

# CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES EN LA PRÁCTICA ONCOLÓGICA: IMPORTANCIA EN TUMORES SÓLIDOS EPITELIALES

## *CIRCULATING TUMOR CELLS IN ONCOLOGIC PRACTICE: ROLE IN EPITHELIAL SOLID TUMORS*

Luz Fernanda Sua Villegas<sup>1</sup>, Nhora María Silva Pérez<sup>2</sup>,  
Marta Vidaurreta Lázaro<sup>3</sup>, Sara Rafael Fernández<sup>3</sup>,  
Virginia de la Orden<sup>3</sup>, Silvia Veganzones de Castro<sup>3</sup>  
y María Luisa Maestro de las Casas<sup>3</sup>

### RESUMEN

Las metástasis de los tumores sólidos se producen cuando las células de un carcinoma primario o metastásico migran en el sistema circulatorio y proliferan en lugares distantes. Los carcinomas son de origen epitelial y no es habitual que estas células se encuentren en el torrente circulatorio. En los últimos 20 a 30 años se han utilizado diferentes métodos y tecnologías para la determinación de células tumorales circulantes (CTC) en sangre periférica y médula ósea. Pero estos sistemas de recolección (Cyto-spins, magnetic beads, latex beads, cell-sorting (flow cytometry), density-gradient media, column separation) o de análisis (Immuno-staining, flow cytometry, Immunohistochemistry, *Fluorescence*

*in situ hybridization*, nucleic acid probes) presentan inconvenientes en cuanto a que son técnicas manuales y no estandarizadas de interpretación subjetiva, algunas sin validación, con ausencia de un sistema de análisis específicamente diseñado para laboratorios clínicos RUO “components” y ausencia de evidencia clínica constatada que soporte la adopción del estudio de las CTC por los clínicos.

El sistema de detección CellSearch representa la primera tecnología automatizada y estandarizada que fue aprobada por la FDA para predecir la progresión y la supervivencia libre de enfermedad en el cáncer de mama metastásico. La presencia de células tumorales circulantes (CTC) en sangre periférica detectadas con CellSearch® circulating

<sup>1</sup> MD. Departamento de Anatomía Patológica y Patología Clínica. Universidad del Valle. Clínica de Occidente. Unidad Oncológica. Cali. Colombia.

<sup>2</sup> MD. Laboratorio Clínico y de Patología. Fundación Valle del Lili. Cali. Colombia.

<sup>3</sup> Ph.D. (Dra. Maestro), Quím. (Lic. Vidaurreta), Biol. (Lic. Rafael, de la Orden y Veganzones). Laboratorio de Análisis Clínicos: Sección de Genómica. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. España.

Tumor Cell System, está asociada a menor supervivencia libre de enfermedad (SLE) y menor supervivencia global (SG) en pacientes de cáncer de mama, colorrectal y de próstata metastatizante.

**Palabras clave:** Células tumorales circulantes (CTC), tumores sólidos y metástasis.

## ABSTRACT

Metastasis of solid tumors occurs when cells in a primary or metastatic carcinoma migrate through the circulation and proliferate at distant sites. Carcinomas are of epithelial origin and their cells are seldom seen in the bloodstream. In last decades, different methods and technologies for the identification of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood and bone marrow have been used. But collection systems (Cyto-spins, magnetic beads, latex beads, cell-sorting -flow cytometry- density-gradient media, column separation) or testing (Immune-staining, flow cytometry, Immunohistochemistry, Fluorescence in situ hybridization, nucleic acid probes) have drawbacks; they have no standardized manual and subjective interpretation, some are not validated, no analysis system have been specifically designed for clinical laboratory RUO “components” and no proven clinical evidence supports routine CTC determination in clinical practice. *CellSearch* detection system represents the first automated and standardized technology that was approved by the FDA for predicting progression and disease-free survival in metastatic breast cancer. The presence of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood detected circulating *Tumor Cell CellSearch*® System, is associated with lower disease-free survival (DFS) and shorter overall survival (OS) in patients with metastatic breast, colorectal and prostate cancer.

