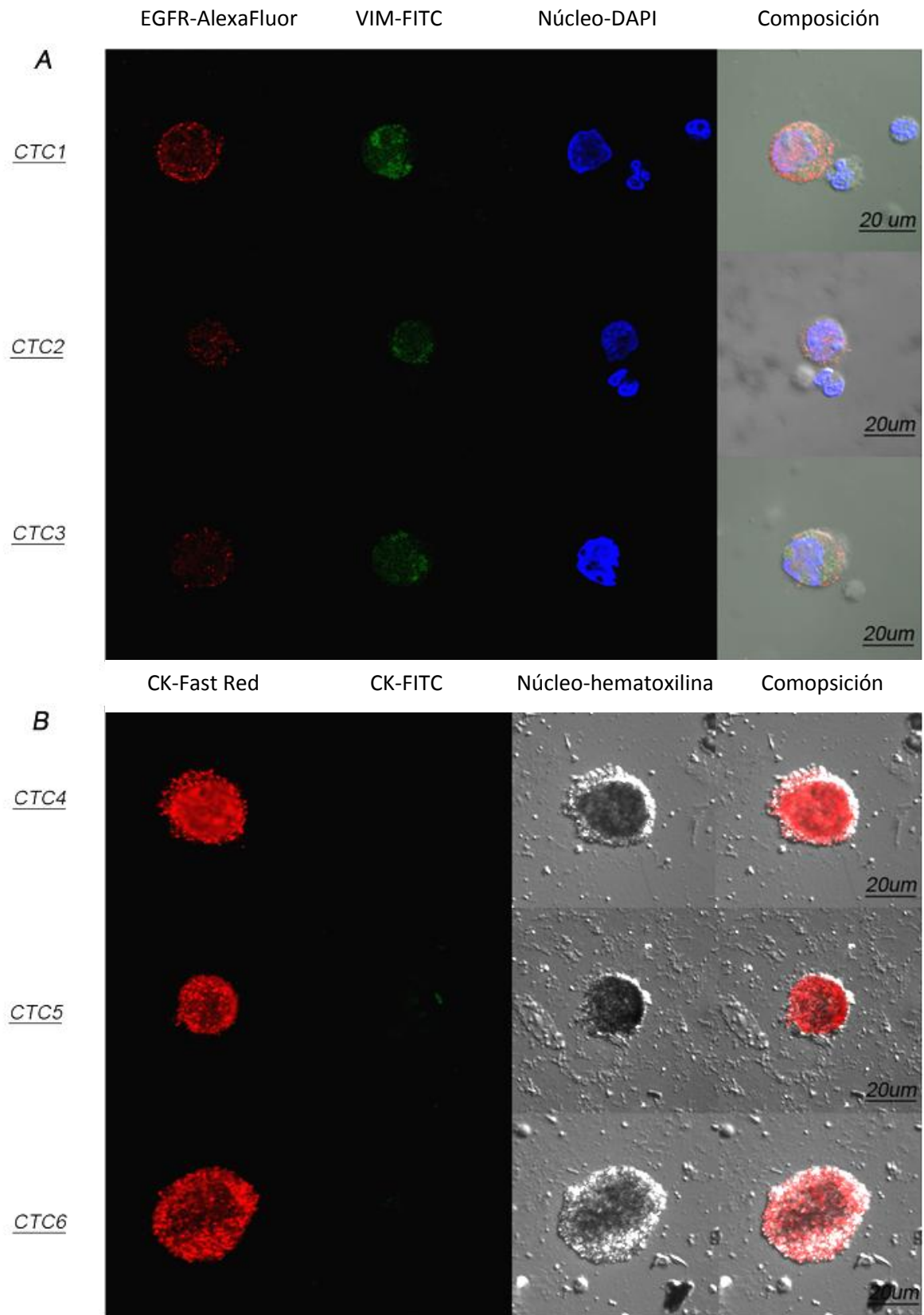


Figura 22. Imágenes de microscopía confocal de CTCs donde se pueden apreciar dos tipos, A: con fenotipo EMT y B: con fenotipo epitelial

En 54 muestras basales (64.3 %, n=84) de pacientes con cáncer de mama localmente avanzado, no se observó la presencia de CTCs. En 13 muestras (15.4 %, n=84) solo se observa la presencia de CTCs CK+ (promedio=8, rango= 2-26), en 12 muestras (14.3 %, n=84) se observa la presencia de CTCs^{CK+} (promedio=12, rango=5-52) y CTCs^{CK-/lowVIM+EGFR+} (promedio=2, rango=1-4). En 5 muestras (5.9 %, n=84) solo se observa la presencia de CTCs^{CK-/lowVIM+EGFR+} (promedio=1, rango=1-2).

Tabla 11. Relación entre la detección de CTCs^{CK+} y CTC^{CK-VIM+EGFR+} y gráfica representativa de las poblaciones de pacientes agrupados respecto de las CTCs^{CK+} y CTCs^{CK-VIM+EGFR+}

		CTCs ^(CK-VIM + EGFR +)		Total	P X ²
		(-)	(+)		
CTCs CK+	CTCs ^{CK} (-)	54 (91.5%)	5 (8.5%)	59	0.001
	CTCs ^{CK} (+)	13 (52%)	12 (48%)	25	

Las CTCs, obtenidas con Vimentina, fueron caracterizadas genotípicamente con TOPO2 y HER2 a fin de observar amplificaciones típicas del cáncer de mama. Se observó que 3 muestras (18%, n=17) tenían sus CTCs con TOPO2 y HER2 amplificados.

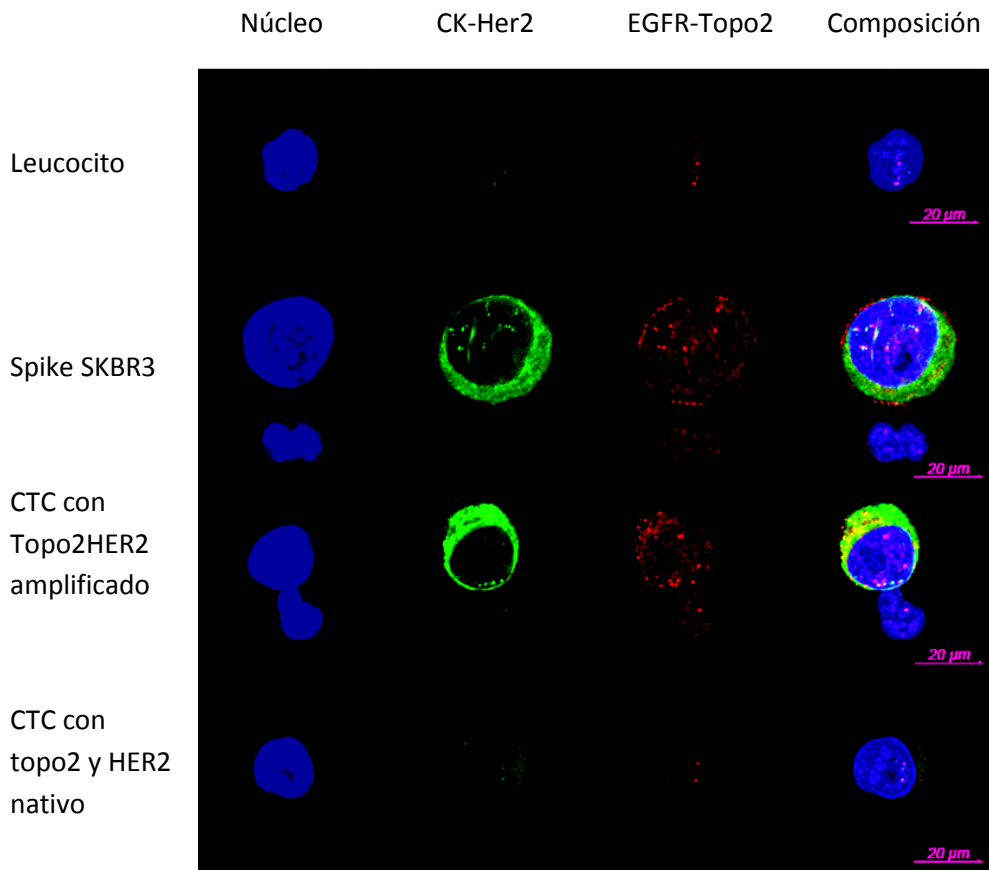


Figura 23. Caracterización fenotípica y genética de CTC con fenotipo EMT

Cuando se caracterizaron fenotípicamente las muestras derivadas del tumor primario, luego de la cirugía, se observó la expresión de EGFR. Para valorar la expresión se agruparon en tres grupos, un grupo de muestras negativas para EGFR (-), otro grupo de muestras positivas, con baja expresión (+) y muestras que mostraban alta expresión de EGFR (++)

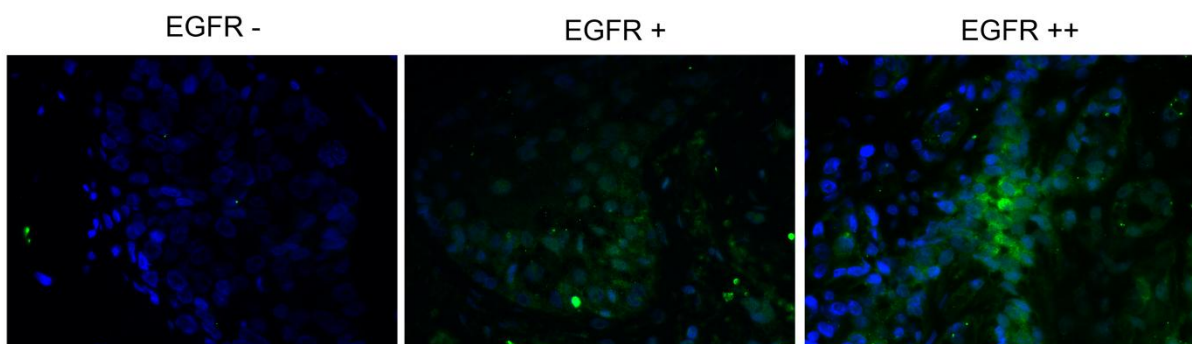


Figura 24. Imágenes de microscopía de epifluorescencia donde se observa los diferentes grados de expresión de EGFR en muestras de tumor primario

Se ha realizado una tabla de contingencia para relacionar los principales datos histológicos del tumor primario, grado y respuesta al tratamiento, con la aparición de la CTCs. Se ha observado que existen diferencias significativas, según la prueba de Chi cuadrado de Pearson. Cuando comparamos EGFR en tumor primario se observa que existen mayor numero de muestras con CTCs^{CK-VIM+EGFR+}, cuando el tumor primario es EGFR++ (6, n=10; 60%) (p=0.121), cuando existen CTCs^{CK+} (12, 48%, n=25) (p=0.001), cuando hay amplificación de HER2, (55,5%, n=9)(p=0.024), cuando el tumor es de grado 2 (40.9%, n=22) (p=0.035), cuando la respuesta a corto plazo es buena, donde se incluye: Enfermedad estable (EE) (50%, n=4), repuesta parcial (RP)(14.3%, n=15) y Respuesta completa(RC) (40%, n=7) (p=0.024)

Tabla 12. Relación entre las variables clínicas y las detección y caracterización de CTCs^{CK-VIM+EGFR+}

Variable		CTCs ^{CK-VIM+EGFR+}		Total	P valor X ²
		(%)	(%)		
		-	+		
EGFR en tumor primario	-	4 (100)	0 (0)	4	0.121
	+	1 (50)	1 (50)	2	
	++	4 (40)	6 (60)	10	
CTCs CK+	CTCs -	54 (91.5)	5 (0.85)	59	0.001
	CTCs + EGFR -	8 (88.9)	1 (11.1)	9	
	CTCs + EGFR +	5 (31.2)	11 (68.8)	16	
HER2neu	-	40 (85.1)	7 (14.9)	47	0.024
	+	4 (44.4)	5 (55.6)	9	

Variable		CTCs ^{CK-VIM+ EGFR+}		Total	P valor X ²
		(%)			
		-	+		
Grado	I	13 (92.9)	1 (7.1)	14	0.035
	II	13 (59)	9 (41)	22	
	III	9 (90)	1 (90)	10	
R estrógenos	-	14 (70)	6 (30)	20	0.225
	+	30 (83.3)	6 (16.7)	36	
R progesterona	-	17 (70.8)	7 (29.2)	24	0.624
	+	27 (84.4)	5 (15.6)	32	
Clasificación Perou	Basal	7 (87.5)	1 (12.5)	8	0.016
	Her 2 neu	1 (20)	4 (80)	5	
	Luminal A	7 (87.5)	1 (12.5)	8	
	Luminal B	23 (82.1)	5 (17.9)	28	
Respuesta	EE	4 (44.4)	2 (55.6)	6	0.024
	P	2 (100)	0 (0)	2	
	RC	5 (71.4)	2 (28.6)	7	
	RP	14 (87.5)	2 (12.5)	16	

5.4. DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CTCs EN CÁNCER DE COLON

En nuestro estudio se captaron 64 pacientes con cáncer de colon metastásico.

Todos los pacientes recibieron quimioterapia de FOLFOX acompañada con Bevacizumab, como se ha descrito anteriormente.

5.4.1. La detección de CTCs antes y durante el tratamiento fue correlacionada con los datos anatomopatológicos y clínicos del paciente.

Tabla 13. Relación entre las variables clínicas y las detección CTCs^{CK+}

		N		P	N		P	N		P
		(% Antes del tratamiento)			(% 6 semanas)			(% 12 semanas)		
		CTC-	CTC+	PX ²	CTC-	CTC+	PX ²	CTC-	CTC+	P X ²
Sexo	Hombre	21 (53.8)	18 (46.2)	0.648	17 (54.8)	14 (45.2)	0.563	14 (50)	14 (50)	0.030
	Mujer	12 (48)	13 (52)		12 (63.2)	7 (36.8)		14 (82.4)	3 (17.6)	
Edad	≤50	10 (55.6)	8 (44.4)	0.689	7 (50)	7 (50)	0.475	5 (41.7)	7 (58.3)	0.086
	>50	23 (50)	23 (50)		22 (61.1)	14 (38.9)		23 (69.7)	10 (30.3)	
Localización del Tumor	Recto	16 (57.1)	12 (42.9)	0.460	14 (58.3)	10 (41.7)	0.853	13 (61.9)	8 (38.1)	0.835
	Colon Izquierdo	7 (38.1)	13 (61.9)		8 (50)	8 (50)		11 (73.3)	4 (26.7)	
	Colon transverso	1 (100)	0 (0)		1 (100)	0 (0)		1 (100)	0 (0)	
	Colon derecho	4 (50)	4 (50)		3 (33.3)	2 (66.7)		1 (25)	3 (75)	

Respuesta	EP	7 (63.6)	4 (36.4)	0.041	2 (50)	2 (50)	0.579	1 (50)	1 (50)	0.869
	EE	6 (42.9)	8 (57.1)		8 (66.7)	4 (33.3)		3 (25)	9 (75)	
	RP	13 (52)	12 (48)		13 (56.5)	10 (43.5)		13 (56.5)	10 (43.5)	
	RC	4 (80)	1 (20)		2 (66.7)	1 (33.3)		3 (60)	2 (40)	
Invasión Vascular	No	5 (38.5)	10 (61.5)	0.407	6 (47.8)	5 (52.2)	0.662	2 (57.9)	5 (42.1)	0.142
	Si	0 (0)	4 (100)		1 (83.3)	0 (16.7)		1 (66.7)	1 (33.3)	
Invasión Linfática	No	15 (42.4)	13 (57.6)	0.828	7 (53.6)	5 (46.4)		3 (62.5)	5 (37.5)	0.128
	Si	0 (0)	1 (100)		0 (100)	0 (0)		0 (100)	1 (100)	
Invasión Perineural	No	3 (28)	13 (72)	0.281	6 (52.4)	3 (47.6)	0.621	3 (64.7)	3 (35.3)	0.131
	Si	2 (77.8)	1 (22.2)		1 (62.5)	2 (37.5)		0 (50)	3 (50)	
Grado	I	2 (20)	2 (80)	0.555	1 (25)	1 (75)	0.741	0 (100)	0 (0)	0.142
	II	2 (46.2)	11 (53.8)		6 (56.5)	5 (43.5)		2 (61.9)	5 (38.1)	
	III	1 (20)	2 (80)		0 (33.3)	0 (66.7)		2 (33.3)	0 (66.7)	

CA19.9 Basal	Normal	12 (37.5)	20 (62.5)	0.005	16 (57.1)	12 (42.9)	0.959	15 (62.5)	9 (37.5)	0.592
	Elevado	20 (74.1)	7 (25.9)		11 (57.9)	8 (42.1)		12 (63.2)	7 (36.8)	
K-RAS	Wt	17 (53.1)	15 (46.9)	0.978	15 (57.7)	11 (42.3)	0.716	17 (68)	8 (32)	0.625
	Mutado	13 (54.2)	11 (45.8)		11 (52.4)	10 (47.6)		10 (55.6)	8 (44.4)	

Se ha observado que 21 (29.1%), de un total de 64 pacientes, tenían presencia de CTCs CK positivas, en sus muestras de sangre periférica, en estadio basal. La media de CTCs encontradas fue 24 (rango=1-62) CTCs en 10ml de sangre. Luego de 4 ciclos de tratamiento neoadyuvante, se identificaron 21 (25.9% n=81) muestras con CTCs. Al final del tratamiento, se identificaron 11 muestras positivas para CTCs de un total de 58 pacientes que llegaron al final del estudio (19%).

