

Detección inmunomagnética de células tumorales circulantes en cáncer de mama metastásico: nuevas tecnologías

Immunomagnetic Detection of Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer: New Technologies

Luz F. Sua^{1,2}, Nhora M. Silva³, Marta Vidaurreta⁴, María L. Maestro⁴, Sara R. Fernández⁴, Silvia Veganzones⁴, Virginia de la Orden⁴, José M. Román⁵

1 Departamento de Anatomía y Patología Clínica, Universidad del Valle, Cali, Colombia

2 Unidad Oncológica, Clínica de Occidente S. A., Colombia

3 Laboratorio Clínico y de Patología, Fundación Clínica Valle del Lili, Cali, Colombia

4 Servicio de Ginecología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, España

5 Laboratorio de Análisis Clínicos, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, España

Resumen

Las metástasis hematógenas son la mayor causa de mortalidad en el cáncer de mama. Está documentado que una vez las células tumorales se diseminan el resultado es, generalmente, letal. Las células tumorales circulantes han sido consideradas por largo tiempo un reflejo de la agresividad de los tumores, y entre ellos uno de los más agresivos es el cáncer de mama metastásico. Los primeros resultados clínicos han permitido determinar una fuerte relación entre la detección y el número de las células tumorales circulantes, como un valor pronóstico y como marcador de la actividad antitumoral del tratamiento. El análisis inmunomagnético utilizando una nueva metodología permite determinar que un recuento de 5 células tumorales circulantes o más en 7,5 ml de sangre, en cualquier fase de la enfermedad, se asocia a un mal pronóstico, y es predictivo de una supervivencia global más corta.

Palabras clave: Células tumorales circulantes, cáncer de mama, inmunomagnetismo y metástasis.

Abstract

Hematogenous metastasis is the major cause of mortality in breast cancer. Evidence indicates that tumor cells escape from the primary tumor mass into the blood stream and that these disseminated cells are the source of increased lethality. Circulating or metastatic tumour cells have been considered as useful indicators of the aggressiveness of breast cancer tumours. The first clinical results obtained with such assays strongly suggest that in metastatic breast cancer, circulating tumour cells detection and enumeration can be used to estimate prognosis and may serve as an early marker to assess anti-tumour activity of a treatment. Immunomagnetic analysis using a new methodology, determine that a circulating tumour cells count of 5 or more per 7,5 ml of blood, at any time during the course of the disease is associated with a poor prognosis and is predictive of shorter progression and overall survival.

Key words: Circulating tumour cells, breast cancer, immunomagnetic and metastasis.

Correspondencia

Luz Fernanda Sua Villegas, Departamento de Patología, Facultad de Salud, Universidad del Valle. Calle 4ª B No. 36-00, edificio 116, piso 4º. Laboratorio de Patología Molecular. Cali, Colombia.

Teléfono: (052) 3212100, ext. 4126

Correo electrónico: lufer24@hotmail.com

Fecha de recepción: 9 de diciembre del 2010. Fecha de aprobación: 10 de mayo del 2011

El cáncer de mama es uno de los problemas de salud más importantes actualmente, por su alta incidencia y prevalencia; es el tumor más común entre las mujeres en todo el mundo. Casi la mitad de las pacientes con cáncer de mama localizado y tratadas con cirugía radical sufrirán recidiva, un riesgo que se intenta reducir sometiendo a la paciente a tratamiento de quimioterapia tras la intervención quirúrgica.

Las metástasis y la invasión son las principales causas de morbimortalidad relacionada con el cáncer de mama. Muchos de estos tumores aumentan su agresividad y adquieren un mayor potencial maligno a lo largo de su evolución en el tiempo. A pesar de que este tumor es aparentemente monoclonal, está compuesto por subpoblaciones celulares que tienen características fenotípicas, capacidad de invasión, tasa de crecimiento, capacidad de metástasis, y respuesta diferente al tratamiento hormonal y de quimioterapia (1). Por tales motivos, varias investigaciones actuales buscan determinar la heterogeneidad exacta de las células tumorales circulantes. Sin la presencia de vasos intratumorales el fenómeno de metástasis es limitado, y se ha correlacionado la probabilidad de metástasis con la intensidad de vascularización en el cáncer de mama (2).