**Key words:** Circulating tumor cells (CTC), solid tumor, metastasis.

## INTRODUCCIÓN

Los tumores epiteliales agrupan aproximadamente el 80% de la patología oncológica. Las metástasis son la principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes con tumores sólidos especialmente localizados en mama, colon, estómago, próstata y pulmón. El concepto de metástasis engloba un complejo proceso de acontecimientos: las células neoplásicas del tumor primario atraviesan la membrana basal, penetran por las vías linfáticas y los vasos sanguíneos y se dispersan a tejidos distantes. (1,2,3) Esta capacidad de metástasis de los tumores sólidos a un sitio distante ha llevado a los investigadores a proponer que estos tienen fases “leucémicas”, similares a las que se conocen en los linfomas. (4)

La determinación de células tumorales circulantes (CTC) no es un concepto nuevo, en 1869 Ashworth publicó un caso donde las células malignas similares a las del tumor primario circulaban en sangre periférica. (5) Estas observaciones permitieron que durante mucho tiempo, se supusiera que su presencia significaba una progresión de la enfermedad neoplásica maligna y que se podía relacionar directamente con las metástasis tumorales. Pero su verdadero significado biológico no había podido ser establecido, debido a su escaso número y por no contar con técnicas que permitieran su aislamiento e identificación eficaz (6-7).

La detección de las CTC puede demostrar no sólo la agresividad del cáncer originario con capacidad de lanzar células tumorales a la sangre periférica y la consiguiente potencialidad de desarrollar las metástasis, sino también su presencia *per se* y su facultad hipotética de iniciar la diseminación de una generación de CTC diferente desde las nuevas localizaciones metastáticas. Las CTC dependientes de los clones del tumor

primario pueden ser detectadas incluso antes que el tumor donde se originan e incluso se identifican, y a menudo persisten, después de que el tumor se ha extirpado. Por tanto, la determinación de CTC ayudaría extraordinariamente a estudiar aspectos fundamentales de la Oncología, tanto en lo referente al diagnóstico como a la estadificación y al pronóstico. Más aún, abre nuevas expectativas en la evaluación de la respuesta de los cánceres ante las diferentes terapias —quirúrgicas, farmacológicas o radioterápicas— de forma individual, rápida y precisa, así como en su posterior modulación terapéutica si fuera necesario (8,9).

La determinación de las CTC en los laboratorios clínicos es un anhelo insatisfecho durante muchísimo tiempo y la complejidad de su detección se debe a su escasa presencia en el torrente sanguíneo. En los últimos años se ha avanzado en la determinación de las CTC en los tumores sólidos tanto en sangre periférica como en médula ósea, debido al desarrollo de nuevas técnicas de inmunohistoquímica, biología molecular y citometría de flujo; pero estas no han logrado ser automatizadas-estandarizadas y reproducibles hasta ahora, lo que si se ha logrado con el sistema CellSearch® circulating Tumor Cell System, el cual permite el uso de protocolos estándares para la preparación de las muestras y

la interpretación de los resultados y es capaz de detectar en sangre periférica, 1 CTC por  $1 \times 10^{5-7}$  células mononucleares mediante inmunomagnetismo (10, 11,12).

El sistema semiautomático CellSearch Epithelial Cell Kit (Veridex®) es el único aprobado actualmente por la FDA (US Food and Drug Administration) para la determinación de CTC en pacientes con cáncer de mama, colorrectal y próstata (13,14,15).

La determinación de CTC en sangre periférica con CellSearch® se puede realizar en cualquier momento de la enfermedad permitiendo valorar el pronóstico del paciente y predecir la sobrevida libre de enfermedad y una sobrevida global. Además, nos permite la monitorización de estos pacientes junto con los métodos clínicos actuales (Ver tabla 1).

Actualmente se trabaja en otros sistemas de detección a través de RT-PCR (transcriptasa reversa y reacción en cadena de polimerasa), CTC-chip (microchips), microfiltro, citometría de flujo, FAST (método citométrico) y FISH (hibridación in situ fluorescente). Estas técnicas se encuentran en investigación o requieren ensayos clínicos para poder ser validadas. (16) (Ver tabla 2.)