5.4.2. Expresión de VEGFR en CTCs

Para la determinación de CTCs caracterizadas fenotípicamente por fluorescencia, fue necesario en primer lugar la realización de controles con el fin de poner a punto la metodología y ajustar los parámetros de microscopía a fin de poder discernir fehacientemente entre células negativas y positivas para la expresión de CK y VEGFR.

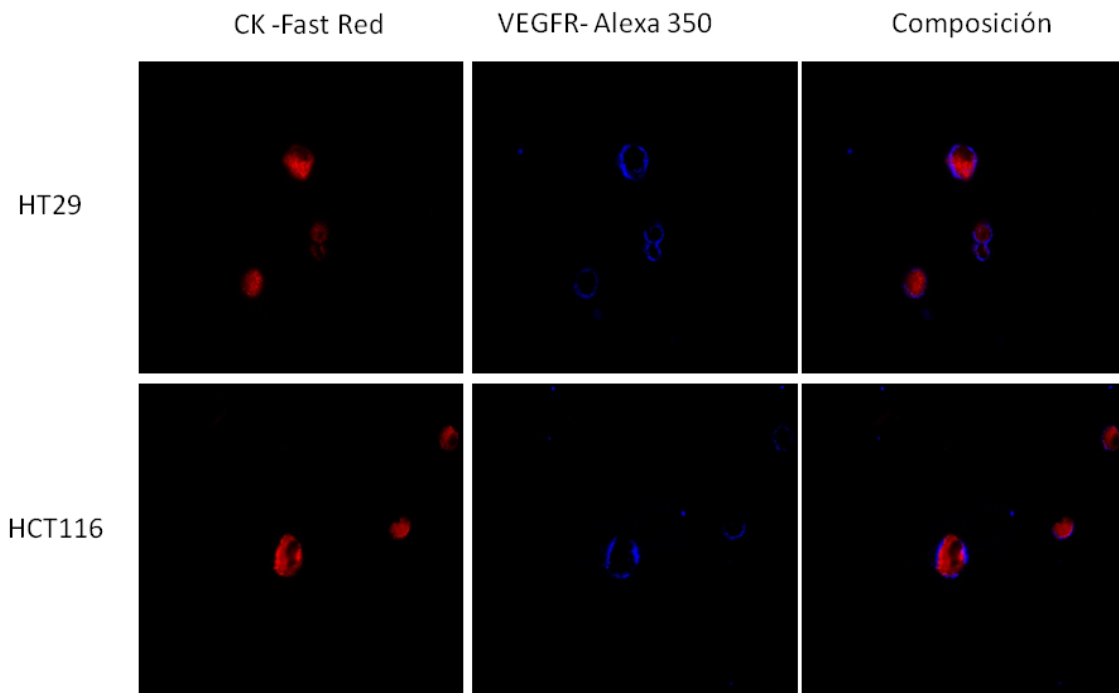


Figura 25. Imágenes de microscopía de epifluorescencia de controles de líneas celulares de cáncer de colon, marcadas con CK y VEGFR

Para observar la calidad de los anticuerpos y marcadores utilizados a fin de distinguir si no había interacción cruzada entre leucocitos, células endoteliales (HUVEC) y CTCs se realizó el análisis de WB donde se observó una gran diferencia de expresión entre este tipo de células y respecto de los marcadores utilizados en este estudio. Las células HUVEC tienen gran expresión de VEGFR2, pero no expresan CK. Los leucocitos, que son las células que en mayor medida se encuentran en la muestra luego de aplicar la metodología, no expresan VEGFR2 ni CK.

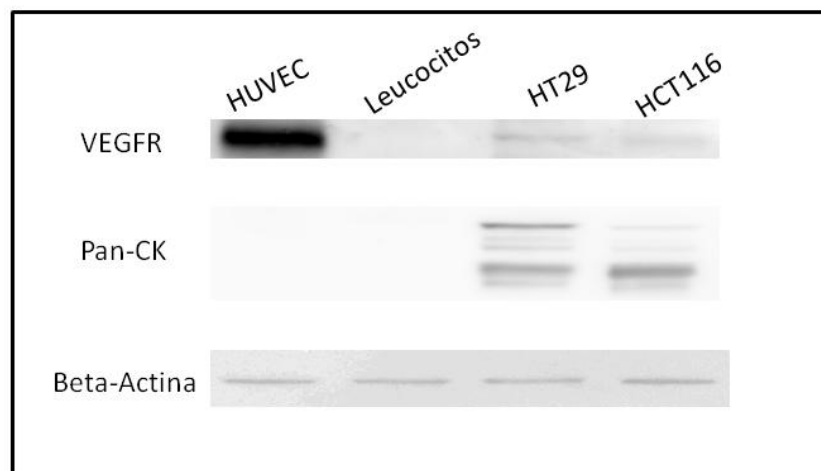


Figura 26. Imagen del Análisis de WB donde se observa VEGFR y Pan-CK en las diferentes muestras

Con el programa Image J se cuantificó la expresión de proteínas a partir de la imagen obtenida en el ensayo de WB y se obtuvo una cuantificación relativa respecto a Actina.

En el siguiente gráfico se puede observar las una comparación de la concentración proteica entre cada muestra.

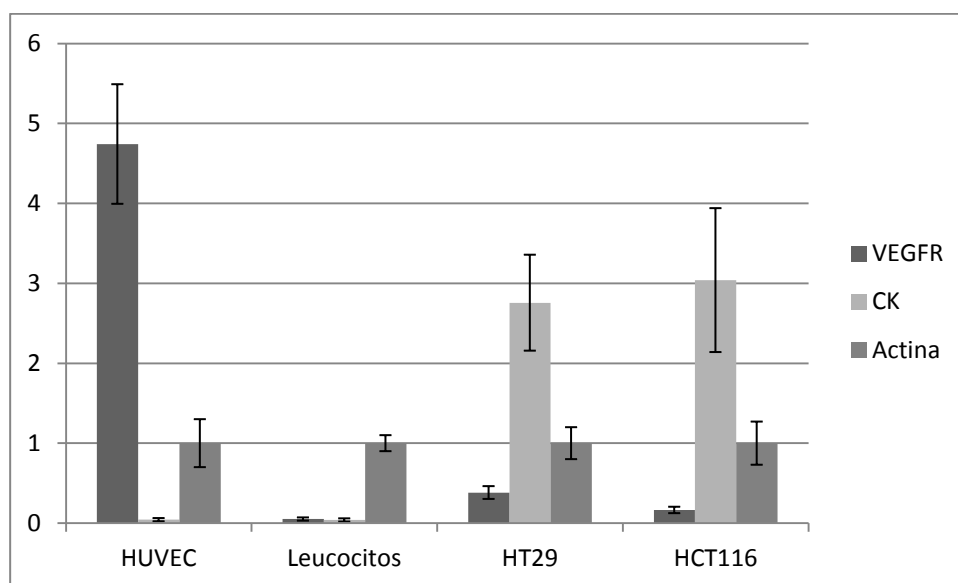


Figura 27. Cuantificación con imagen J de la imagen de WB. Todos los valores son relativos a la concentración de Actina

La doble tinción inmunofluorescente de CK y VEGFR revela que 22 de 30 pacientes (64%) en muestras basales tenían CTCs^{VEGFR+}. La media de CTCs CK+ y VEGFR + fue de 2 células de media, por muestra (rango=0-5).

Las muestras presentaron heterogeneidad para la expresión de VEGFR. Este se expresó en un promedio del 45 % de las CTCs encontradas. En nuestro estudio hemos considerado muestras VEGFR positivas, cuando coexistían CTCs positivas y negativas para VEGFR2.

Cuando analizamos la evolución de las CTC durante el tratamiento, observamos que predominan muestras con CTCs^{VEGFR+} (73% n=30) en estadios basales, luego de 6

semanas de quimioterapia solo el 40% (n=20) de las muestras que presentan CTCs tienen CTCs^{CK+VEGFR+}; y al final del tratamiento el 46% (n=15) de ellas presentó CTCs^{CK+VEGFR+}.

Luego de realizar una tabla a fin de comparar los principales datos clínicos de los pacientes respecto a la caracterización con VEGFR de las CTCs y al aplicar el test de Chi², hemos observado valores de significancia bilateral menores de 0,05 en varias comparativas.

Dependiendo del sexo la caracterización con VEGFR de las CTCs varía en forma diferente. Como hemos dicho anteriormente el porcentaje de CTCs^{VEGFR+} disminuye a medida que transcurre el tiempo bajo el tratamiento. Según nuestros resultados este proceso es más evidente en mujeres que en hombres. A las 12 semanas, las mujeres, solo tuvieron CTCs^{CK+VEGFR-} (100% n=4 $pX^2=0.029$) en cambio 7 hombres (63.6% n=11) tuvieron CTCs^{CK+VEGFR+} y 4 (36.4%) CTCs^{CK+VEGFR-}.

No se observó significancia respecto de la edad de los pacientes, ni de la localización del tumor primario.

Respecto al grado del tumor primario, los pacientes con tumores de grado 1 y 3 poseían mayor porcentaje de CTCs VEGFR+ (80 % n=10) antes del tratamiento que los tumores de grado 2 (53% n=26 $X^2=0.028$). Durante el tratamiento esta diferencia no es significativa.

Cuando se realizó la comparación con la respuesta clínica de los pacientes a las 12 semanas en comparación con la caracterización con VEGFR de las CTCs en muestras basales. Observamos que los pacientes que tenían respuesta favorable (sin progresión), se habían detectados CTCs^{CK+VEGFR+} en sus muestras antes de iniciarse el tratamiento (EE=100% n=8, RP=72.7% n=11, RC=100%) en cambio los pacientes con progresión de la enfermedad tenían CTCs^{CK+VEGFR-} (EP=75% n=4).

Tabla 14. Relación entre las variables clínicas y las detección y caracterización de CTCs con VEGFR

		N		P	N		P	N		P
		(%) Antes del tratamiento			(%) Mitad del tratamiento			(%) Después del tratamiento		
		CTC CK+ VEGFR-	CTC CK+ VEGFR+	PX ²	CTC CK+ VEGFR-	CTC CK+ VEGFR+	PX ²	CTC CK+ VEGFR-	CTC CK+ VEGFR+	P X ²
Sexo	Hombre	5 (26.3)	14 (73.7)	0.954	8 (57.1)	6 (42.9)	0.852	4 (36.4)	7 (63.6)	0.029
	Mujer	3 (27.3)	8 (72.7)		4 (66.7)	2 (33.3)		4 (100)	0 (0)	
Edad	≤50	3 (37.5)	5 (62.5)	0.418	5 (71.4)	2 (28.6)	0.444	2 (40)	3 (60)	0.464
	>50	5 (22.7)	17 (77.3)		7 (53.8)	6 (46.2)		6 (60)	4 (40)	
Localización del Tumor	Recto	3 (25)	9 (75)	0.405	6 (60)	4 (40)	0.856	4 (80)	1 (20)	0.232
	Colon Izquierdo	2 (16.7)	10 (83.3)		4 (57.1)	3 (42.9)		3 (60)	2 (40)	
	Colon transverso	1 (100)	0 (0)		1 (100)	0 (0)		0 (0)	2 (100)	
	Colon derecho	1 (33.3)	2 (66.7)		6 (60)	4 (40)		1 (33.3)	2 (66.7)	
Grado	I	1 (20)	4 (80)	0.028	1 (25)	3 (75)	0.618	2 (100)	0 (0)	0.403
	II	12 (46.2)	14 (53.8)		13 (56.5)	10 (43.5)		13 (61.9)	8 (38.1)	
	III	1 (20)	4 (80)		2 (33.3)	1 (66.7)		1 (33.3)	2 (66.7)	

Respuesta 12 semanas	EP	3 (75)	1 (25)	0.029	3 (3)	0 (0)	0.434	0 (0)	0 (0)	0.084
	EE	0 (0)	8 (100)		2 (50)	2 (50)		3 (100)	0 (0)	
	RP	3 (27.3)	8 (72.7)		4 (44.4)	5 (55.6)		5 (50)	5 (50)	
	RC	0 (0)	4 (100)		2 (66.7)	1 (33.3)		0 (0)	2 (100)	
Invasión Vascular	No	10 (38.5)	16 (61.5)	0.407	6 (54.6)	5 (45.4)	0.662	2 (28.6)	5 (71.4)	0.142
	Si	0 (0)	4 (100)		1 (100)	0 (0)		1 (50)	1 (50)	
Invasión Linfática	No	5 (27.8)	13 (72.2)	0.147	7 (58.3)	5 (41.7)	0.852	3 (37.5)	5 (62.5)	0.128
	Si	0 (0)	1 (100)		0 (0)	0 (0)		0 (0)	1 (100)	
Invasión Perineural	No	3 (18.8)	13 (81.2)	0.281	6 (66.7)	3 (33.3)	0.621	3 (50)	3 (50)	0.131
	Si	2 (66.7)	1 (33.3)		1 (33.3)	2 (66.7)		0 (0)	3 (100)	

Respecto a la existencia de Invasión Vascular, linfática y perineural no se observaron datos significativos.

También se evaluó, respecto a la presencia de CTCs a diferentes tiempos bajo el tratamiento y se observó que el 100% de los pacientes (n=12) con CTCs^{CK+VEGFR+} antes del tratamiento, no tenían CTCs a las 12 semanas de tratamiento ($X^2=0.041$).