La existencia de células tumorales circulantes implica adhesión al endotelio y salida a través de la membrana basal. En este proceso se hallan directamente implicadas moléculas de adhesión y enzimas proteolíticas. Algunos estudios revelan que las células tumorales expresan CD44, y que esta molécula les permite adherirse al endotelio y hacer diseminación vascular (3).

La determinación de células tumorales circulantes en los laboratorios clínicos ha sido un anhelo insatisfecho durante muchísimo tiempo. La complejidad en su detección se debe a su escasa presencia en el torrente sanguíneo. Así, en comparación con el número de elementos formes de la sangre periférica, la concentración de células tumorales circulantes es extremadamente baja: de alrededor de 1 por 10⁶-10⁷ leucocitos, lo cual obligaría a analizar muestras entre 1.000 y 10.000 veces mayores que las extraídas habitualmente para un análisis de sangre (4).

Debido a lo anterior, las células tumorales circulantes son eventos raros, que solo se han podido detectar específicamente mediante una combina-

ción de marcadores intracelulares y de superficie en laboratorios de investigación. Afortunadamente, durante la última década diferentes avances tecnológicos han hecho posible la optimización y la detección fiable de las células tumorales circulantes, y estas van ganando relevancia clínica (5).

Los avances tecnológicos actuales han permitido desarrollar diferentes métodos para la determinación de células tumorales circulantes en los laboratorios clínicos, ya sean morfológicos (*Isolation by Size of Epithelial Tumor cells*), basados en gradiente de densidades; Oncoquick, o inmunomagnéticos (*Magnetic Activated Cell Sorting system, Rosette-Sep-Applied imaging Rare Event, Fiber-optic Array Scanning Technology, Laser Scanning Cytometer*). Recientemente se ha desarrollado un microchip de silicón (CTC-chip) capaz de aislar, contabilizar y analizar las células tumorales circulantes. La superficie del microchip, del tamaño de una tarjeta de crédito, está recubierta de alrededor de 80.000 puntos detectores tubulares microscópicos cargados con anticuerpos capaces de detectar las proteínas expresadas en diferentes tumores sólidos, y dispuestos geométricamente, de manera que al circular entre ellos la sangre de la muestra, con un flujo y a una velocidad prefijados por medio de una bomba neumática, capturan las células tumorales por su huella molecular. Los escasos ensayos efectuados en clínica hasta el momento muestran una alta fiabilidad para tal método. Además, se dispone de microscopios automatizados que permiten una exploración más rápida de las células tumorales circulantes (*Automated Cellular Imaging System*) (6).

Los métodos para la detección de células tumorales circulantes utilizan la citometría o el análisis del ácido nucleico. En ambas circunstancias son necesarios su aislamiento y su optimización, para incrementar su expresividad mediante análisis densitométricos, inmunomarcadores o reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa (RT-PCR).

Los métodos de detección de células tumorales circulantes basados en el ADN libre circulante, tales como RT-PCR, o, mejor aún, RT-PCR cuantitativa, muestran una mayor sensibilidad que los basados en la citometría, pero existe incertidumbre acerca de la vida media de células y ácidos nucleicos en la sangre periférica, lo cual significa que la presencia de ADN libre circulante muestra la presencia de los ácidos nucleicos totales, y no solo la de las células tumorales. Si bien esto podría obviarse por la determinación de ARN libre, que desaparece rápi-

damente de la sangre tras la muerte de la célula, la especificidad sigue siendo baja, lo que no ha permitido su utilización en la práctica clínica.