**Tabla 1.** Importancia de las CTC en su detección, determinación del número y caracterización celular.

CTC Detección y determinación del número	CTC Caracterización
Establecen el pronóstico en tumores sólidos y vigilan la recurrencia de la enfermedad.	Determinan los factores pronósticos y predictivos de los tumores sólidos.
Estudian si el tratamiento tiene respuesta antitumoral.	Vigilan la diseminación, la resistencia a medicamentos y que terapias inducen la muerte celular tumoral.

Por tanto, las biopsias del tumor no invasivas son una realidad y el seguimiento de los tratamientos podría realizarse tan frecuentemente como fuera necesario y además nos permitirían monitorizar el genotipo del tumor durante el tratamiento. Las CTC aisladas con estas tecnologías pueden asemejarse a una -Biopsia Liquida- con capacidad de estudio molecular individualizado (mutaciones, genes de resistencia conocidos a fármacos, nuevos marcadores tumorales, etc.) y específico de cada paciente.

## DETECCIÓN DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES MEDIANTE INMUNOMAGNETISMO

### Principios básicos

El principio de las metástasis en el cáncer, consiste en la migración de las células malignas al sistema circulatorio y su localización posterior en órganos distantes. Así vemos como el cáncer

de próstata metastatiza al tejido óseo, el cáncer de mama al pulmón o el cáncer colorrectal al tejido hepático, como primer lugar anatómico de localización (17).

### 1. La muestra

La muestra basal se recoge antes de comenzar cualquier régimen de quimioterapia. Las muestras posteriores se extraen en intervalos de 3 o 4 semanas, para seguir los niveles de CTC durante el tratamiento.

Si el paciente recibe doxorubicina, se debe esperar a que transcurran al menos 7 días desde la administración de una dosis antes de extraer la muestra. Esto es debido a que en las muestras enriquecidas con niveles tóxicos de doxorubicina se produce un marcaje alterado de leucocitos con citoqueratina y CD45 dualmente positivos, ya que este agente quimioterapéutico es un compuesto fluorescente que se incorpora en las células nucleadas.

**Tabla 2.** Comparación de las técnicas utilizadas para determinar las CTC), EpCAM positivo, CK positivo, DAPI positivo y CD45 negativo

Técnica	Validada FDA	Volumen de sangre	Principio	Sensibilidad y especificidad
CellTracks Veridex	Si	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 células epiteliales	Alta y en Investigación
Micro filtro	No	7.5 ml	Tamaño celular	Alta y en Investigación
Citometría de flujo	No	100 µl	Captura de células epiteliales	Alta y pendiente estudios

La venopunción se realiza con técnicas asépticas y se extraen 10 ml de sangre total en CellSave® Preservative Tubes. El tubo de sangre periférica es procesado en Celltracks® AutoPrep® System que nos proporciona una muestra enriquecida y lista para ser analizada en el Celltracks® Analyzer II (18,19).

## 2. La técnica

El principio básico de la técnica consiste en una selección por partículas inmunomagnéticas (ferrofluido) y tinción con 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 capturar las CTC. Tras la captura inmunomagnética y el enriquecimiento, se

añaden los reactivos fluorescentes para la identificación y enumeración de las CTC. (Ver figura 1).

El conjunto de células seleccionadas con el ferrofluido se depositan en un cartucho que se introduce en un dispositivo de presentación celular MagNest® (Ver figura 2). El fuerte campo magnético del dispositivo MagNest®, atrae a las células epiteliales marcadas magnéticamente unidas al ferrofluido hacia la superficie del cartucho.

CellTracksAnalyzer II® explora automáticamente toda la superficie del cartucho, adquiere las imágenes y muestra al operador cualquier evento donde CK-PE y la fluorescencia DAPI aparecen en el mismo lugar. Las imágenes son presentadas al operador en un formato de galería para su clasificación final.