Tabla 15. Relación entre las detección de CTCs^{CK+} y las detección y caracterización de CTCs con VEGFR

		N		P	N		P	N		P
		(%) Antes del tratamiento			(%) Mitad del tratamiento			(%) Después del tratamiento		
		CTC CK+ VEGFR-	CTC CK+ VEGFR+	PX ²	CTC CK+ VEGFR-	CTC CK+ VEGFR+	PX ²	CTC CK+ VEGFR-	CTC CK+ VEGFR+	P X ²
CTCs Basal	No			0.361	5 (50)	5 (50)	0.361	3 (50)	3 (50)	0.833
	Si	6 (21.4)	22 (78.6)		7 (70)	3 (30)		5 (55.5)	4 (44.5)	
CTCs 6 semanas	No	3 (20)	12 (80)	0.664			0.664	4 (66.7)	2 (33.3)	0.471
	Si	3 (27.3)	8 (72.7)		12 (60)	8 (40)		4 (50)	4 (50)	
CTCs 12 semanas	No	0 (0)	12 (100)	0.041	3 (37.5)	5 (62.5)	0.168			0.168
	Si	3 (30)	7 (70)		7 (70)	3 (30)		7 (50)	7 (50)	

Para evaluar la diferencia de supervivencia respecto de la aparición y caracterización de las CTC, realizaron curvas de Kaplan-Meier a fin de observar gráficamente la existencia de diferencias entre pacientes con y sin CTCs antes del tratamiento

Cuando evaluamos la supervivencia observamos que los pacientes sin CTCs^{CK+} tienen mayor tiempo de supervivencia, pero sin significancia según la prueba de Log-Rank ($pX^2=0.549$).

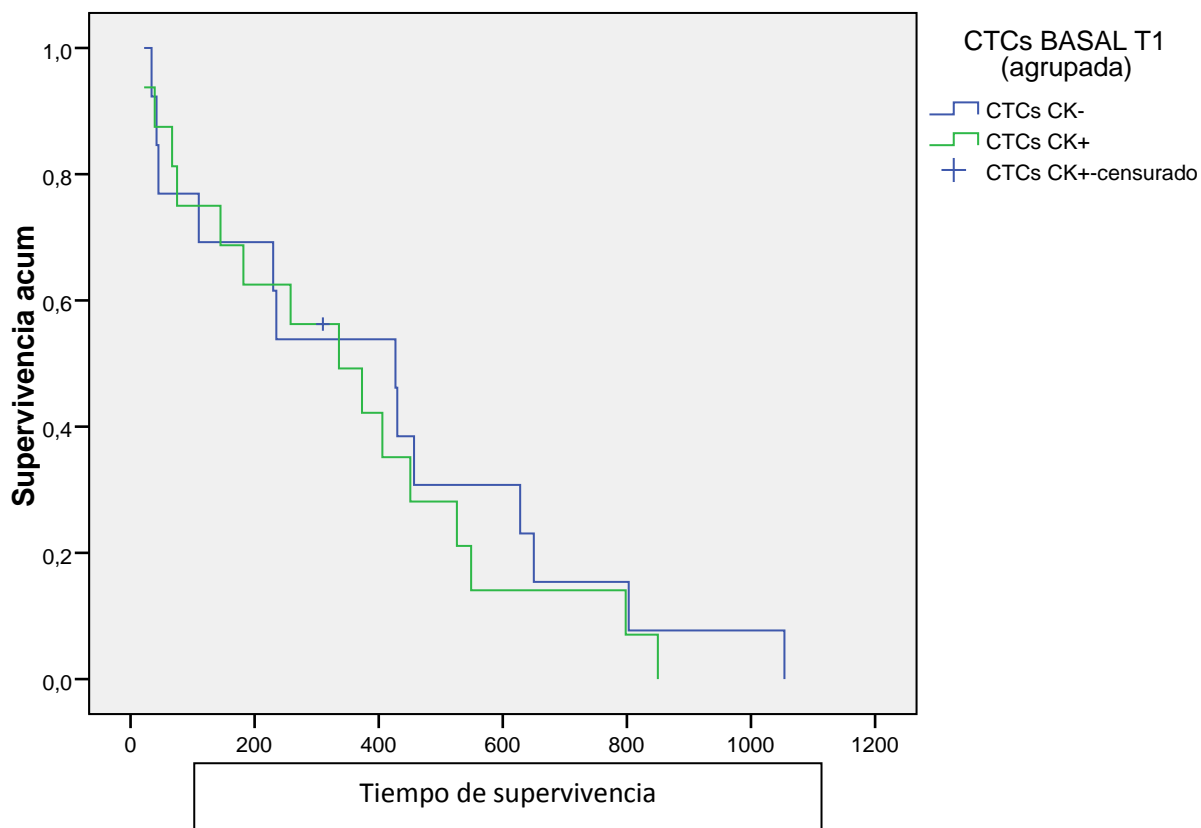


Figura 28. Representación Gráfica del estimador de Kaplan-Meier, la línea azul pertenece a pacientes sin CTC, la línea verde corresponde a pacientes con CTC antes de iniciado el tratamiento

A continuación, hemos observado si la caracterización de VEGFR en las CTCs puede pronosticar un aumento en el tiempo de supervivencia. Para ello hemos separado los pacientes con CTCs en dos grupos: pacientes solo con CTCs^{CK+VEGFR-} y otro grupo de pacientes con CTCs^{CK+VEGFR+}. Se observó una mayor supervivencia con CTCs^{CK+VEGFR+} respecto de los pacientes con CTCs^{CK+VEGFR-} ($pX^2=0.09$).

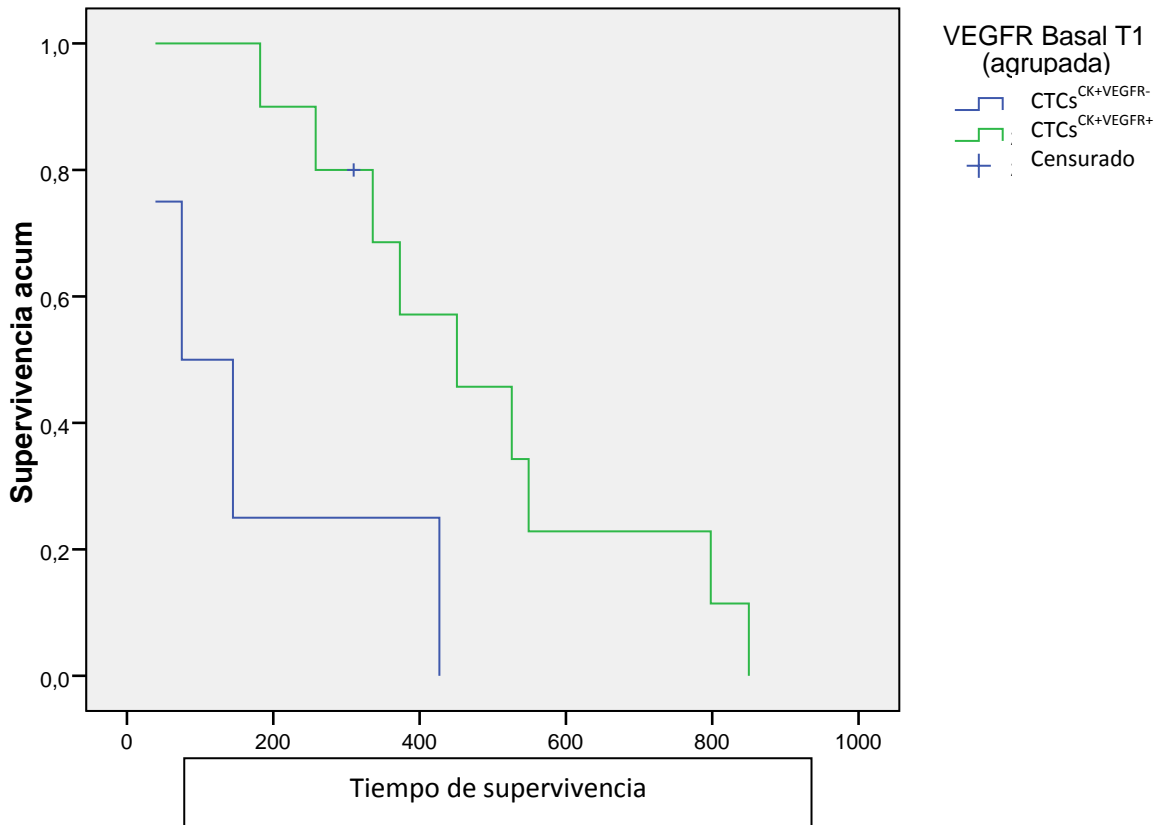


Figura 29. Representación gráfica del estimador de Kaplan-Meier, la línea azul pertenece a pacientes con CTC^{CK+VEGFR-}, la línea verde corresponde a pacientes con CTC^{CK+VEGFR+}

Se realizó la agrupación de los pacientes en dos grupos: pacientes con buen pronóstico (sin CTCs y CTC^{CK+VEGFR+}) y se comparó respecto de los de mal pronóstico (pacientes con CTCs^{CK+VEGFR-}). Al comparar estos dos grupos hemos observado, como era de esperar, una mayor supervivencia de los pacientes del grupo de pacientes con buen pronóstico ($pX^2=0.017$).

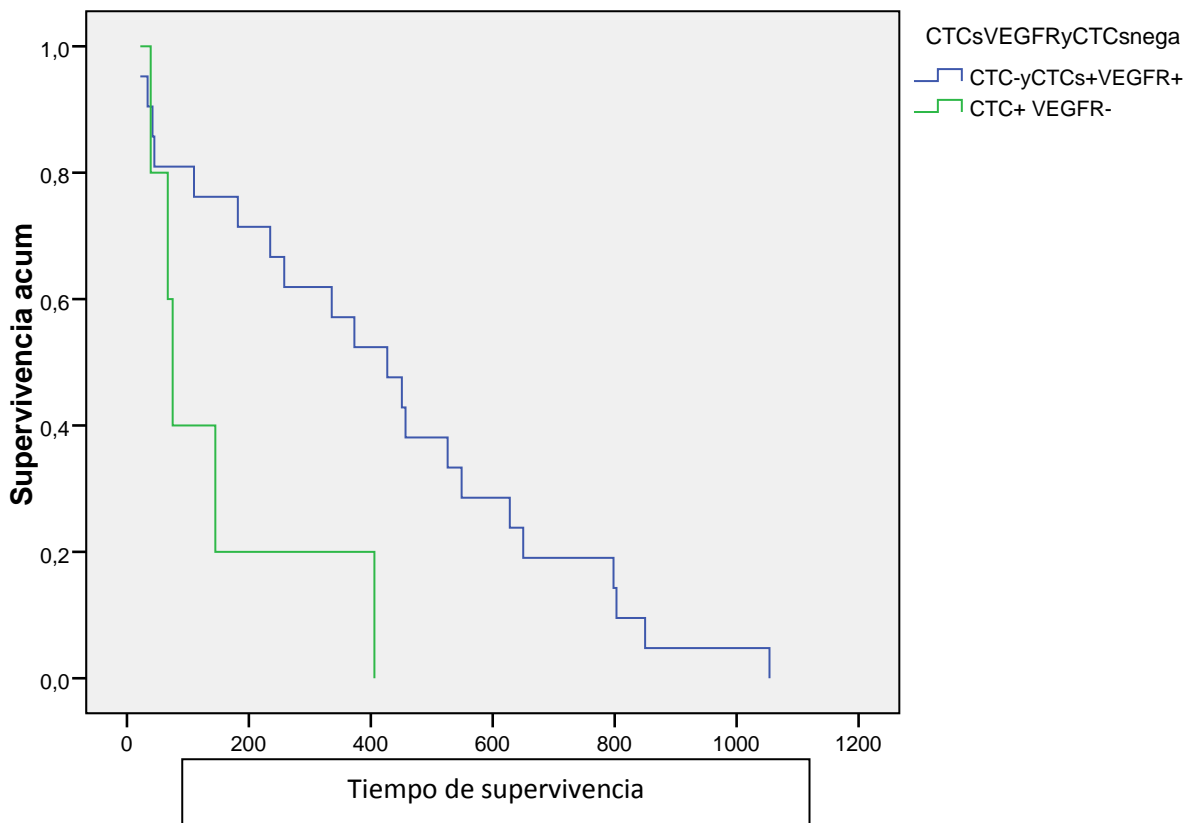


Figura 30. Representación gráfica del estimador de Kaplan-Meier, la línea verde pertenece a los pacientes con CTCs^{CK+VEGFR-} la línea verde corresponde a los pacientes sin CTCs y con CTCs^{CK+VEGFR+}

En este estudio también se evaluó la capacidad pronóstica de las CTCs y de la caracterización con VEGFR de estas, respecto del tiempo de supervivencia libre de progresión. El parámetro supervivencia libre de progresión (PFS), se refiere al tiempo transcurrido entre la administración del primer ciclo de tratamiento (FOLFOX-Bevacizumab) y la progresión de la enfermedad (aumento del tamaño del tumor primario y/o del tamaño y número de metástasis).

En primer lugar se ha realizado una comparación de los pacientes con CTCs y los pacientes sin CTCs. Las curvas de Kaplan-Meier mostraron mayor PFS en los pacientes sin CTCs con un grado de significancia por encima de lo esperado ($pX^2=0.099$).

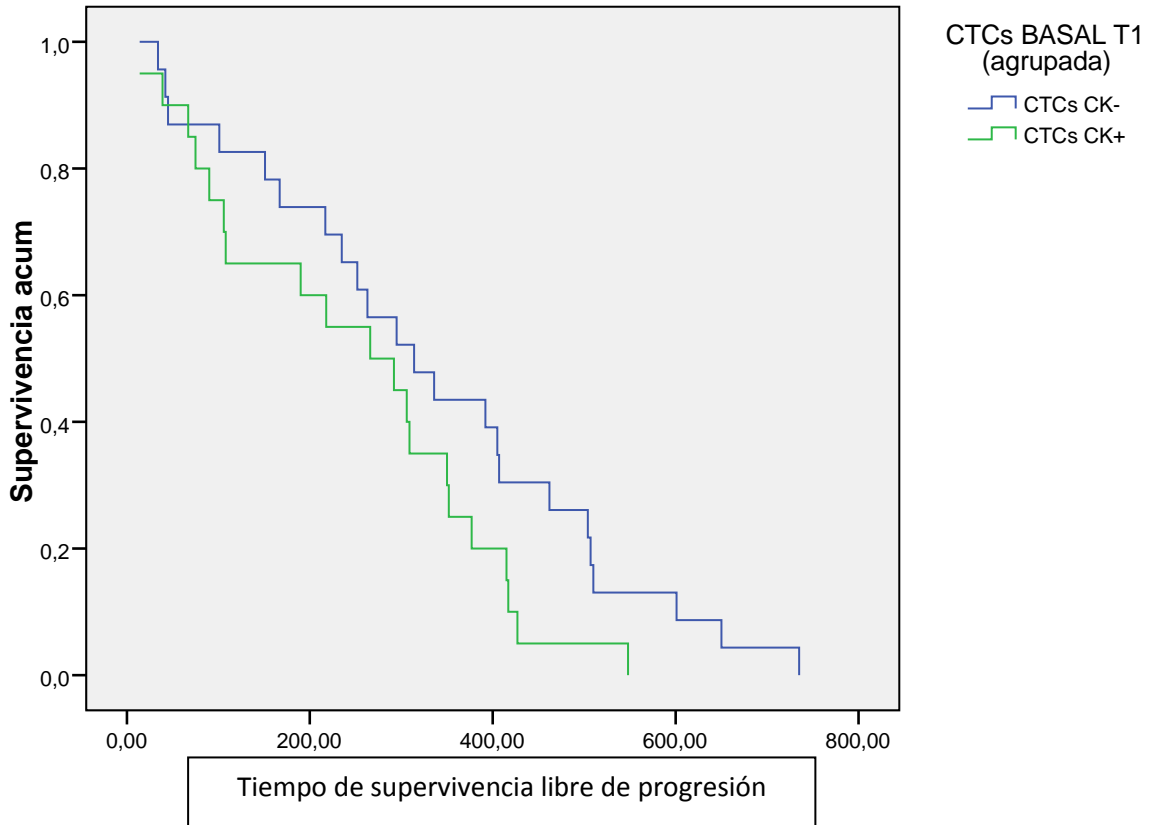


Figura 31. Representación gráfica del estimador de Kaplan-Meier, respecto del tiempo de supervivencia libre de progresión, la línea azul pertenece a pacientes sin CTCs y la línea verde corresponde a pacientes con CTCs

También se realizaron estudios de Kaplan-Meier con la caracterización de las CTCs con VEGFR, el tiempo de progresión fue menor para pacientes con todas sus CTCs^{CK+ VEGFR-} ($pX^2=0.017$).