Más relevante todavía es reconocer que el objetivo último en la determinación de las células tumorales circulantes por citometría no se limita a identificar y cuantificar estas células en la sangre periférica, sino que aspira, también, a su aislamiento y caracterización genética y molecular, para establecer el verdadero significado biológico de estas y su origen (tumor primario-metástasis), lo cual supone una ventaja adicional sobre los métodos de detección de células tumorales circulantes basados en el ADN-ARN (RT-PCR) (7) (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación entre las diferentes técnicas de cuantificación de células tumorales circulantes

Técnica	Validada FDA	Volumen de sangre	Principio	Sensibilidad y especificidad
Inmunomagnética	Sí	7,5 ml	Captura de células epiteliales	Alta
RT-PCR	No	5-10 ml	RNA	Alta sensibilidad y baja especificidad
ISET	No	10 ml	Tamaño celular	Buena sensibilidad y baja especificidad
Microchip	No	7,5 ml	Captura de células epiteliales	Alta, y en investigación
Microfiltro	No	7,5 ml	Tamaño celular	Alta, y en investigación
Citometría de flujo	No	100 µl	Captura de células epiteliales	Alta, y pendiente de estudios

La detección inmunomagnética de células tumorales circulantes se basa en que las células epiteliales no deben encontrarse en sangre periférica. Para tal efecto, se busca un fenotipo celular circulante tipo EpCAM (molécula de adhesión de célula epitelial) positivo, CK (citoqueratina 8, 18 y 19) positivo, DAPI (marcación nuclear) positivo y CD45 (marcación de leucocitos) negativo. Este sistema es el único, hasta el momento, que se encuentra aprobado por la Agencia Gubernamental de Control de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU. (FDA), para la determinación de células tumorales circulantes en pacientes con cáncer de mama, en 7,5 ml de sangre periférica (8).

Según como sea el valor de las células tumorales circulantes encontradas, se lo relaciona directamente con el pronóstico, y se evalúan la supervivencia y la supervivencia global. Se hace seguimiento y se

evalúa la respuesta a tratamientos quimioterapéuticos en las pacientes con cáncer de mama (9).

La muestra corresponde a 10 ml de sangre periférica recogida en los tubos, los cuales la preservan hasta por 96 horas. Posteriormente la muestra (7,5 ml) se analiza con el equipo, que contiene un reactivo de captura basado en un ferrofluido y reactivos inmunofluorescentes. El reactivo del ferrofluido consiste en nanopartículas con un núcleo magnético rodeado de una capa polimérica revestida con anticuerpos dirigidos al antígeno EpCAM para la captura de células tumorales circulantes (10).

Tras la captura inmunomagnética y el enriquecimiento se añaden los reactivos fluorescentes para la identificación y la enumeración de las células tumorales circulantes. Los reactivos fluorescentes incluyen: anti-CK-Phycoerythrin (PE) específico para la proteína citoqueratina intracelular (característica de las células epiteliales), o DAPI, que tiñe el núcleo celular, y anti-CD45-Allophycocyanin (APC) específico para los leucocitos (Fig. 1).

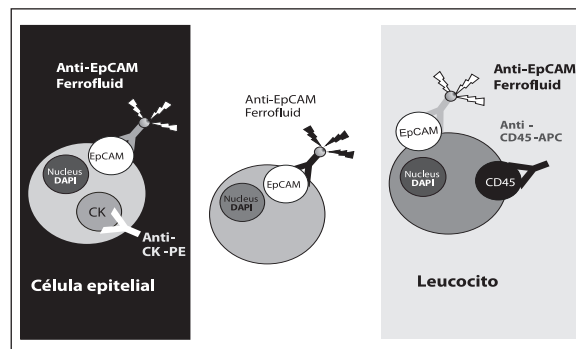


Figura 1. Selección inmunomagnética de las células tumorales circulantes. Determinación de las características inmunofenotípicas de las células circulantes

La mezcla reactivo/muestra se administra mediante un cartucho que se introduce en un dispositivo de presentación celular. El fuerte campo magnético del dispositivo atrae hacia la superficie del cartucho las células epiteliales marcadas magnéticamente.