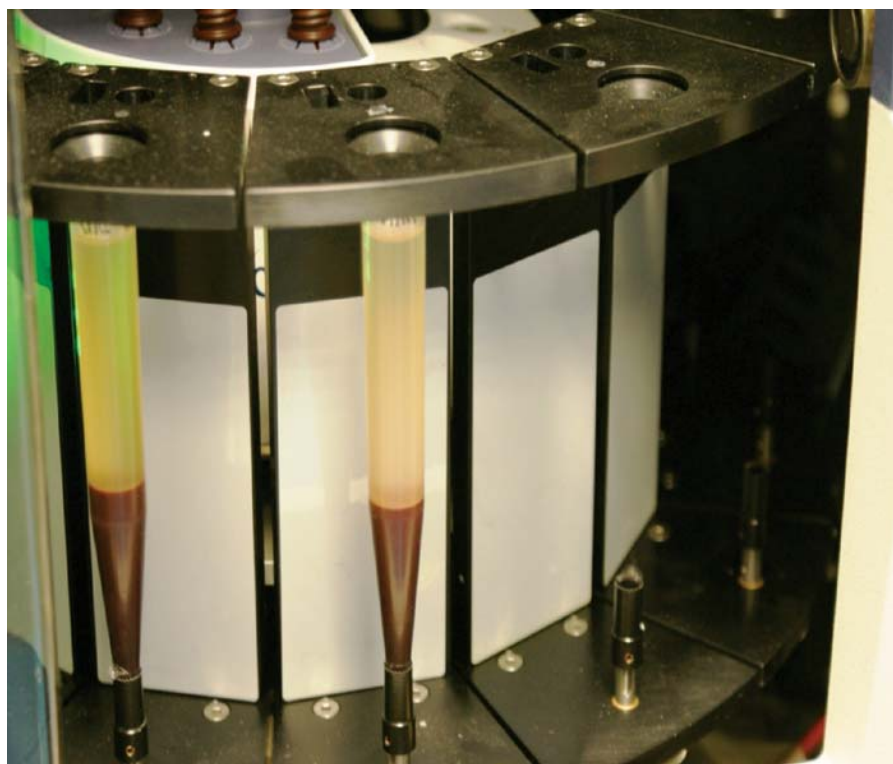


Figura 1. Muestra dentro del equipo CellTracks® AutoPrep® System



Figura 2. Cartucho y dispositivo de presentación celular MagNest®

### 3. Interpretación de los resultados analizados en CellTracks® Analyzer II

El resultado nos indica el número de CTC en 7.5 ml de sangre periférica de la muestra extraída

previamente. Esta interpretación solo es realizada por personal entrenado para ello, cada evento clasificado como célula tumoral debe tener un fenotipo: EpCAM positivo, CK positivo, DAPI positivo y CD45 negativo (Ver figura 3).

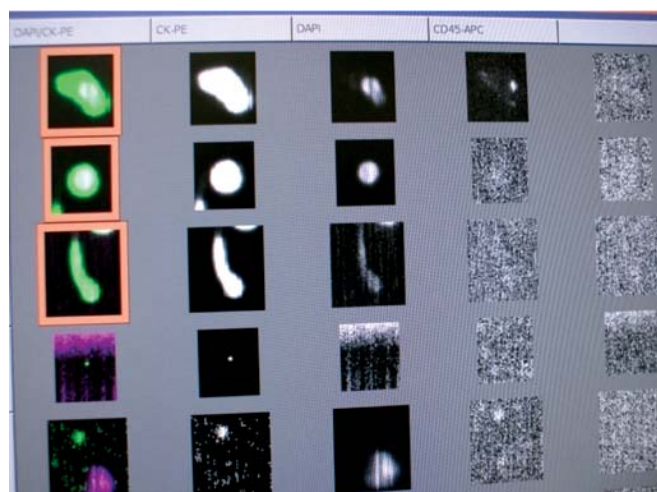


Figura 3. Fenotipificación de CTC (cuadros naranja).

Los reactivos fluorescentes incluyen:

- Anti-CK-phycoerythrin (PE): específico para la proteína citoqueratina intracelular, esta marcación es una característica de las células epiteliales.
- DAPI: marcador que tiñe el núcleo de todas las células nucleadas. Por ello nos marca tanto los leucocitos, como las células epiteliales.
- Anti-CD45-Allophycocyanin (APC): específico para marcar los leucocitos.