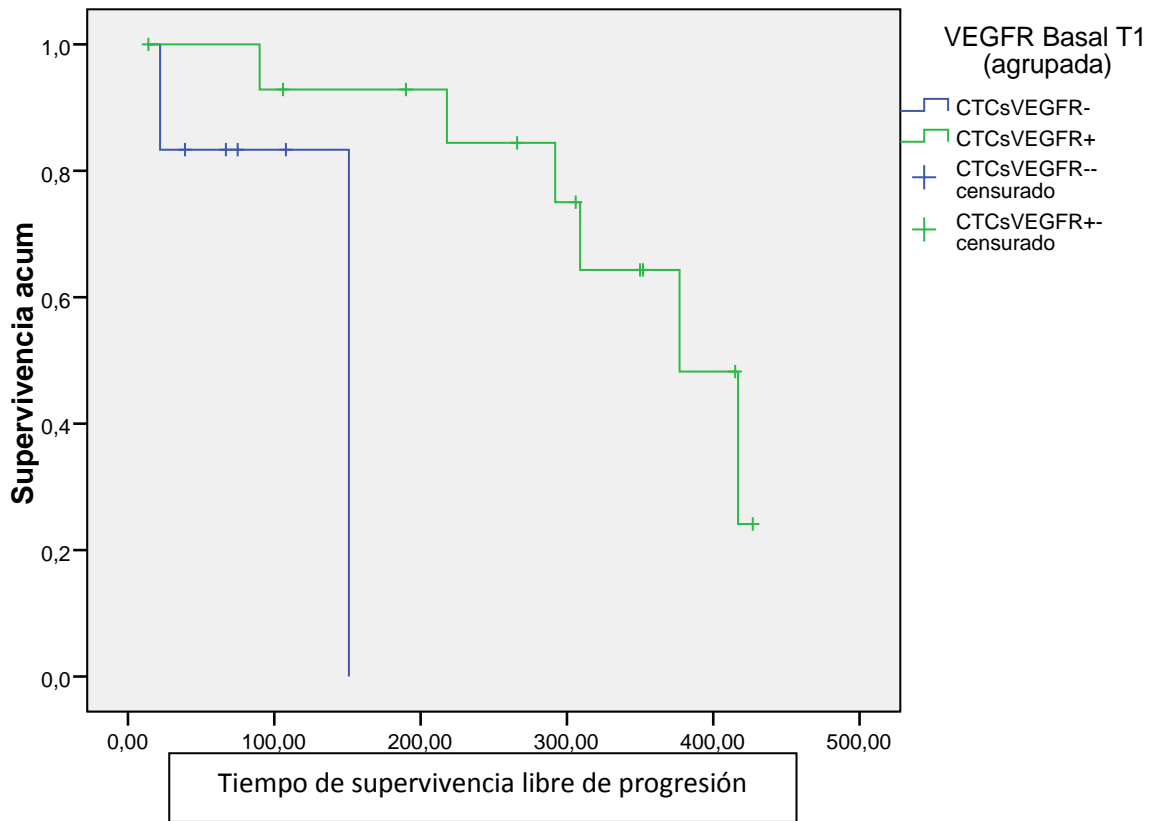


Figura 32. Representación Gráfica del estimador de Kaplan-Meier, la línea azul pertenece a pacientes con CTC^{CK+VEGFR-} la línea verde corresponde a pacientes con CTC^{CK+VEGFR+}

6. DISCUSIÓN

6.1 DISCUSIÓN RESPECTO DE LA APARICIÓN DE CTCs CON FENOTIPO EMT EN MUESTRAS NEGATIVAS PARA CTCs^{CK+}

En todo Proceso tumoral del cáncer de mama, durante el desarrollo tumoral un gran número de células tumorales deben abandonar el tumor primario para desarrollar metástasis cercanas o distales. Para ello es necesario que las células adquieran movilidad y migren de forma independiente o en clúster, hacia el torrente sanguíneo o linfático.

El proceso EMT, es el proceso por el cual las células adquieren un fenotipo de alta movilidad, con gran capacidad para adaptarse a nuevos entornos, ya sea en entorno sanguíneo, linfático o el propio tejido donde se formarán los nuevos nichos que albergarán las metástasis.

Está muy descrito en la bibliografía (D.-M. Fan, Qi, Gao, Chen, & Cheng, 2014; Liu et al., 2014; Zavadil & Böttinger, 2005) que existen un gran número de factores de crecimiento con la capacidad de inducir el proceso EMT, en células tumorales y a través de sus receptores específicos. En nuestros estudios, hemos observado que el TGFB1 induce EMT, y también hemos analizado que cuando la inducción la realizamos en presencia de EGF este proceso se ve aumentado, es decir pueden actuar en forma sinérgica.

También hemos observado que TGFB1 no solo estimula el proceso EMT, sino que también tiene la capacidad de iniciar la cascada apoptótica. En muestras donde solo la estimulación es realizada con TGFB1 se ve activada la vía extrínseca de la apoptosis por activación de caspasa 8 como iniciadora y caspasa 3/7 como caspasa efectora. Es importante aclarar que este estudio se ha realizado en células MCF7 que carecen de caspasa 3 y por lo tanto lo único observado por el kit de quimioluminiscencia es la actividad de caspasa 7.

Basándonos en nuestros resultados podemos decir que TGFB1 actúa de dos maneras en la célula, aduciendo EMT y/o apoptosis. Cuando incorporamos un factor de crecimiento, como puede ser EGF, este factor estimula la producción de factores antiapoptóticos, como puede ser BCL-1. Estos factores antiapoptóticos bloquean la señal de TGFB1 hacia la apoptosis y por consiguiente se consigue una canaliza la señal hacia el proceso EMT. En el siguiente esquema se puede observar de forma sencilla este proceso.

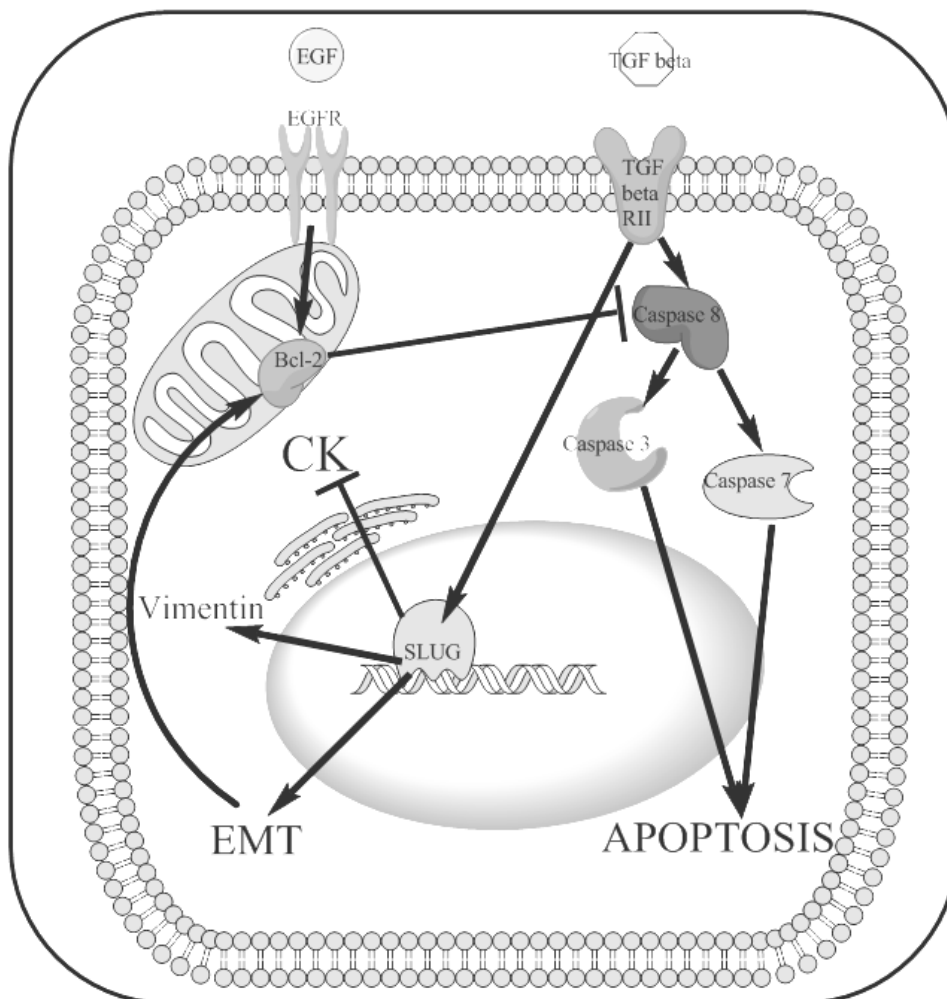


Figura 32. Representación simplificada de la interacción entre la ruta de señalización de TGFβRII y EGFR

Actualmente la mayoría de las técnicas utilizadas en la detección de CTCs, están basadas en la expresión de marcadores epiteliales. Como hemos

comentado anteriormente el proceso EMT es esencial para la migración y supervivencia de las células tumorales antes de la colonización de sitios diana, se sabe también que las células con fenotipo EMT son una importante subpoblación agresiva que puede no ser detectada con la utilización de estos marcadores epiteliales. Esto también puede explicar, la existencia de pacientes con muy mal pronóstico, que no presentan CTCs por las técnicas de detección estándares.

En este estudio, nosotros hemos evaluado la presencia de CTCs con marcadores EMT en un grupo de pacientes que fueron negativos para la detección de CTCs CK+ en el análisis basal.

También hemos encontrado que en estos pacientes existe una correlación entre la expresión de EGFR se correlaciona con la aparición de CTCs con fenotipo EMT. Observamos que el 27 % de las muestras negativas para CTCs CK +, fueron positivas para CTCs con fenotipo EMT. Esto se aproxima con los datos obtenidos por el grupo de Raimondi que obtuvo un 34 % en pacientes negativos para CTCs CK+ (Raimondi, Gianni, Cortesi, & Gazzaniga, 2010).

Algunos autores han relacionado la expresión de EGFR con un mal pronóstico en cáncer de mama y también se ha demostrado que la señalización de EGFR controla importantes procesos, relacionados con la proliferación celular, angiogénesis e inhibición de la apoptosis. Nosotros en nuestro trabajo, hemos encontrado relación estadísticamente significativa entre CTCs^{CK+EGFR+} y CTCs^{CK-VIM+SLUG+}. Algunos estudios recientes han detectado que en células de cáncer de mama con HER2 amplificado, se encuentra acompañado de una EMT a través de la activación de la ruta Wnt/ β -Catenina, generando transactivación de EGFR (Wu et al., 2012). De todos modos, ningún estudio

clínico ha sido llevado a cabo para relacionar las CTCs con fenotipo EMT y el estatus de EGFR. Nosotros hemos demostrado que la caracterización tumoral con EGFR en las CTCs, indica una posible inducción de EMT en las células tumorales, y por consiguiente un mayor número de CTCs con baja expresión de marcadores epiteliales y alta expresión de marcadores mesenquimales. Recientemente, se ha demostrado que las CTCs de pacientes con cáncer de mama en estadios metastásicos, tienen predominantemente fenotipo mesenquimal (Yu et al., 2013) y que EGF induce la sobreexpresión de Twist (Lo et al., 2007) (un importante factor de transcripción implicado en el proceso EMT). De todos modos, la complejidad de los procesos de diseminación, hacen necesarios futuros estudios para identificar poblaciones heterogéneas de CTCs que diseminan por la circulación.

En efecto, se han encontrado tres fenotipos diferentes de CTCs.

1º CTCs CK+ EGFR+ VIM- SLUG-

2º CTCs CK - EGFR +

3º CTCs CK- VIM+ SLUG+

En nuestro estudio hemos encontrado que, dependiendo del tratamiento, existe una variación del fenotipo de CTCs encontrado. Durante el tratamiento el número de CTCs disminuye considerablemente en la mayoría de los pacientes, independientemente de su fenotipo, y que en los casos en que el número de CTCs aumenta o se mantiene, la respuesta al tratamiento es insuficiente.

Fue muy importante detectar, también, que la gran mayoría de las pacientes con HER2+ y subtipo triple negativos, tenían heterogeneidad en sus CTCs, encontrándose en sus muestras de sangre CTCs con fenotipo epitelial y EMT (Chang et al., 2012). El reconocimiento del proceso EMT como mecanismo de

invasión y progresión de la enfermedad, puede llevar a la apertura de nuevos campos en el área del tratamiento individualizado, donde se generen fármacos con capacidad de bloquear este proceso.

Es necesario destacar, en el presente estudio, que existe un grupo de pacientes que no tenían CTCs de tipo epiteliales y que, por lo tanto, no han sido caracterizados para EGFR. También es importante observar que no se ha utilizado un método de enriquecimiento para marcadores EMT y que seguramente hay datos que estamos perdiendo. Aunque hemos observado una gran significancia en cuanto a las conclusiones dadas, en los siguientes estudios se realizará una búsqueda más directa de estas CTCs con fenotipo EMT y una mejor caracterización del Status de EGFR.

También es importante resaltar que el seguimiento de estas pacientes se está realizando en la actualidad y que no hay datos de sus recaídas, luego de haber finalizado con el tratamiento. Sería muy importante reevaluar estos datos en los próximos años, para poder apreciar si la aparición de alguno de estos fenotipos de CTCs pudiera pronosticar la recaída de las pacientes.

6.2. DISCUSIÓN RESPECTO LA DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN CON EGFR DE CTCS EN PACIENTES DE CANCER DE MAMA LOCALMENTE AVANZADO

En este trabajo se correlacionó la presencia de CTCs con datos clínico y anatomopatológicos de pacientes de cáncer de mama, localmente avanzado y con terapia neoadyuvante. Al observar los resultados de CTCs CK+ hemos observado que no había una buena correlación entre la presencia, la ausencia o el número de CTCs y la respuesta al tratamiento neoadyuvante. Esto es algo

que cabía de esperar debido a que son tumores que no presentan un elevado número de CTCs y que no han invadido en demasía tejidos adyacentes. Numerosos estudios, han demostrado que las CTCs tienen un gran valor pronóstico en cáncer de mama de estadíos metastásicos, pero nunca se ha probado su importancia en estadíos más tempranos, como es el caso de nuestro estudio. Algunos estudios clínicos con resultados similares a los obtenidos por nuestro grupo fueron: GEPAR-QUATTRO y el REMAGUS-02 donde se identifican CTCs durante el tratamiento neoadyuvante, en pacientes con cáncer de mama.

En este estudio fue necesaria la caracterización de las CTCs con EGFR y también fue necesario implementar una valoración de la respuesta por criterio citológico, establecido por nuestro grupo, denominado CyCaR. En este criterio se determinan des tipo de respuestas:

1º Buena respuesta cuando

- No se identifican CTCs antes y durante el tratamiento.
- Se identifican CTCs antes del tratamiento y no se identifican durante el tratamiento.
- El número de CTCs identificadas antes del tratamiento es menor que el numero identificado durante en tratamiento.

2º Mala respuesta cuando

- No se identifican CTCs antes del tratamiento y durante el tratamiento se identifican.
- El número de CTCs antes del tratamiento es igual al número de CTCs identificados durante el tratamiento.

- EL numero de CTCs es menor antes del tratamiento que el número de CTCs identificadas durante el tratamiento.