Posteriormente se explora automáticamente toda la superficie del cartucho, se adquieren las imágenes y se muestran los eventos donde CK-PE y la fluorescencia DAPI aparecen en el mismo lugar. Las imágenes son presentadas en un formato de galería, para su clasificación. Un evento es clasificado como célula tumoral circulante cuando sus características morfológicas son coherentes con una célula tumoral

y muestra el fenotipo EpCAM positivo, CK positivo, DAPI positivo y CD45 negativo. En la (Fig. 2) se observa la célula tumoral circulante en cáncer de mama, donde la citoqueratina marca la membrana celular (verde) y envuelve el núcleo (rosa), marcados con anticuerpos CK-PE y DAPI respectivamente (11).

En el caso de los tumores mamarios las células tumorales circulantes tienen un origen epitelial, y esta técnica permite diferenciar las células epiteliales de las hematógenas; por otra parte, permite saber si esta célula epitelial es tumoral o no. Este método combina técnicas biológicas, automáticas de aislamiento, de detección celular y de visualización con microscopía inmunofluorescente; además, no supone riesgos importantes para la paciente con cáncer de mama, ya que la muestra de sangre se obtiene mediante una punción venosa (7,5 ml de sangre periférica) (12).

Massimo Cristofanilli *et al.* fueron los primeros en reportar que en cáncer de mama metastásico más de 5 células tumorales circulantes por muestra están asociadas a un peor pronóstico que aquellas muestras con menos de 5 células tumorales circulantes. En el estudio de dichos autores, realizado con 177 mujeres con cáncer de mama, se registró que cerca

de la mitad presentaban metástasis o diseminación, y que la progresión era mayor en las mujeres con 5 o más células tumorales circulantes. En las pacientes en quienes se encontró un mayor número de células tumorales circulantes (30%) de 3 a 5 semanas después de iniciar un nuevo tratamiento, el cáncer se extendió más rápido que en aquellas cuyos niveles de células tumorales circulantes habían caído durante el mismo periodo, o no habían presentado previamente un nivel elevado (13).

La técnica descrita por estos autores cuantifica e identifica, de manera fiable y reproducible, las células tumorales circulantes. Al estudiarse en individuos sanos se observan menos de 2 células tumorales circulantes en 7,5 ml de sangre periférica, donde el punto de corte que mejor discrimina entre el cáncer de mama localizado y diseminado se ha establecido en ≤ 2 células tumorales circulantes en 7,5 ml de sangre periférica (14).

Se ha demostrado que las células tumorales circulantes en pacientes con cáncer de mama metastásico están asociadas a supervivencia, supervivencia libre de la enfermedad y predicción de la respuesta terapéutica. Poder identificar el número de células tumorales circulantes, especialmente en el primer seguimiento después de comenzar el tratamiento,