**Cáncer de mama metastásico:** se considera que un recuento de CTC de 5 o más por 7.5 ml de sangre en cualquier fase de la enfermedad, se asocia a un peor pronóstico, es predictivo de una SLE y una SG más corta. (20).

**Cáncer colorrectal metastásico:** un recuento de CTC de 3 o más por 7.5 ml de sangre en cualquier fase de la enfermedad se asocia a un pronóstico malo, es predictivo de una SLE y una SG más corta. (20).

**Cáncer de próstata metastásico:** se considera que un recuento de CTC de 5 o más por 7.5 ml de sangre en cualquier fase de la enfermedad, se asocia a un pronóstico malo, es predictivo de una SLE y una SG más corta. (20).

#### 4. Aplicaciones clínicas

En los tres tumores epiteliales estudiados (mama, colon y próstata), la determinación identifica y cuantifica las CTC en sangre periférica de manera fiable y reproducible. Esto sugiere la utilidad de la técnica y de los resultados, así como su aplicación en el seguimiento y terapéutica. Es importante considerar que en los estudios realizados todos los individuos sanos mostraron menos de 2 CTC en 7.5ml de sangre periférica.

Teniendo en cuenta lo antes mencionado, se ha establecido:

- En cáncer de mama metastásico las CTC se asocian a supervivencia, supervivencia libre de enfermedad y predicción de la respuesta terapéutica. (21)
- En cáncer colorrectal metastásico las CTC, se asocian a supervivencia y supervivencia libre de enfermedad. En cáncer colorrectal localizado, las CTC predicen el estadio tumoral y son factor pronóstico independiente de SG y SLE. (22)
- En cáncer de próstata metastásico las CTC predicen una SLE y una SG más corta. Se ha demostrado una correlación positiva entre el número de CTC y los valores de PSA, con el tamaño del tumor y con la presencia o no de adenopatías. (23) Los hallazgos confirman que las cantidades de CTC antes del tratamiento ayudan a predecir la supervivencia de los pacientes de cáncer de próstata que inician la quimioterapia de primera línea.

Tanto en cáncer de mama, colorrectal y próstata diseminados, los niveles de CTC están significativamente más elevados, sin importar cuál de estos tumores epiteliales estemos evaluando. (24, 25,26)

#### DETECCIÓN MEDIANTE TRANSCRIPTASA REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA (RT-PCR), DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES

La utilización de la transcriptasa reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para amplificar el RNAm se presenta como una metodología para la detección de células circulantes derivadas de tumores de órganos sólidos. Las muestras son obtenidas de sangre periférica, los pacientes sanos son los controles negativos y

como control positivo se suele utilizar un ganglio linfático afectado por el tumor a estudiar o muestra del tumor (27).

## 1. La muestra

La muestra de sangre periférica varía de 5 a 10 ml, esta se recoge en tubos de etilenodiaminotetraacetato (EDTA), usualmente 5 tubos y se guardan a una temperatura de 4°C. Esta muestra debe ser procesada dentro de un periodo de 2-4 horas una vez es extraída.

## 2. La técnica

La sangre obtenida se centrifuga a 2500 rpm durante 5 minutos, el plasma debe ser desechado y se recoge el suero, este suero se transfiere a un tubo de policarbonato. Posteriormente se le añaden 45 ml de H<sub>2</sub>O-dietil pirocarbonato (DEP) y PBS-10X, se agita y se centrifuga a 2500 rpm durante 5 minutos para obtener un pellet exento de glóbulos rojos. Para la extracción del RNA de linfocitos se utilizan diversos Kits comerciales.

Se debe cuantificar el RNA extraído mediante espectrofotómetro de luz ultravioleta a una densidad óptica de 260 nm y 280 nm. Se analiza el RNA mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los geles se visualizan en un transiluminador ultravioleta y son fotografiados.