Luego de haber caracterizado con EGFR se observó que la aparición de CTCs CK+ EGFR+ determinaba una respuesta patológica completa. Por otra parte, se ha observado, también, que existe heterogeneidad en la expresión de EGFR en las CTCs y que esta heterogeneidad podría estar relacionada con una persistencia de la CTCs durante y al finalizar el tratamiento. También hemos observado que el tratamiento generalmente reduce el número de CTCs EGFR+ y selecciona, en alguna medida, la aparición de CTCs EGFR -. Creemos que la razón de incremento de la población de CTCs EGFR- podría ser debido a la selección de clones debido a la terapia.

Nuestros resultados sugieren que la identificación y caracterización específica de CTCs, podría ser una importante herramienta para la predicción o detección temprana de la respuesta. En nuestro caso el tratamiento con ACx4-taxotere4 fue más efectivo en pacientes que tenían CTCs EGFR+.

Analizando nuestros resultados y observando los resultados descritos en gran número de publicaciones, coincidimos con los expuesto por múltiples investigadores, que sugieren que la caracterización de las CTCs ayuda a entender de mejor manera el proceso metastásicos en cáncer de mama y que es una muy buena herramienta para la clasificación de los pacientes.

6.3. DISCUSIÓN RESPECTO DE LA SELECCIÓN DE CTCs CON FENOTIPO EMT CARACTERIZADAS CON VIM Y EGFR

En este estudio hemos utilizado dos proteínas para la identificación de CTCs con fenotipo EMT.

Luego de de un estudio previo se observó que existía una correlación importante entre la detección de CTCs^{CK-/VIM+/Slug+} y la detección de CTCs^{CK+/EGFR+} (Maria J Serrano et al., 2014). También se ha visto que los tumores que tienen amplificación de HER2 liberan a la circulación mayor número de CTCs^{CK+/EGFR+} y CTCs^{CK-/VIM+/SLUG+}. También se observó en estudios anteriores que, al caracterizar con EGFR las CTCs con fenotipo EMT, la gran mayoría presentaba un fenotipo EGFR+. Por esta razón se ha utilizado VIM para seleccionar las CTCs y EGFR como marcador de células proveniente de un fenotipo epitelial.

Para poder detectar CTCs con fenotipo epitelial y CTCs con fenotipo mesénquimal hemos diseñado una metodología, con la cual podemos detectar y caracterizar CTCs en estadio epitelial y en estadio EMT a partir de 10 ml. Esta nueva metodología permite también la utilización de tubos Cell Save®, los cuales son tubos diseñados para la estabilización de la muestra de sangre y la conservación de la misma durante periodos de hasta 72 hs. Un gran inconveniente de estos tubos, es que no permiten la unión de anticuerpos a caderina de la membrana celular (Bitting et al., 2013), con este impedimento, metodologías que utilizan N-caderina u OB-caderina limitan como marcadores de CTCs-EMT deben procesar sus muestras de sangre en un plazo no mayor a 12 hs luego de la extracción.

Los resultados obtenidos en la puesta a punto de la metodología, luego de un spike de células con inducción previa de EMT, demuestran que tienen una capacidad de recuperar de casi un 60% de las CTCs contenidas en sangre. Estos datos se asemejan a los descritos por otras metodología que solo detectan CTCs de tipo epitelial.

En muestras de pacientes y de individuos sanos, se ha observado que solo tener una grana especificidad, ya que el 100 % de los individuos sanos fue negativo para la detección de CTCs^{CK+} y de CTCs^{CK-/VIM+/EGFR+}; sin embargo en sangre de pacientes con cáncer mama se detectaron CTCs con ambos fenotipos.

Otra de las formas para identificar realmente, si las células semi-mesenquimales detectadas, provenían del tumor primario, fue la caracterización genotípica de estas células. Los análisis por FISH, para observar amplificación TOPO2/HER2, fueron realizados luego de la detección de CTCs^{CK-/VIM+/EGFR+}. Se observó que en un 60% de las CTCs existía amplificación de estos genes. Resultado con el cual, concluimos que las células detectadas provienen efectivamente del tumor.

Se observó también que el porcentaje detectado para TOPO2/HER2 fue mayor que lo que se esperaba, según se ha publicado en otros estudios (Slamon et al., 1987; Yan et al., 2015).

Interesantemente, según el fenotipo de CTCs presente en la sangre de mujeres con cáncer de mama, se puede clasificar a los pacientes en 4 grupos:

- Pacientes CTCs-
- Pacientes con CTCs CK+ y sin CTCs CK- VIM+ EGFR+
- Pacientes con CTCs CK+ y CTCs CK- VIM+ EGFR+
- Pacientes con CTCs CK- VIM+ EGFR+ y sin CTCs CK+

Con esta nueva metodología se identifican dos grupos más de pacientes, que podrían tener una evolución diferente de la enfermedad.

En nuestro estudio, no solo hemos demostrado la presencia de CTCs con fenotipo EMT que escapan a los métodos de selección con marcadores

epitelial, si no también y por primera vez, hemos relacionado la detección de este fenotipo semimesenquimal con la caracterización del tumor primario y con los datos anatomopatológicos en 64 pacientes.

Cuando se caracterizaron con EGFR, muestras tumorales conservadas en parafina, se observó que existía una gran correlación entre las células tumorales CK-/VIM+/EGFR+ y la sobreexpresión de EGFR en tumor primario. También se observó que los tumores que tenían amplificado HER2 neu, tenían gran expresión de EGFR y por lo tanto presentaban CTCs con fenotipo EMT.

En cuanto a la evolución de la respuesta, es importante mencionar, que a diferencia de lo esperado, los pacientes que tenían CTCs^{CK-/VIM+/EGFR+} fueron por lo general pacientes que respondieron bien a la terapia neoadyuvante, con lo cual resulta sorprendente que células con un fenotipo, descrito en la bibliografía, como maligno sea un marcador de buen pronóstico para la respuesta al tratamiento neoadyuvante.

Es importante mencionar también que es muy importante el seguimiento de estos pacientes, ya que en numerosos estudios (estudio EMT), se cree que las células con fenotipo EMT, tienen la capacidad de establecerse en medula ósea u en otros nichos, permaneciendo quiescentes hasta encontrar el momento propicio para restablecer el crecimiento tumoral. La reversión del proceso de durmancia celular puede estar dada por la suspensión del tratamiento antitumoral.

6.4. DISCUSIÓN RESPECTO DE DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN CON VEGFR DE CTCs^{CK+} EN PACIENTES CON CÁNCER DE COLON METASTÁSICO BAJO TRATAMIENTO DE FOLFOX Y BEVACIZUMAB

Respecto a la detección de CTCs en cáncer de colon metastásico es altamente conocido, en clínica, el valor pronóstico de las CTCs(O'Flaherty et al., 2012; Serrano Fernández et al., 2009).

En la presente tesis hemos realizado por primera vez un estudio prospectivo, en el cual se ha evaluado la importancia de la determinación de las CTCs en pacientes bajo tratamiento con FOLFOX y Bevacizumab(Carrato, 2008). Hemos observado, interesantemente, que en este estudio no se ha podido observar, significativamente, una mejor respuesta o mayor supervivencia de los pacientes sin CTCs antes del tratamiento. Esto contrasta en gran medida con los estudios de CTCs realizados hasta la fecha, en cáncer de colon metastásico (Brenner et al., 2014; Konstantopoulos & Thomas, 2009; Meropol, 2009), teniendo en cuenta que un gran número de estudios realizados hasta la fecha son realizados en una población heterogénea respecto al tipo de tratamiento aplicado, es de esperar que, cuando la población es específica y de un número reducido existan este tipo de controversias.

Respecto a la detección y caracterización con VEGFR2 de CTCs en cáncer de colon metastásico bajo tratamiento de FOLFOX y Bevacizumab. Los resultados han demostrado una mejor respuesta de los pacientes con CTCs VEGFR2 que puede ser debido a que en el proceso tumoral existe un gran número de citoquinas, factores de crecimiento, hormonas y factores inflamatorios que intervienen en el microambiente tumoral (Kuntz et al.; Talbot, Bhattacharya, & Kuo, 2012; Yang, Pang, & Moses, 2010). Muchos de ellos son secretados por

las células tumorales, por células del parénquima y por células del sistema inmune. La unión de estos factores a las células diana y el posterior efecto depende del tipo celular y del grado de expresión de receptores específicos (Imoukhuede & Popel, 2014; Jayasinghe, Simiantonaki, Habedank, & Kirkpatrick, 2015).

La terapia con Bevacizumab es una terapia inmunológica que utiliza el anticuerpo humanizado anti VEGF A, esta terapia consigue bloquear la unión específica del ligando a su receptor VEGFR 1 y VEGFR 2 (Barbarroja, Velasco, & López-Pedrerá, 2008). Esta terapia tiene como objetivo bloquear la inducción de nueva angiogénesis tumoral, evitando de esta manera la aparición de nuevos vasos sanguíneos que actuarían de causas para irrigar el tumor y aportar de esta manera los nutrientes necesarios que las células tumorales necesitan.

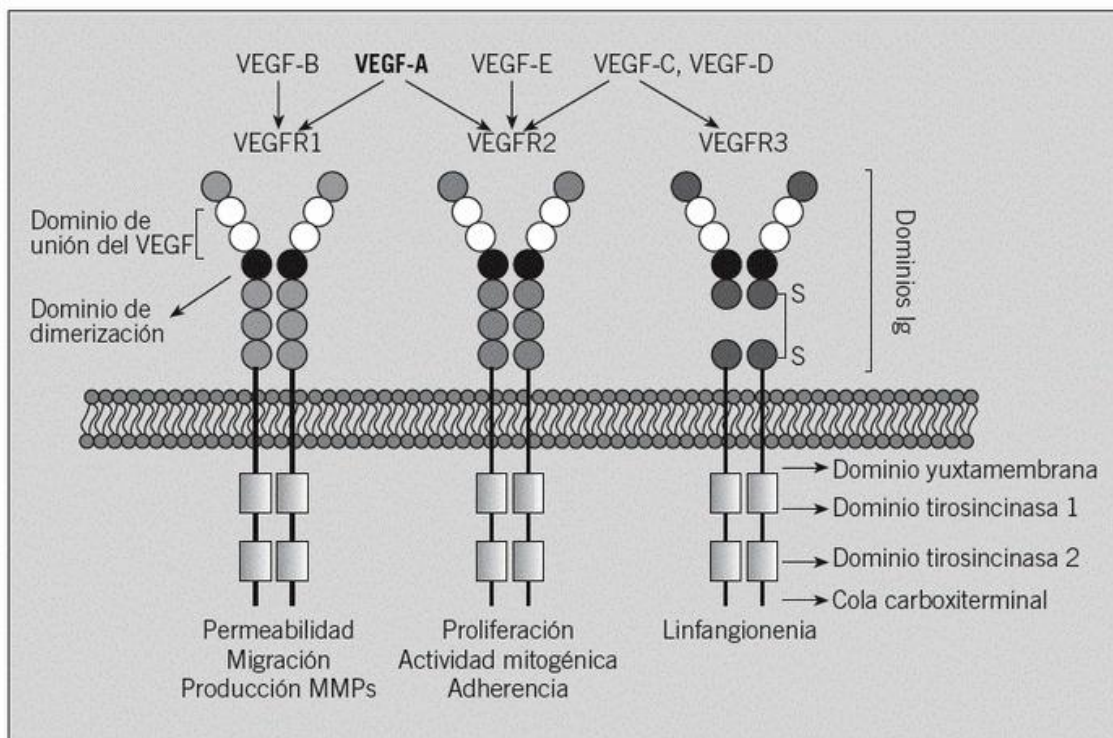


Figura 33. Principales tipos de VEGFR y sus correspondientes ligandos (Barbarroja et al., 2008)

Las células tumorales de cáncer de colon pueden expresar VEGFR2, la activación de este receptor puede activar diferentes rutas de señalización.

Entre las rutas de señalización encontramos:

- Aumento en los niveles de IP3 por activación de PI3K con la consiguiente activación de akt/PKB, lo cual genera un aumento en la supervivencia celular, con bloqueo de la apoptosis inducida por caspasa9 aumentando así la supervivencia celular (Engelman et al., 2006).
- Activación de la ruta de MAKK 3/6 y p38, lo que genera un aumento en la reorganización de Actina y por consiguiente un aumento en movilidad celular (Tremblay, Huot, & Auger, 2008).
- Estimulación de los genes RAS, que activa a Raf1, MEK 1/2 y ERK1/2 con el consiguiente aumento de la proliferación celular (De Roock, De Vriendt, Normanno, Ciardiello, & Tejpar, 2011).

Teniendo en cuenta lo que desencadena la activación VEGFR2 en la célula tumoral, podemos decir que VEGFA es un gran inductor de resistencia al tratamiento quimioterápico (Shin et al., 2013; Valverde et al., 2015; Zhao et al., 2015).

Cuando aplicamos una terapia anti VEGFA combinada con un tratamiento quimioterápico como es FOLFOX, estamos bloqueando en cierta forma el mecanismo de quimio-resistencia, migración y proliferación de las células

tumorales. Este bloqueo genera un aumento de sensibilidad a la quimioterapia en los clones de células VEGFR positivas (Valverde et al., 2015; Zhao et al., 2015).

Con el planteamiento citado, podemos explicar lo observado en los resultados de este estudio.

Todos los análisis realizados en este estudio revelan la importancia del valor pronóstico de las CTCs^{CK+VEGFR+} en pacientes con cáncer de colon que son tratados con FOLFOX y bevacizumab. Consideramos importante postular que esta caracterización, podría también, ser utilizada como un componente para la determinación de la terapia a utilizar.

7. CONCLUSIONES

1. Las CTCs bajo el proceso EMT pueden ser detectadas en pacientes con cáncer de mama en estadios tempranos.
2. Un gran número de CTCs con fenotipo EMT, no son detectadas por los métodos basados en marcadores epiteliales.
3. El proceso EMT es potenciado en forma sinérgica cuando células tumorales son estimuladas con TGFB1 y EGF.
4. La presencia de CTCs en cáncer de mama localmente avanzado, tiene valor predictivo en cuanto a la valoración de respuesta al tratamiento. Por tanto, la potencial implementación del criterio CyCAR conjuntamente con los criterios convencionales, podría ser una buena y novedosa herramienta predictiva.
5. Los tumores HER2 + son los tumores que presentan un mayor número de CTCs.
6. Las CTCs con fenotipo EMT se pueden aislar de sangre utilizando VIM y EGFR como marcadores.
7. Los tumores EGFR+ generan CTCs con fenotipo EMT
8. En CTCs procedentes de pacientes de cáncer de colon pueden ser detectada la expresión de VEGFR2.
9. Las CTCs procedentes de pacientes con cáncer de colon metastásico presentan heterogeneidad en la expresión de VEGFR2, dando lugar a diferentes subpoblaciones de CTCs.
10. Los clones de CTCs ^{VEGFR2-} son refractarias al tratamiento con Bevacizumab.