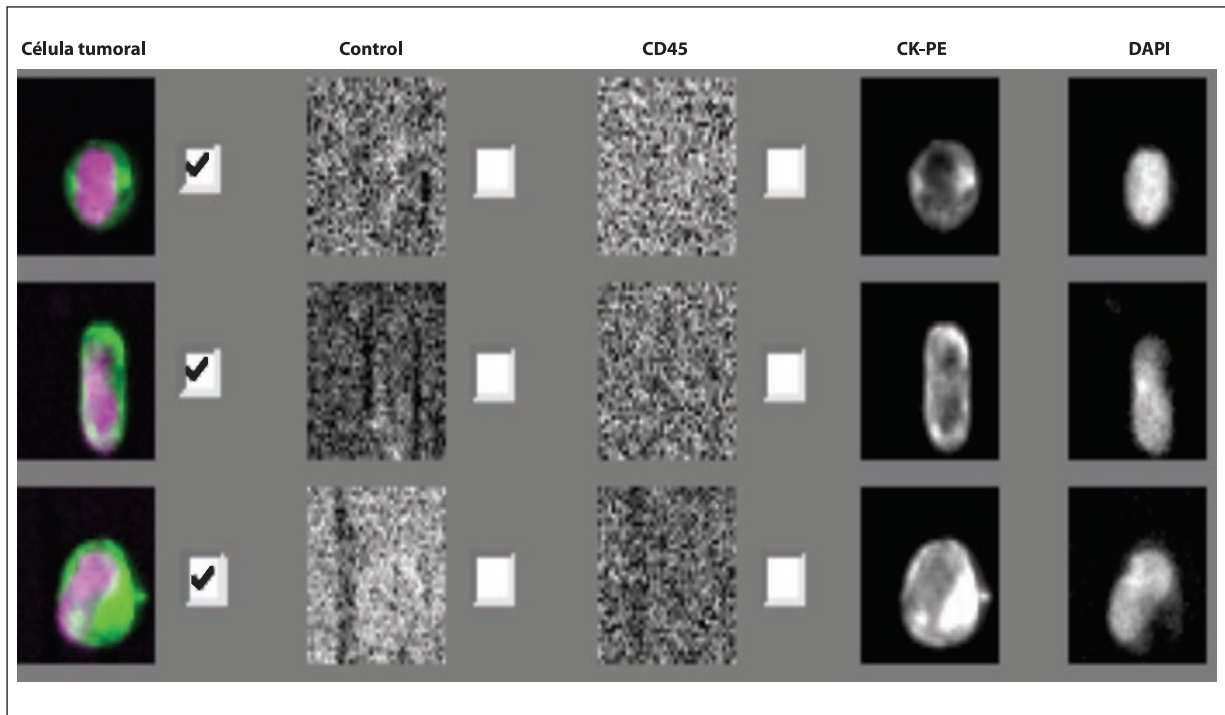


Figura 2. Galería de imágenes para clasificación de células tumorales circulantes

proporciona una indicación rápida y de confianza acerca de la terapéutica elegida. Actualmente se debe esperar hasta 3 o 4 meses para valorar si la quimioterapia funciona (15).

En el seguimiento se recomienda tomar la muestra antes del inicio del tratamiento, y que las muestras posteriores se extraigan en intervalos de 3 a 4 semanas, para seguir el nivel de células tumorales circulantes mientras se recibe la quimioterapia. Se sabe que mientras más diseminado este el tumor los niveles de células tumorales circulantes están significativamente más elevados.

En un estudio donde se revisan las células tumorales circulantes de 1.767 pacientes con cáncer de mama en el momento del diagnóstico y durante la quimioterapia, se comparan los resultados con 852 obtenidos de las mismas pacientes al finalizar su tratamiento. Los hallazgos señalan que un 10% de las pacientes que inicialmente dieron positivo para células tumorales circulantes dio también positivo tras la quimioterapia, y de quienes dieron negativo, un 93% siguió registrando resultados negativos tras el tratamiento. Esto permite pensar que al detectar las células tumorales circulantes se podrá personalizar la quimioterapia para hacerla más efectiva y reducir los costes sanitarios del proceso (16).

Las células tumorales circulantes se han correlacionado con imágenes radiológicas en las pacientes con cáncer de mama; se ha observado que las valoraciones de células tumorales circulantes realizadas más cercanas al momento de la adquisición de imágenes produjeron perspectivas de supervivencia parecida, en comparación con la valoraciones de células tumorales circulantes realizadas aproximadamente 4 semanas después del comienzo de la terapia (17).

En la muestra, de 138 pacientes, 134 (97%) tuvieron valoraciones de células tumorales circulantes dentro del mes posterior al primer estudio de adquisición de imágenes de seguimiento. La mediana de supervivencia de 105 pacientes (78%) con resultados de células tumorales circulantes favorable fue de 21,19 meses (IC 95% 19,9-31,6). Para 29 pacientes (22%) con resultado de células tumorales circulantes no favorable la mediana de supervivencia fue de 8,5 meses (IC 95% 5,5-15,1). Estos datos muestran que las valoraciones de células tumorales circulantes en ambos momentos ofrecen resultados similares a los obtenidos por adquisición de imágenes aproximadamente 9 semanas después del comienzo de la terapia (17).