- **Oligonucleótidos:** son utilizados para amplificar el número de pares de bases del gen estudiado. La integridad del RNA se estudia con los primers correspondientes al DNAC de beta-actina sentido y antisentido. (Los primers elegidos amplifican el número de pares de bases que estamos buscando).
- **Transcriptasa reversa:** las muestras de RNA se incuban con la enzima de transcripción inversa,

que ante los cebadores y desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP), cataliza la retrotranscripción de las cadenas de DNA complementarias al del RNA (DNAC), la temperatura óptima de transcripción es determinada según el gen estudiado, que por lo general son 42°C. El proceso se realiza mediante un kit comercial, donde cada tubo de reacción contiene un volumen de 20 µl, compuesto por RNA (1µg), tampón de transcriptasa reversa (100mM Tris-HCl, pH 8.8 a 25°C, 500mMKCl, Tritón X-100), proteína inhibidora de RNAsas (rRNAsin) (0.4µmol), transcriptasa reversa (AMV) (24U), Poli T (oligo-dT primer) (1mmol), dNTPs (10mM) y agua hasta 20µl. (La transcripción inversa se realiza en un termociclador, donde la temperatura y el tiempo se determina según el tumor a estudio, que suele ser a 42°C durante 15 minutos).

- **Reacción en cadena de la polimerasa:** el resultado de la transcripción inversa se diluye al 1/10 en H<sub>2</sub>O-DEP, utilizando una alícuota de 5µl para la PCR. Cada tubo de reacción contiene: el resultado de la transcriptasa reversa (5µl), tampón de la enzima Taq polimerasa (10µl), dNTPs (0.2mM), enzima Taq polimerasa (5U/µl), primer Sense y Antisense del gen tumoral estudiado (1µmol) y agua hasta 100µl.

Los ciclos utilizados para la amplificación del gen se determinan según el gen a estudiar, siguiendo los siguientes pasos: desnaturalización del DNA (1 minuto a 94°C), acoplamiento de los cebadores y DNA diana (2 minutos) y por último la extensión (3 minutos a 72°C y 30 ciclos con una extensión final de 7 minutos a 72°C). (28).

## 3. Interpretación de los resultados

El resultado de la PCR se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Para poder extrapolar al tamaño de los fragmentos del DNA



estudiado se debe usar un marcador de peso molecular.

## 4. Aplicaciones clínicas

La utilización de la RT-PCR permite amplificar el RNAm presente en sangre periférica y por tanto es una metodología que se utiliza para detectar pequeñas cantidades de células malignas circulantes en tumores sólidos.

Tiene como inconveniente la pérdida de la información morfológica y el alto porcentaje de falsos positivos observados en los pacientes sanos.

Esta técnica muestra resultados variables en los diferentes estudios, por lo que no ha podido ser reproducible y validada. Está en controversia si con esta técnica se puede predecir el pronóstico y la respuesta terapéutica en los tumores sólidos estudiados (29,30).

## DETECCIÓN DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES MEDIANTE MICROCHIP

Esta tecnología ha sido desarrollada en el Centro para el Cáncer del Hospital General de Massachusetts, en colaboración con el Centro de Investigación de Sistemas Biomicroelectromecánicos, donde el principio básico es un microchip capaz de aislar, contabilizar y analizar las células tumorales circulantes en sangre periférica (31).

### 1. La técnica

Consiste en un microchip llamado CTC-chip, que se instala sobre un soporte de tamaño similar al de una tarjeta de crédito; su superficie es de silicón y está recubierto de alrededor de 80.000 puntos detectores microscópicos (micropostes), cargados con anticuerpos capaces de detectar las proteínas

(EpCAM) que se expresan en la mayor parte de los tumores sólidos de origen epitelial.

Estos puntos detectores, de una sección inferior a la de un cabello, están dispuestos sobre la superficie del microchip con una geometría tal que al circular la sangre de la muestra entre ellos, con un flujo y una velocidad prefijados por medio de una bomba neumática, capturan las células cancerosas en posiciones determinadas en la tarjeta de silicón dependiendo del anticuerpo con el que está cargado cada punto detector (32).

Esta técnica permite detectar células tumorales con una sensibilidad de una entre mil millones. Y dependiendo del anticuerpo cargado en cada punto detector se fijarán a él células tumorales distintas, por lo que el microchip es capaz de identificar diferentes tumores por su huella molecular. Asimismo, con base en un modelo matemático, se puede constatar el número de células tumorales presentes en la sangre (33).