- 11. Las pacientes con cáncer de colon metastásico con CTCs^{CK+VEGFR2+} tienen mejor pronóstico a 12 semanas que los pacientes con CTCs^{CK+VEGFR2-}, cuando son tratados con FOLFOX y Bevacizumab.**
- 12. En los pacientes tratados con FOLFOX-BEVACIZUMAB se detecta una selección de clones celulares negativos para la expresión de VEGFR2.**

8. BIBLIOGRAFÍA

- Adler, A., Aminalai, A., Aschenbeck, J., Drossel, R., Mayr, M., Scheel, M., ... Rösch, T. (2012). Latest generation, wide-angle, high-definition colonoscopes increase adenoma detection rate. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 10(2), 155–9. doi:10.1016/j.cgh.2011.10.026
- Aleksandrova, K., Pischon, T., Jenab, M., Bueno-de-Mesquita, H., Fedirko, V., Norat, T., ... Boeing, H. (2014). Combined impact of healthy lifestyle factors on colorectal cancer: a large European cohort study. *BMC Medicine*, 12(1), 168. doi:10.1186/s12916-014-0168-4
- Alix-Panabières, C. (2012). EPISPOT assay: detection of viable DTCs/CTCs in solid tumor patients. *Recent Results in Cancer Research. Fortschritte Der Krebsforschung. Progrès Dans Les Recherches Sur Le Cancer*, 195, 69–76. doi:10.1007/978-3-642-28160-0_6
- Allard, W. J., Matera, J., Miller, M. C., Repollet, M., Connelly, M. C., Rao, C., ... Terstappen, L. W. M. M. (2004). Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(20), 6897–904. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0378
- Al-Sohaily, S., Biankin, A., Leong, R., Kohonen-Corish, M., & Warusavitarne, J. (2012). Molecular pathways in colorectal cancer. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 27(9), 1423–31. doi:10.1111/j.1440-1746.2012.07200.x
- Anderloni, A., Jovani, M., Hassan, C., & Repici, A. (2014). Advances, problems, and complications of polypectomy. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 7, 285–96. doi:10.2147/CEG.S43084
- Anderson, G. L., Chlebowski, R. T., Aragaki, A. K., Kuller, L. H., Manson, J. E., Gass, M., ... Wactawski-Wende, J. (2012). Conjugated equine oestrogen and breast cancer incidence and mortality in postmenopausal women with hysterectomy: extended follow-up of the Women's Health Initiative randomised placebo-controlled trial. *The Lancet. Oncology*, 13(5), 476–86. doi:10.1016/S1470-2045(12)70075-X
- Babiker, F. A., De Windt, L. J., van Eickels, M., Grohe, C., Meyer, R., & Doevendans, P. A. (2002). Estrogenic hormone action in the heart: regulatory network and function. *Cardiovascular Research*, 53(3), 709–19.
- Bacelli, I., Schneeweiss, A., Riethdorf, S., Stenzinger, A., Schillert, A., Vogel, V., ... Trumpp, A. (2013). Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nature Biotechnology*, 31(6), 539–44. doi:10.1038/nbt.2576
- Bagnardi, V., Blangiardo, M., La Vecchia, C., & Corrao, G. (2001). Alcohol consumption and the risk of cancer: a meta-analysis. *Alcohol Research & Health: The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 25(4), 263–70.

- Baker, A.-M., Cereser, B., Melton, S., Fletcher, A. G., Rodriguez-Justo, M., Tadrous, P. J., ... Graham, T. A. (2014). Quantification of Crypt and Stem Cell Evolution in the Normal and Neoplastic Human Colon. *Cell Reports*, 8(4), 940–7. doi:10.1016/j.celrep.2014.07.019
- Barbarroja, N., Velasco, F., & López-Pedreira, C. (2008). Señalización intracelular de los procesos angiogénicos en oncohematología. *Medicina Clínica*, 130(15), 585–590. doi:10.1157/13119981
- Birch, J. M. (1990). The Li-Fraumeni cancer family syndrome. *The Journal of Pathology*, 161(1), 1–2. doi:10.1002/path.1711610102
- Bitting, R. L., Boominathan, R., Rao, C., Kemeny, G., Foulk, B., Garcia-Blanco, M. A., ... Armstrong, A. J. (2013). Development of a method to isolate circulating tumor cells using mesenchymal-based capture. *Methods (San Diego, Calif.)*, 64(2), 129–36. doi:10.1016/j.ymeth.2013.06.034
- Blanks, R. G., Moss, S. M., McGahan, C. E., Quinn, M. J., & Babb, P. J. (2000). Effect of NHS breast screening programme on mortality from breast cancer in England and Wales, 1990-8: comparison of observed with predicted mortality. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 321(7262), 665–9.
- Brenner, H., Kloor, M., & Pox, C. P. (2014). Colorectal cancer. *Lancet*, 383(9927), 1490–502. doi:10.1016/S0140-6736(13)61649-9
- Bruinvels, D. J., Stiggelbout, A. M., Kievit, J., van Houwelingen, H. C., Habbema, J. D., & van de Velde, C. J. (1994). Follow-up of patients with colorectal cancer. A meta-analysis. *Annals of Surgery*, 219(2), 174–82.
- Byler, S., Goldgar, S., Heerboth, S., Leary, M., Housman, G., Moulton, K., & Sarkar, S. (2014). Genetic and epigenetic aspects of breast cancer progression and therapy. *Anticancer Research*, 34(3), 1071–7.
- Cai, S., Li, Y., Ding, Y., Chen, K., & Jin, M. (2014). Alcohol drinking and the risk of colorectal cancer death: a meta-analysis. *European Journal of Cancer Prevention : The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 23(6), 532–9. doi:10.1097/CEJ.0000000000000076
- Calaf, G. M., Zepeda, A. B., Castillo, R. L., Figueroa, C. A., Arias, C., Figueroa, E., & Farías, J. G. (2015). Molecular aspects of breast cancer resistance to drugs (Review). *International Journal of Oncology*. doi:10.3892/ijo.2015.3055
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011). Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 10(6), 417–27. doi:10.1038/nrd3455
- Carrato, A. (2008). Adjuvant treatment of colorectal cancer. *Gastrointestinal Cancer Research : GCR*, 2(4 Suppl), S42–6.
- Chang, Z.-G., Wei, J.-M., Qin, C.-F., Hao, K., Tian, X.-D., Xie, K., ... Yang, Y.-M. (2012). Suppression of the epidermal growth factor receptor inhibits epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer PANC-1 cells. *Digestive Diseases and Sciences*, 57(5), 1181–9. doi:10.1007/s10620-012-2036-4

- Chang-Claude, J., Eby, N., & Becher, H. (1994). [The importance of genetic factors for development of breast cancer]. *Zentralblatt Für Gynäkologie*, 116(12), 660–9.
- Chen, W. Y., Rosner, B., Hankinson, S. E., Colditz, G. A., & Willett, W. C. (2011). Moderate alcohol consumption during adult life, drinking patterns, and breast cancer risk. *JAMA*, 306(17), 1884–90. doi:10.1001/jama.2011.1590
- Chen, Y. Q., Hsieh, J. T., Yao, F., Fang, B., Pong, R. C., Cipriano, S. C., & Krepulat, F. (1999). Induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest by DCC. *Oncogene*, 18(17), 2747–2754.
- Chung, D. C., & Rustgi, A. K. (2003). The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications. *Annals of Internal Medicine*, 138(7), 560–70.
- Ciardello, F., & Tortora, G. (2008). EGFR antagonists in cancer treatment. *The New England Journal of Medicine*, 358(11), 1160–74. doi:10.1056/NEJMra0707704
- Clemons, M., Danson, S., & Howell, A. (2002). Tamoxifen (“Nolvadex”): a review. *Cancer Treatment Reviews*, 28(4), 165–80.
- Coghlin, C., & Murray, G. I. (2010). Current and emerging concepts in tumour metastasis. *The Journal of Pathology*, 222(1), 1–15. doi:10.1002/path.2727
- Cooke, R., Jones, M. E., Cunningham, D., Falk, S. J., Gilson, D., Hancock, B. W., ... Swerdlow, A. J. (2013). Breast cancer risk following Hodgkin lymphoma radiotherapy in relation to menstrual and reproductive factors. *British Journal of Cancer*, 108(11), 2399–406. doi:10.1038/bjc.2013.219
- Couse, J. F., Lindzey, J., Grandien, K., Gustafsson, J. A., & Korach, K. S. (1997). Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology*, 138(11), 4613–21. doi:10.1210/endo.138.11.5496
- Creighton, C. J., Li, X., Landis, M., Dixon, J. M., Neumeister, V. M., Sjolund, A., ... Chang, J. C. (2009). Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(33), 13820–5. doi:10.1073/pnas.0905718106
- Cristofanilli, M., Budd, G. T., Ellis, M. J., Stopeck, A., Matera, J., Miller, M. C., ... Hayes, D. F. (2004). Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 351(8), 781–91. doi:10.1056/NEJMoa040766
- Croce, C. M. (2008). Oncogenes and cancer. *The New England Journal of Medicine*, 358(5), 502–11. doi:10.1056/NEJMra072367
- Dahlman-Wright, K., Cavailles, V., Fuqua, S. A., Jordan, V. C., Katzenellenbogen, J. A., Korach, K. S., ... Gustafsson, J.-A. (2006). International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacological Reviews*, 58(4), 773–81. doi:10.1124/pr.58.4.8

- DAVIS, H. H., SIMONS, M., & DAVIS, J. B. (1964). CYSTIC DISEASE OF THE BREAST: RELATIONSHIP TO CARCINOMA. *Cancer*, 17, 957–78.
- Davis, N. M., Sokolosky, M., Stadelman, K., Abrams, S. L., Libra, M., Candido, S., ... McCubrey, J. A. (2014). Deregulation of the EGFR/PI3K/PTEN/Akt/mTORC1 pathway in breast cancer: possibilities for therapeutic intervention. *Oncotarget*, 5(13), 4603–50.
- De Roock, W., De Vriendt, V., Normanno, N., Ciardiello, F., & Tejpar, S. (2011). KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *The Lancet Oncology*, 12(6), 594–603. doi:10.1016/S1470-2045(10)70209-6
- De Wijkerslooth, T. R., Stoop, E. M., Bossuyt, P. M., Mathus-Vliegen, E. M. H., Dees, J., Tytgat, K. M. A. J., ... Dekker, E. (2012). Adenoma detection with cap-assisted colonoscopy versus regular colonoscopy: a randomised controlled trial. *Gut*, 61(10), 1426–34. doi:10.1136/gutjnl-2011-301327
- Deroo, B. J., & Korach, K. S. (2006). Estrogen receptors and human disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(3), 561–70. doi:10.1172/JCI27987
- Desitter, I., Guerrouahen, B. S., Benali-Furet, N., Wechsler, J., Jänne, P. A., Kuang, Y., ... Cayre, Y. E. (2011). A new device for rapid isolation by size and characterization of rare circulating tumor cells. *Anticancer Research*, 31(2), 427–41.
- Duffy, S. W., Tabar, L., Vitak, B., Day, N. E., Smith, R. A., Chen, H. H. T., & Yen, M. F. A. (2003). The relative contributions of screen-detected in situ and invasive breast carcinomas in reducing mortality from the disease. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 39(12), 1755–60.
- Dupont, W. D., & Page, D. L. (1985). Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *The New England Journal of Medicine*, 312(3), 146–51. doi:10.1056/NEJM198501173120303
- Eliakim, R. (2013). Video capsule endoscopy of the small bowel. *Current Opinion in Gastroenterology*, 29(2), 133–9. doi:10.1097/MOG.0b013e32835bdc03
- Elliot, W. (2000). *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*.
- Engelman, J. A., Luo, J., & Cantley, L. C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews. Genetics*, 7(8), 606–19. doi:10.1038/nrg1879
- Epidemiology - Advanced Breast Cancer - NCBI Bookshelf. (n.d.). Retrieved July 3, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK61874/?report=reader>
- Fabian, C. J., & Kimler, B. F. (2005). Selective estrogen-receptor modulators for primary prevention of breast cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(8), 1644–55. doi:10.1200/JCO.2005.11.005

- Fan, D.-M., Qi, P.-W., Gao, S.-G., Chen, Y.-W., & Cheng, X.-L. (2014). TGF- β 1 mediates estrogen receptor-induced epithelial-to-mesenchymal transition in some tumor lines. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35(11), 11277–82. doi:10.1007/s13277-014-2166-8
- Fan, S., Wang, J., Yuan, R., Ma, Y., Meng, Q., Erdos, M. R., ... Rosen, E. M. (1999). BRCA1 inhibition of estrogen receptor signaling in transfected cells. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5418), 1354–6.
- Fearnhead, N. S. (2001). The ABC of APC. *Human Molecular Genetics*, 10(7), 721–733. doi:10.1093/hmg/10.7.721
- Fehm, T., Braun, S., Muller, V., Janni, W., Gebauer, G., Marth, C., ... Solomayer, E. (2006). A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation. *Cancer*, 107(5), 885–92. doi:10.1002/cncr.22076
- Ferlay, J., Parkin, D. M., & Steliarova-Foucher, E. (2010). Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 46(4), 765–81. doi:10.1016/j.ejca.2009.12.014
- Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 127(12), 2893–917. doi:10.1002/ijc.25516
- Folkerd, E., & Dowsett, M. (2013). Sex hormones and breast cancer risk and prognosis. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 22 Suppl 2, S38–43. doi:10.1016/j.breast.2013.07.007
- Frank, N. Y., Margaryan, A., Huang, Y., Schatton, T., Waaga-Gasser, A. M., Gasser, M., ... Frank, M. H. (2005). ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Research*, 65(10), 4320–33. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3327
- Friedl, P., & Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews. Cancer*, 3(5), 362–374.
- Gail, M. H., Brinton, L. A., Byar, D. P., Corle, D. K., Green, S. B., Schairer, C., & Mulvihill, J. J. (1989). Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *Journal of the National Cancer Institute*, 81(24), 1879–86.
- Gasparini, G., Longo, R., Torino, F., & Morabito, A. (2005). Therapy of breast cancer with molecular targeting agents. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 16 Suppl 4, iv28–36. doi:10.1093/annonc/mdi905
- Gertler, R., Rosenberg, R., Fuehrer, K., Dahm, M., Nekarda, H., & Siewert, J. R. (2003). Detection of circulating tumor cells in blood using an optimized density gradient centrifugation. *Recent Results in Cancer Research. Fortschritte Der Krebsforschung. Progrès Dans Les Recherches Sur Le Cancer*, 162, 149–55.

- Goel, H. L., & Mercurio, A. M. (2013). VEGF targets the tumour cell. *Nature Reviews. Cancer*, 13(12), 871–82. doi:10.1038/nrc3627
- Gray, S. (2003). Breast cancer and hormone-replacement therapy: the Million Women Study. *Lancet*, 362(9392), 1332; author reply 1332. doi:10.1016/S0140-6736(03)14598-9
- Greenlee, R. T., Murray, T., Bolden, S., & Wingo, P. A. Cancer statistics, 2000. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 50(1), 7–33.
- Griwatz, C., Brandt, B., Assmann, G., & Zänker, K. S. (1995). An immunological enrichment method for epithelial cells from peripheral blood. *Journal of Immunological Methods*, 183(2), 251–65.
- Groth, S., Krause, H., Behrendt, R., Hill, H., Börner, M., Bastürk, M., ... Rösch, T. (2012). Capsule colonoscopy increases uptake of colorectal cancer screening. *BMC Gastroenterology*, 12, 80. doi:10.1186/1471-230X-12-80
- Gupta, G. P., & Massagué, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 127(4), 679–95. doi:10.1016/j.cell.2006.11.001
- Hamilton, W., Round, A., Sharp, D., & Peters, T. J. (2005). Clinical features of colorectal cancer before diagnosis: a population-based case-control study. *British Journal of Cancer*, 93(4), 399–405. doi:10.1038/sj.bjc.6602714
- Hankey, B. F., Ries, L. A., Kosary, C. L., Feuer, E. J., Merrill, R. M., Clegg, L. X., & Edwards, B. K. (2000). Partitioning linear trends in age-adjusted rates. *Cancer Causes & Control: CCC*, 11(1), 31–5.
- Harb, W., Fan, A., Tran, T., Danila, D. C., Keys, D., Schwartz, M., & Ionescu-Zanetti, C. (2013). Mutational Analysis of Circulating Tumor Cells Using a Novel Microfluidic Collection Device and qPCR Assay. *Translational Oncology*, 6(5), 528–38.
- Harrison, L. E., Guillem, J. G., Paty, P., & Cohen, A. M. (1997). Preoperative carcinoembryonic antigen predicts outcomes in node-negative colon cancer patients: a multivariate analysis of 572 patients. *Journal of the American College of Surgeons*, 185(1), 55–9.
- Hollander, M. C., Blumenthal, G. M., & Dennis, P. A. (2011). PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. *Nature Reviews. Cancer*, 11(4), 289–301. doi:10.1038/nrc3037
- Hoon, D. S. B., Ferris, R., Tanaka, R., Chong, K. K., Alix-Panabières, C., & Pantel, K. (2011). Molecular mechanisms of metastasis. *Journal of Surgical Oncology*, 103(6), 508–17. doi:10.1002/jso.21690
- Hooper, S. B., Hill, A. D. K., Kennedy, S., Dijkstra, B., Kelly, L. M., McDermott, E. W. M., & O'Higgins, N. Tamoxifen as the primary treatment in elderly patients with breast cancer. *Irish Journal of Medical Science*, 171(1), 28–30.
- Hopp, T. A., Weiss, H. L., Hilsenbeck, S. G., Cui, Y., Allred, D. C., Horwitz, K. B., & Fuqua, S. A. W. (2004). Breast cancer patients with progesterone receptor PR-A-