La quimioterapia continúa siendo el tipo de tratamiento empleado de forma sistemática para luchar contra el cáncer de mama; sin embargo, la disminución parcial o completa de la masa tumoral es inducida mediante la respuesta del tumor al tratamiento.

El significado y la importancia de las células tumorales circulantes crecen a medida que se conoce la técnica de detección, el significado clínico, su relación directa con el pronóstico y la respuesta a los tratamientos instaurados. Actualmente existen protocolos de quimioterapia que están siendo evaluados según el conteo de las células tumorales circulantes en cáncer de mama metastásico, y que, una vez determinados, tendrán un gran impacto en la sobrevida de las pacientes (18).

Por lo anterior, las biopsias no invasivas del tumor podrían ser una realidad, y el seguimiento de los tratamientos podría realizarse tantas veces como fuera necesario, y, además, permitirán monitorizar el genotipo del tumor durante el tratamiento. Las células tumorales circulantes aisladas con estas tecnologías pueden asemejarse a una "biopsia líquida", con capacidad de estudio molecular individualizado (mutaciones, genes de resistencia conocidos a fármacos, nuevos marcadores tumorales, etc.) y específico de cada paciente.

Referencias

1. Pierga JY, Bonneton C, Vincent-Salomon A, et al. Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2004;10:1392-400.
2. Horak ER, Leek R, Klenk N, et al. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet.* 1992;340(8828):1120-4.
3. Gaforio JJ, Serrano MJ, Sánchez-Rovira P, et al. Detection of breast cancer cells in the peripheral blood is positively correlated with estrogen-receptor status and predicts for poor prognosis. *Int J Cancer.* 2003;107:984-90.
4. Vidaurreta M, Sastre J, Sanz-Casla MT, et al. Detección y cuantificación de células tumorales en sangre periférica en pacientes con cáncer de colon. *Med Clin.* 2007;129:333-4.
5. Sleijfer S, Gratama J, Sieuwerts J, et al. Circulating tumour cell detection on its way to routine diagnostic implementation? *Eur J Cancer.* 2007;43:2645-50.
6. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature.* 2007;450:1235-9.
7. Krivacic RT, Ladanyi A, Curry DN, et al. A rare-cell detector for cancer. *Proc Natl Acad Sci.* 2004;101:10501-4.

8. Cristofanilli M, Budd T, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cell, disease progression and survival metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2004;351:781-91.
9. Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, et al. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23:1420-30.
10. Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells versus imaging predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;12:6403-9.
11. Gilbey AM, Burnett D, Coleman RE, et al. The detection of circulating breast cancer cells in blood. *J Clin Pathol.* 2004;57:903-11.
12. Smirnov DA, Zwigers DR, Foulk BW, et al. Global gene expression profiling of circulating tumor cells. *Cancer Res.* 2005; 65:4993-7.
13. Smerage JB, Hayes DF. The measurement and therapeutic implications of circulating tumour cells in breast cancer. *Br J Cancer.* 2006;94:8-12.
14. Maestro ML, Sastre J, Rafael S, et al. Circulating tumor cells in solid tumor in metastatic and localized stages. *Anticancer Res.* 2009; 29:4839-43.
15. Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, et al. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res.* 2006;12:4218-24.
16. Jueckstock J. Ludwig-Maximilians-Universität de Munich (Alemania), Conferencia Europea de Cáncer (ECCO 14), 2008.
17. Boveridge R. Circulating tumor cells in the management of metastatic breast cancer patients. *Community Oncology.* 2007;4:79-82.
18. Weissleder R, Pittet MJ. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature.* 2008;452:580-9.