### 2. Aplicaciones clínicas

El microchip puede encontrar una de sus mejores aplicaciones en el seguimiento en tiempo real, de la respuesta a las distintas terapias quimioterapéuticas.

En las pruebas clínicas realizadas, se utilizaron muestras de sangre periférica de 68 pacientes afectados por diferentes tipos de tumores sólidos como: pulmón, mama, páncreas, próstata, o colorrectal. Se realizaron en total 116 tests y el microchip detectó con total claridad la presencia de células tumorales en la sangre en 115 de ellos. Los investigadores, con las pruebas realizadas, conceden a este método una fiabilidad del 99%. En los tests de las muestras de sangre de los pacientes sanos en ningún caso se encontraron células tumorales. (34) Serán necesarios varios trabajos adicionales

antes de proceder a la aplicación clínica de estos CTC-chips.

## **DETECCIÓN A TRAVÉS DE FILTROS DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES**

En el mercado existe el filtro ISET (Isolation by Size of Epithelial Tumour cells), donde los poros del filtro son de 8  $\mu\text{m}$ , pero se observa que los leucocitos de mayor tamaño quedan atrapados en el filtro, por lo que es considerada una técnica con buena sensibilidad y baja especificidad (35).

### **1. La técnica microfiltro**

Se basa en un dispositivo microfiltro desarrollado por un equipo de la Escuela Keck de Medicina de la Universidad del Sur de California, en Los Ángeles, en colaboración con el Instituto de Tecnología de California, en Pasadena.

Con esta técnica se capturan las CTC en virtud de su tamaño, basándose en el principio de que la célula tumoral es mucho más grande que sus contrapartes. Se tarda en promedio 90 segundos para procesar 7,5 ml de sangre periférica (36).

### **2. Aplicaciones clínicas**

Esta técnica microfiltro se encuentra todavía en una fase temprana de desarrollo y requiere más trabajo y la validación analítica. Por ejemplo, la tasa a la cual la sangre es empujada a través del filtro tendrá que ser normalizada (37).

## **DETECCIÓN DE CELULAS TUMORALES CIRCULANTES A TRAVÉS DE CITOMETRÍA DE FLUJO**

La citometría de flujo es una tecnología que permite la medición simultánea de múltiples ca-

racterísticas físicas y químicas de las células en suspensión. El citómetro permite conocer información sobre las células estudiadas en cuanto a su tamaño, su granularidad o complejidad interna y evaluación química (38).

### **1. La muestra**

La muestra corresponde a 100  $\mu\text{l}$  de sangre total, 10  $\mu\text{l}$  del marcador determinado, se incubaba de 10-15 minutos a temperatura ambiente, se añade el lisador y se lleva al equipo.

### **2. La técnica**

Utiliza un sistema óptico-electrónico donde se registra cómo la célula interactúa con un rayo láser. Con esta técnica se detecta la capacidad de la célula para desviar la luz incidente (láser) y emitir fluorescencia. Además de detectar moléculas específicas celulares como anticuerpos conjugados o antígenos específicos de epitelios (intracelulares) en el caso de las CTC (39,40).

Los marcadores usados para CTC son citoqueratinas y mucin-1, los cuales no se encuentran en los precursores hematopoyéticos.

**Componentes:** un sistema de fluidos, un sistema óptico compuesto por una fuente de luz y de separación espectral, un sistema electrónico con un control mecánico de luz y detectores, un sistema de colección y análisis de pulsos, además de un sistema informático, el cual analiza y presenta los datos de las células estudiadas (41).

### **3. Aplicación clínica**

Aunque las aplicaciones más relevantes están relacionadas con la hematología e inmunología clínica, esta técnica utilizada para determinar las

CTC tiene la ventaja de que las células no se lisan y por ello se conserva la morfología con la tipificación posterior. (42) Su aplicación clínica en tumores epiteliales sólidos aun no se encuentra estandarizada.

Otros estudios de investigación han demostrado que la citometría de flujo multiparamétrica tiene muy buena sensibilidad con una mínima cantidad de 10 células por mililitro de sangre periférica, en un volumen total de 10 ml. (100 células en total) (43).