- rich tumors have poorer disease-free survival rates. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(8), 2751–60.
- Horwitz, K. B., Sheridan, P. L., Wei, L. L., & Krett, N. L. (1990). Human progesterone receptors: synthesis, structure, and phosphorylation. *Progress in Clinical and Biological Research*, 322, 41–52.
- Hsieh, H. Ben, Marrinucci, D., Bethel, K., Curry, D. N., Humphrey, M., Krivacic, R. T., ... Nieva, J. (2006). High speed detection of circulating tumor cells. *Biosensors & Bioelectronics*, 21(10), 1893–9. doi:10.1016/j.bios.2005.12.024
- Huang, Z., Hankinson, S. E., Colditz, G. A., Stampfer, M. J., Hunter, D. J., Manson, J. E., ... Willett, W. C. (1997). Dual effects of weight and weight gain on breast cancer risk. *JAMA*, 278(17), 1407–11.
- Ignatiadis, M., & Dawson, S.-J. (2014). Circulating Tumor Cells and Circulating tumor DNA for precision medicine: Dream or reality? *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. doi:10.1093/annonc/mdu480
- Imoukhuede, P. I., & Popel, A. S. (2014). Quantitative fluorescent profiling of VEGFRs reveals tumor cell and endothelial cell heterogeneity in breast cancer xenografts. *Cancer Medicine*, 3(2), 225–244. doi:10.1002/cam4.188
- Incorvati, J. A., Shah, S., Mu, Y., & Lu, J. (2013). Targeted therapy for HER2 positive breast cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, 6, 38. doi:10.1186/1756-8722-6-38
- Janet E Joy, Edward E Penhoet, and D. B. P. I. of M. (US) and N. R. C. (US) C. on N. A. to E. D. and D. of B. C. (2005). *Saving Women's Lives - NCBI Bookshelf*.
- Janicke, F., Prechtel, A., Thomssen, C., Harbeck, N., Meisner, C., Untch, M., ... Schmitt, M. (2001). Randomized Adjuvant Chemotherapy Trial in High-Risk, Lymph Node-Negative Breast Cancer Patients Identified by Urokinase-Type Plasminogen Activator and Plasminogen Activator Inhibitor Type 1. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 93(12), 913–920. doi:10.1093/jnci/93.12.913
- Jayasinghe, C., Simiantonaki, N., Habedank, S., & Kirkpatrick, C. J. (2015). The relevance of cell type- and tumor zone-specific VEGFR-2 activation in locally advanced colon cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 34, 42. doi:10.1186/s13046-015-0162-5
- Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2007). The Epigenomics of Cancer. *Cell*.
- Kalluri, R., & Neilson, E. G. (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*.
- Karabacak, N. M., Spuhler, P. S., Fachin, F., Lim, E. J., Pai, V., Ozkumur, E., ... Toner, M. (2014). Microfluidic, marker-free isolation of circulating tumor cells from blood samples. *Nature Protocols*, 9(3), 694–710. doi:10.1038/nprot.2014.044

- Kari, C., Chan, T. O., Rocha de Quadros, M., & Rodeck, U. (2003). Targeting the epidermal growth factor receptor in cancer: apoptosis takes center stage. *Cancer Research*, 63(1), 1–5.
- Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., & Chambon, P. (1990). Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *The EMBO Journal*, 9(5), 1603–14.
- Kim, C. F. B., Jackson, E. L., Woolfenden, A. E., Lawrence, S., Babar, I., Vogel, S., ... Jacks, T. (2005). Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell*, 121(6), 823–35. doi:10.1016/j.cell.2005.03.032
- Kim, E., Coelho, D., & Blachier, F. (2013). Review of the association between meat consumption and risk of colorectal cancer. *Nutrition Research (New York, N.Y.)*, 33(12), 983–94. doi:10.1016/j.nutres.2013.07.018
- Kim, K.-M., Lee, E. J., Ha, S., Kang, S. Y., Jang, K.-T., Park, C. K., ... Odze, R. D. (2011). Molecular features of colorectal hyperplastic polyps and sessile serrated adenoma/polyps from Korea. *The American Journal of Surgical Pathology*, 35(9), 1274–86. doi:10.1097/PAS.0b013e318224cd2e
- Kim, M.-Y., Oskarsson, T., Acharyya, S., Nguyen, D. X., Zhang, X. H.-F., Norton, L., & Massagué, J. (2009). Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell*, 139(7), 1315–26. doi:10.1016/j.cell.2009.11.025
- Klymkowsky, M. W., & Savagner, P. (2009). Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *The American Journal of Pathology*, 174(5), 1588–1593.
- Knudson, A. G. (1996). Hereditary cancer: two hits revisited. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 122(3), 135–40.
- Konstantopoulos, K., & Thomas, S. N. (2009). Cancer cells in transit: the vascular interactions of tumor cells. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 11, 177–202. doi:10.1146/annurev-bioeng-061008-124949
- Krawczyk, N., Meier-Stiegen, F., Banys, M., Neubauer, H., Ruckhaeberle, E., & Fehm, T. (2014). Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in circulating tumor cells of breast cancer patients. *BioMed Research International*, 2014, 415721. doi:10.1155/2014/415721
- Krivacic, R. T., Ladanyi, A., Curry, D. N., Hsieh, H. B., Kuhn, P., Bergsrud, D. E., ... Bruce, R. H. (2004). A rare-cell detector for cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(29), 10501–4. doi:10.1073/pnas.0404036101
- Kuipers, E. J., Rösch, T., & Bretthauer, M. (2013). Colorectal cancer screening--optimizing current strategies and new directions. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 10(3), 130–42. doi:10.1038/nrclinonc.2013.12

- Kune, S., Kune, G. A., & Watson, L. F. (1987). Case-control study of alcoholic beverages as etiological factors: the Melbourne Colorectal Cancer Study. *Nutrition and Cancer*, 9(1), 43–56. doi:10.1080/01635588709513909
- Kuntz, K. M., Lansdorp-Vogelaar, I., Rutter, C. M., Knudsen, A. B., van Ballegooijen, M., Savarino, J. E., ... Zauber, A. G. A systematic comparison of microsimulation models of colorectal cancer: the role of assumptions about adenoma progression. *Medical Decision Making: An International Journal of the Society for Medical Decision Making*, 31(4), 530–9. doi:10.1177/0272989X11408730
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(3), 178–96.
- Lang, J. E., Wechsler, J. S., Press, M. F., & Tripathy, D. (2015). Molecular markers for breast cancer diagnosis, prognosis and targeted therapy. *Journal of Surgical Oncology*, 111(1), 81–90. doi:10.1002/jso.23732
- Lange, J. R., & Fabry, B. (2013). Cell and tissue mechanics in cell migration. *Experimental Cell Research*.
- Levin, E. R. (2005). Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 19(8), 1951–9. doi:10.1210/me.2004-0390
- Li, X., Huang, J., Yi, P., Bambara, R. A., Hilf, R., & Muyan, M. (2004). Single-chain estrogen receptors (ERs) reveal that the ERalpha/beta heterodimer emulates functions of the ERalpha dimer in genomic estrogen signaling pathways. *Molecular and Cellular Biology*, 24(17), 7681–94. doi:10.1128/MCB.24.17.7681-7694.2004
- Liaw, D., Marsh, D. J., Li, J., Dahia, P. L., Wang, S. I., Zheng, Z., ... Parsons, R. (1997). Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nature Genetics*, 16(1), 64–7. doi:10.1038/ng0597-64
- Liu, Z., Chen, X., Song, H., Wang, H., Zhang, G., Wang, H., ... Du, J. (2014). Snail regulated by PKC/GSK-3 β pathway is crucial for EGF-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) of cancer cells. *Cell and Tissue Research*, 358(2), 491–502. doi:10.1007/s00441-014-1953-2
- Livasy, C. A., Karaca, G., Nanda, R., Tretiakova, M. S., Olopade, O. I., Moore, D. T., & Perou, C. M. (2006). Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 19(2), 264–71. doi:10.1038/modpathol.3800528
- Lo, H.-W., Hsu, S.-C., Xia, W., Cao, X., Shih, J.-Y., Wei, Y., ... Hung, M.-C. (2007). Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression. *Cancer Research*, 67(19), 9066–76. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0575
- Lowes, L. E., Hedley, B. D., Keeney, M., & Allan, A. L. (2012). User-defined protein marker assay development for characterization of circulating tumor cells using the

CellSearch® system. *Cytometry. Part A : The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 81(11), 983–95. doi:10.1002/cyto.a.22158

- Lu, J., Fan, T., Zhao, Q., Zeng, W., Zaslavsky, E., Chen, J. J., ... Chen, W.-T. (2010). Isolation of circulating epithelial and tumor progenitor cells with an invasive phenotype from breast cancer patients. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 126(3), 669–83. doi:10.1002/ijc.24814
- Lynch, H. T., & de la Chapelle, A. (2003). Hereditary colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, 348(10), 919–32. doi:10.1056/NEJMra012242
- Ma, Y.-C., Wang, L., & Yu, F.-L. (2013). Recent Advances and Prospects in the Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells (ISET) Methodology. *Technology in Cancer Research and Treatment*, 12(4), 295–309. doi:10.7785/tcrt.2012.500328
- Markowitz, S. D., & Bertagnolli, M. M. (2009). Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, 361(25), 2449–2460.
- Mejean, A., Vona, G., Nalpas, B., Damotte, D., Brousse, N., Chretien, Y., ... Paterlini-Bréchet, P. (2000). Detection of circulating prostate derived cells in patients with prostate adenocarcinoma is an independent risk factor for tumor recurrence. *The Journal of Urology*, 163(6), 2022–9.
- Melchior, S. W., Corey, E., Ellis, W. J., Ross, A. A., Layton, T. J., Oswin, M. M., ... Vessella, R. L. (1997). Early tumor cell dissemination in patients with clinically localized carcinoma of the prostate. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 3(2), 249–56.
- Meropol, N. J. (2009). The significance of circulating tumor cells as prognostic markers for colon cancer. *Clinical Advances in Hematology & Oncology : H&O*, 7(4), 247–8.
- Miller, E., Lee, H. J., Lulla, A., Hernandez, L., Gokare, P., & Lim, B. (2014). Current treatment of early breast cancer: adjuvant and neoadjuvant therapy. *F1000Research*, 3, 198. doi:10.12688/f1000research.4340.1
- Mimeault, M., & Batra, S. K. (2010a). New promising drug targets in cancer- and metastasis-initiating cells. *Drug Discovery Today*, 15(9-10), 354–64. doi:10.1016/j.drudis.2010.03.009
- Mimeault, M., & Batra, S. K. (2010b). Novel therapies against aggressive and recurrent epithelial cancers by molecular targeting tumor- and metastasis-initiating cells and their progenies. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 10(2), 137–51.
- Mimeault, M., & Batra, S. K. (2013). Hypoxia-inducing factors as master regulators of stemness properties and altered metabolism of cancer- and metastasis-initiating cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17(1), 30–54. doi:10.1111/jcmm.12004
- Mimeault, M., & Batra, S. K. (2014). Molecular biomarkers of cancer stem/progenitor cells associated with progression, metastases, and treatment resistance of aggressive cancers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A*

Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 23(2), 234–54. doi:10.1158/1055-9965.EPI-13-0785

- Mocellin, S., Keilholz, U., Rossi, C. R., & Nitti, D. (2006). Circulating tumor cells: the “leukemic phase” of solid cancers. *Trends in Molecular Medicine, 12*(3), 130–9. doi:10.1016/j.molmed.2006.01.006
- Mocellin, S., Lise, M., & Nitti, D. (2005). Targeted therapy for colorectal cancer: mapping the way. *Trends in Molecular Medicine, 11*(7), 327–35. doi:10.1016/j.molmed.2005.05.002
- Mohsin, S. K., Weiss, H., Havighurst, T., Clark, G. M., Berardo, M., Roanh, L. D., ... Allred, D. C. (2004). Progesterone receptor by immunohistochemistry and clinical outcome in breast cancer: a validation study. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc, 17*(12), 1545–54. doi:10.1038/modpathol.3800229
- Moran, a, Ortega, P., de Juan, C., Fernandez-Marcelo, T., Frias, C., Sanchez-Pernaute, a, ... Benito, M. (2010). Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World Journal of Gastrointestinal Oncology, 2*(3), 151–158. doi:10.4251/wjgo.v2.i3.151
- Morán, A., Ortega, P., de Juan, C., Fernández-Marcelo, T., Frías, C., Sánchez-Pernaute, A., ... Benito, M. (2010). Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World Journal of Gastrointestinal Oncology, 2*(3), 151–158.
- Mordant, P., Lorient, Y., Lahon, B., Castier, Y., Lesèche, G., Soria, J. C., ... Deutsch, E. (2012). Minimal residual disease in solid neoplasia: New frontier or red-herring? *Cancer Treatment Reviews*.
- Mortalidad de cáncer en España. (2012). *ISC III*. Retrieved July 2, 2015, from <http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-epidemiologia-ambiental-y-cancer/mortalidad-cancer-en-espana.shtml>
- Nadal, R., Fernandez, A., Sanchez-Rovira, P., Salido, M., Rodríguez, M., García-Puche, J. L., ... Serrano, M. J. (2012). Biomarkers characterization of circulating tumour cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Research: BCR, 14*(3), R71. doi:10.1186/bcr3180
- Nadal, R., Ortega, F. G., Salido, M., Lorente, J. A., Rodríguez-Rivera, M., Delgado-Rodríguez, M., ... Serrano, M. J. (2013). CD133 expression in circulating tumor cells from breast cancer patients: potential role in resistance to chemotherapy. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer, 133*(10), 2398–407. doi:10.1002/ijc.28263
- Nieto, M. A. (2010). The Ins and Outs of the Epithelial to Mesenchymal Transition in Health and Disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology, (July)*, 1–30. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154036

- Norman, A. W., Mizwicki, M. T., & Norman, D. P. G. (2004). Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 3(1), 27–41. doi:10.1038/nrd1283
- O'Flaherty, J. D., Gray, S., Richard, D., Fennell, D., O'Leary, J. J., Blackhall, F. H., & O'Byrne, K. J. (2012). Circulating tumour cells, their role in metastasis and their clinical utility in lung cancer. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 76(1), 19–25. doi:10.1016/j.lungcan.2011.10.018
- Ogston, K. N., Miller, I. D., Payne, S., Hutcheon, A. W., Sarkar, T. K., Smith, I., ... Heys, S. D. (2003). A new histological grading system to assess response of breast cancers to primary chemotherapy: prognostic significance and survival. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 12(5), 320–7.
- Oort, F. A., Terhaar Sive Droste, J. S., Van Der Hulst, R. W. M., Van Heukelem, H. A., Loffeld, R. J. L. F., Wesdorp, I. C. E., ... Mulder, C. J. J. (2010). Colonoscopy-controlled intra-individual comparisons to screen relevant neoplasia: faecal immunochemical test vs. guaiac-based faecal occult blood test. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 31(3), 432–9. doi:10.1111/j.1365-2036.2009.04184.x
- Ottman, R., Pike, M. C., King, M. C., & Henderson, B. E. (1983). Practical guide for estimating risk for familial breast cancer. *Lancet*, 2(8349), 556–8.
- Otto, S. J., Fracheboud, J., Looman, C. W. N., Broeders, M. J. M., Boer, R., Hendriks, J. H. C. L., ... de Koning, H. J. (2003). Initiation of population-based mammography screening in Dutch municipalities and effect on breast-cancer mortality: a systematic review. *Lancet*, 361(9367), 1411–7. doi:10.1016/S0140-6736(03)13132-7
- Owens, M. A., Horten, B. C., & Da Silva, M. M. (2004). HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. *Clinical Breast Cancer*, 5(1), 63–9.
- Pantel, K., & Brakenhoff, R. H. (2004). Dissecting the metastatic cascade. *Nature Reviews. Cancer*, 4(6), 448–56. doi:10.1038/nrc1370
- Pantel, K., Müller, V., Auer, M., Nusser, N., Harbeck, N., & Braun, S. (2003). Detection and clinical implications of early systemic tumor cell dissemination in breast cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 9(17), 6326–34.
- Penault-Llorca, F., Etessami, A., & Bourhis, J. (2002). [Principal therapeutic uses of monoclonal antibodies in oncology]. *Cancer Radiothérapie : Journal de La Société Française de Radiothérapie Oncologique*, 6 Suppl 1, 24s–28s.
- Pinzani, P., Salvadori, B., Simi, L., Bianchi, S., Distante, V., Cataliotti, L., ... Orlando, C. (2006). Isolation by size of epithelial tumor cells in peripheral blood of patients with breast cancer: correlation with real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction results and feasibility of molecular analysis by laser microdissection. *Human Pathology*, 37(6), 711–8. doi:10.1016/j.humpath.2006.01.026

- Potter, J. D., & McMichael, A. J. (1986). Diet and cancer of the colon and rectum: a case-control study. *Journal of the National Cancer Institute*, 76(4), 557–69.
- Practice guideline for the breast conservation therapy in the management of invasive breast carcinoma. (2007). *Journal of the American College of Surgeons*, 205(2), 362–376. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2007.02.057
- Raimondi, C., Gianni, W., Cortesi, E., & Gazzaniga, P. (2010). Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: revisiting minimal residual disease. *Current Cancer Drug Targets*, 10(5), 496–508.
- Real, P. J., Sierra, A., De Juan, A., Segovia, J. C., Lopez-Vega, J. M., & Fernandez-Luna, J. L. (2002). Resistance to chemotherapy via Stat3-dependent overexpression of Bcl-2 in metastatic breast cancer cells. *Oncogene*, 21(50), 7611–8. doi:10.1038/sj.onc.1206004
- Reiss, M. (1989). Prognostic factors in primary breast cancer. *Connecticut Medicine*, 53(10), 565–71.
- Rhim, A. D., Mirek, E. T., Aiello, N. M., Maitra, A., Bailey, J. M., McAllister, F., ... Stanger, B. Z. (2012). EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell*, 148(1-2), 349–61. doi:10.1016/j.cell.2011.11.025
- RIENIETS, J. H., & BRODERS, A. C. (1945). Gastric adenomas; a pathologic study. *Western Journal of Surgery, Obstetrics, and Gynecology*, 53, 433–44.
- Riethdorf, S., Fritsche, H., Müller, V., Rau, T., Schindlbeck, C., Rack, B., ... Pantel, K. (2007). Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(3), 920–8. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1695
- Rosner, B., & Colditz, G. A. (1996). Nurses' health study: log-incidence mathematical model of breast cancer incidence. *Journal of the National Cancer Institute*, 88(6), 359–64.
- Rouviere, H. (1959). *Compendio de anatomía y disección*. Elsevier España.
- Rudolph, A., Shi, H., Försti, A., Hoffmeister, M., Sainz, J., Jansen, L., ... Chang-Claude, J. (2014). Repeat polymorphisms in ESR2 and AR and colorectal cancer risk and prognosis: results from a German population-based case-control study. *BMC Cancer*, 14, 817. doi:10.1186/1471-2407-14-817
- Segnan, N., Senore, C., Andreoni, B., Arrigoni, A., Bisanti, L., Cardelli, A., ... Zappa, M. (2005). Randomized trial of different screening strategies for colorectal cancer: patient response and detection rates. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(5), 347–57. doi:10.1093/jnci/dji050
- Sell, S. (2003). Tumor Markers: Physiology, Pathobiology, Technology and Clinical Applications. Eleftherios P. Diamandis, Hervert A. Fritche, Hans Lilja, Daniel W. Chan, and Morton K. Schwartz, eds. Washington, DC: AACCC Press, 2002, 513 pp., \$99.00 (\$79.00 AACCC members), . *Clinical Chemistry*, 49(2), 342–342. doi:10.1373/49.2.342

- Serrano Fernández, M. J., Alvarez Merino, J. C., Martínez Zubiaurre, I., Fernández García, A., Sánchez Rovira, P., & Lorente Acosta, J. A. (2009). Clinical relevance associated to the analysis of circulating tumour cells in patients with solid tumours. *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 11(10), 659–68.
- Serrano, M. J., Nadal, R., Lorente, J. A., Salido, M., Rodríguez, R., Rodríguez, M., ... Solé, F. (2011). Circulating cancer cells in division in an early breast cancer patient. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 22(9), 2150–1. doi:10.1093/annonc/mdr322
- Serrano, M. J., Ortega, F. G., Alvarez-Cubero, M. J., Nadal, R., Sanchez-Rovira, P., Salido, M., ... Lorente, J. A. (2014). EMT and EGFR in CTCs cytokeatin negative non-metastatic breast cancer. *Oncotarget*, 5(17), 7486–97.
- Serrano, M. J., Sánchez-Rovira, P., Delgado-Rodríguez, M., & Gaforio, J. J. (2009). Detection of circulating tumor cells in the context of treatment: prognostic value in breast cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 8(8), 671–5.
- Shchors, K., & Evan, G. (2007). Tumor angiogenesis: Cause or consequence of cancer? *Cancer Research*.
- Shin, S. J., Hwang, J. W., Ahn, J. B., Rha, S. Y., Roh, J. K., & Chung, H. C. (2013). Circulating vascular endothelial growth factor receptor 2/pAkt-positive cells as a functional pharmacodynamic marker in metastatic colorectal cancers treated with antiangiogenic agent. *Investigational New Drugs*, 31(1), 1–13. doi:10.1007/s10637-012-9817-7
- Shiomi-Mouri, Y., Kousaka, J., Ando, T., Tetsuka, R., Nakano, S., Yoshida, M., ... Kobayashi, K. (2014). Clinical significance of circulating tumor cells (CTCs) with respect to optimal cut-off value and tumor markers in advanced/metastatic breast cancer. *Breast Cancer (Tokyo, Japan)*. doi:10.1007/s12282-014-0539-x
- Singletary, S. E., Allred, C., Ashley, P., Bassett, L. W., Berry, D., Bland, K. I., ... Greene, F. L. (2002). Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 20(17), 3628–36.
- Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., & McGuire, W. L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science (New York, N. Y.)*, 235(4785), 177–82.
- Sonnenschein, E., Toniolo, P., Terry, M. B., Bruning, P. F., Kato, I., Koenig, K. L., & Shore, R. E. (1999). Body fat distribution and obesity in pre- and postmenopausal breast cancer. *International Journal of Epidemiology*, 28(6), 1026–31.
- Spada, C., Hassan, C., Marmo, R., Petruzzello, L., Riccioni, M. E., Zullo, A., ... Costamagna, G. (2010). Meta-analysis shows colon capsule endoscopy is effective in detecting colorectal polyps. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 8(6), 516–22. doi:10.1016/j.cgh.2010.02.018

- Srivastava, A., McKinnon, W., & Wood, M. E. (2001). Risk of breast and ovarian cancer in women with strong family histories. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, *15*(7), 889–902; discussion 902, 905–7, 911–13.
- Struewing, J. P., Hartge, P., Wacholder, S., Baker, S. M., Berlin, M., McAdams, M., ... Tucker, M. A. (1997). The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *The New England Journal of Medicine*, *336*(20), 1401–8. doi:10.1056/NEJM199705153362001
- Sturgeon, C. M., Duffy, M. J., Stenman, U.-H., Lilja, H., Brünner, N., Chan, D. W., ... Diamandis, E. P. (2008). National Academy of Clinical Biochemistry laboratory medicine practice guidelines for use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast, and ovarian cancers. *Clinical Chemistry*, *54*(12), e11–79. doi:10.1373/clinchem.2008.105601
- Sukocheva, O. A., Yang, Y., & Gierthy, J. F. (2009). Estrogen and progesterone interactive effects in postconfluent MCF-7 cell culture. *Steroids*, *74*(4-5), 410–418. doi:10.1016/j.steroids.2008.12.010
- T R Ashworth. (1869). case of cancer in wich cells similar to those in tumours were seen in the blood after death. *Australian Medical Journal*, *14*, 146–7.
- Talbot, L. J., Bhattacharya, S. D., & Kuo, P. C. (2012). Epithelial-mesenchymal transition, the tumor microenvironment, and metastatic behavior of epithelial malignancies. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, *3*(2), 117–36.
- Thibault, C., Khodari, W., Lequoy, M., Gligorov, J., & Belkacémi, Y. (2013). HER2 status for prognosis and prediction of treatment efficacy in adenocarcinomas: a review. *Critical Reviews in Oncology/hematology*, *88*(1), 123–33. doi:10.1016/j.critrevonc.2013.03.003
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, *139*(5), 871–90. doi:10.1016/j.cell.2009.11.007
- Thomson, C. A., McCullough, M. L., Wertheim, B. C., Chlebowski, R. T., Martinez, M. E., Stefanick, M. L., ... Neuhouser, M. L. (2014). Nutrition and physical activity cancer prevention guidelines, cancer risk, and mortality in the women's health initiative. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, *7*(1), 42–53. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-13-0258
- Toloudi, M., Apostolou, P., Chatziioannou, M., & Papasotiriou, I. (2011). Correlation between Cancer Stem Cells and Circulating Tumor Cells and Their Value. *Case Reports in Oncology*, *4*(1), 44–54. doi:10.1159/000324403
- Tremblay, P.-L., Huot, J., & Auger, F. A. (2008). Mechanisms by which E-selectin regulates diapedesis of colon cancer cells under flow conditions. *Cancer Research*, *68*(13), 5167–76. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1229
- Uhr, J. W. (2007). Cancer diagnostics: one-stop shop. *Nature*, *450*(7173), 1168–9. doi:10.1038/4501168a

- Valverde, A., Peñarando, J., Cañas, A., López-Sánchez, L. M., Conde, F., Hernández, V., ... Rodríguez-Ariza, A. (2015). Simultaneous inhibition of EGFR/VEGFR and cyclooxygenase-2 targets stemness-related pathways in colorectal cancer cells. *PloS One*, *10*(6), e0131363. doi:10.1371/journal.pone.0131363
- Weber, C. E., Li, N. Y., Wai, P. Y., & Kuo, P. C. (2012). Epithelial-Mesenchymal Transition, TGF- β , and Osteopontin in Wound Healing and Tissue Remodeling After Injury. *Journal of Burn Care & Research*.
- Weigelt, B., Peterse, J. L., & van 't Veer, L. J. (2005). Breast cancer metastasis: markers and models. *Nature Reviews. Cancer*, *5*(8), 591–602. doi:10.1038/nrc1670
- Weitz, J., Koch, M., Debus, J., Höhler, T., Galle, P. R., & Büchler, M. W. (2014). Colorectal cancer. *Lancet*, *365*(9454), 153–65. doi:10.1016/S0140-6736(05)17706-X
- Willett, W. C. Nutrition and cancer. *Salud Pública de México*, *39*(4), 298–309.
- World Journal of Methodology-Baishideng Publishing. (n.d.). Retrieved October 27, 2014, from <http://www.wjgnet.com/2222-0682/full/v4/i2/59.htm>
- Worthley, D. L., Whitehall, V. L., Spring, K. J., & Leggett, B. A. (2007). Colorectal carcinogenesis: Road maps to cancer. *World Journal of Gastroenterology*.
- Wu, Y., Ginther, C., Kim, J., Mosher, N., Chung, S., Slamon, D., & Vadgama, J. V. (2012). Expression of Wnt3 activates Wnt/ β -catenin pathway and promotes EMT-like phenotype in trastuzumab-resistant HER2-overexpressing breast cancer cells. *Molecular Cancer Research : MCR*, *10*(12), 1597–606. doi:10.1158/1541-7786.MCR-12-0155-T
- Xie, W., Rimm, D. L., Lin, Y., Shih, W. J., & Reiss, M. (2003). Loss of Smad signaling in human colorectal cancer is associated with advanced disease and poor prognosis. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, *9*(4), 302–12.
- Yaghmaie, F., Saeed, O., Garan, S. A., Freitag, W., Timiras, P. S., & Sternberg, H. (2005). Caloric restriction reduces cell loss and maintains estrogen receptor-alpha immunoreactivity in the pre-optic hypothalamus of female B6D2F1 mice. *Neuro Endocrinology Letters*, *26*(3), 197–203.
- Yan, M., Schwaederle, M., Arguello, D., Millis, S. Z., Gatalica, Z., & Kurzrock, R. (2015). HER2 expression status in diverse cancers: review of results from 37,992 patients. *Cancer Metastasis Reviews*, *34*(1), 157–64. doi:10.1007/s10555-015-9552-6
- Yang, L., Pang, Y., & Moses, H. L. (2010). TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends in Immunology*, *31*(6), 220–7. doi:10.1016/j.it.2010.04.002
- Yoon, S.-O., Park, S.-J., Yun, C.-H., & Chung, A.-S. (2003). Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, *36*(1), 128–137.

- Young, G. P., & Bosch, L. J. W. (2011). Fecal Tests: From Blood to Molecular Markers. *Current Colorectal Cancer Reports*, 7(1), 62–70. doi:10.1007/s11888-010-0084-8
- Young, J., Simms, L. A., Biden, K. G., Wynter, C., Whitehall, V., Karamatic, R., ... Jass, J. R. (2001). Features of colorectal cancers with high-level microsatellite instability occurring in familial and sporadic settings: parallel pathways of tumorigenesis. *The American Journal of Pathology*, 159(6), 2107–16. doi:10.1016/S0002-9440(10)63062-3
- Yu, M., Bardia, A., Wittner, B. S., Stott, S. L., Smas, M. E., Ting, D. T., ... Maheswaran, S. (2013). Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6119), 580–4. doi:10.1126/science.1228522
- Yusa, A., Toneri, M., Masuda, T., Ito, S., Yamamoto, S., Okochi, M., ... Nakanishi, H. (2014). Development of a new rapid isolation device for circulating tumor cells (CTCs) using 3D palladium filter and its application for genetic analysis. *PloS One*, 9(2), e88821. doi:10.1371/journal.pone.0088821
- Zavadil, J., & Böttinger, E. P. (2005). TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene*, 24(37), 5764–74. doi:10.1038/sj.onc.1208927
- Zhao, D., Pan, C., Sun, J., Gilbert, C., Drews-Elger, K., Azzam, D. J., ... Slingerland, J. M. (2015). VEGF drives cancer-initiating stem cells through VEGFR-2/Stat3 signaling to upregulate Myc and Sox2. *Oncogene*, 34(24), 3107–19. doi:10.1038/onc.2014.257
- Zheng, S., Lin, H., Liu, J.-Q., Balic, M., Datar, R., Cote, R. J., & Tai, Y.-C. (2007). Membrane microfilter device for selective capture, electrolysis and genomic analysis of human circulating tumor cells. *Journal of Chromatography. A*, 1162(2), 154–61. doi:10.1016/j.chroma.2007.05.064