## **DETECCIÓN DE CELULAS TUMORALES CIRCULANTES A TRAVÉS DEL SISTEMA FAST- CITOMÉTRICO (Fiber-optic array scanning Technology)**

### **1. La muestra**

La muestra corresponde a 10 ml de sangre periférica.

### **2. La técnica**

Esta técnica utiliza marcadores de inmunohistoquímica: CK (citoqueratinas) característica de la célula epitelial y DAPI para la determinación nuclear, con estos marcadores se tipifican las CTC en sangre periférica (44,45).

Las CTC son captadas a través del FAST scanning y se observan con el microscopio de inmunofluorescencia a 40X, buscando las células con fenotipo DAPI y CK positivas. Posteriormente se observan con la coloración de Wright-Giemsa, a través de un microscopio óptico (46).

Con esta técnica se evalúa pleomorfismo, se determina el cociente núcleo/citoplasma y se observa la cromatina de las CTC.

## **3. Aplicación clínica**

Esta técnica ha sido utilizada para determinar la presencia de las CTC de tumores sólidos, especialmente en cáncer de mama, enfocada en estudiar las características citomorfológicas de las CTC e investigar nuevas dianas terapéuticas. Aún falta realizar estudios clínicos para que esta técnica sea validada (47,48).

## **DETECCIÓN DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES A TRAVÉS DE FISH (Hibridación in situ fluorescente)**

### **1. La técnica**

Esta técnica utiliza moléculas fluorescentes para poder localizar genes o fragmentos de DNA de la CTC. Se preparan cortas secuencias de DNA, llamadas sondas, las que son complementarias de las secuencias de DNA, según el tumor sólido a estudiar.

Estas sondas son marcadas con fluorocromos y posteriormente se hibridan al DNA complementario, permitiendo así localizar las secuencias en las que se encuentran. Se aplica sobre las CTC y se observa la fluorescencia al microscopio de epifluorescencia (49).

Lo que se pretende observar son cambios citogenéticos según el tipo de CTC estudiada; la presencia de deleciones, traslocaciones o amplificación de genes específicos en los cromosomas de las CTC.

### **2. Aplicación**

Es un método validado para la genotipificación de las CTC, lo que ha permitido estudiar y ampliar conceptos en la genética del cáncer (50).

## CONCLUSIONES

- La determinación de CTC permite monitorizar el seguimiento de la enfermedad, se puede elegir una opción terapéutica y demostrar si este tratamiento está siendo efectivo. Pero también con las CTC se logra evitar que los pacientes se expongan a tratamientos ineficaces y altas toxicidades.
- Los resultados de CellSearch® deben utilizarse de manera conjunta a la información clínica obtenida de las pruebas diagnósticas, al examen físico y a la historia clínica completa. Esta técnica es hasta ahora la única aprobada en el mercado para detección de CTC y autorizada por la FDA.
- El número de CTC encontradas en los carcinomas, están directamente relacionadas con el pronóstico y la supervivencia.
- Actualmente CellSearch® no solo se aplica para valorar el pronóstico o la supervivencia de los pacientes con tumores sólidos; también se usa para valorar la respuesta a la quimioterapia y para determinar los protocolos a seguir según la respuesta al tratamiento.
- La utilización de la RT-PCR permite amplificar el ARNm presente en sangre periférica y por tanto es una metodología útil para detectar pequeñas cantidades de células malignas circulantes. Pero no está validada, se pierde la morfología y tiene alto número de falsos positivos.
- El microchip es una técnica que promete avances en el seguimiento de la respuesta a las distintas terapias, pero aún requiere más estudios clínicos para su validación.
- El microfiltro podría tener el inconveniente, de que el tamaño de las células tumorales varía enormemente según los tipos de tumores estudiados.
- La citometría de flujo tiene la ventaja de preservar todas las células tumorales de la muestra.

- La técnica FAST ha sido empleada para conocer la morfología y tamaño de las CTC.
- La FISH es usada para estudios citogenéticos de las CTC, lo que ha permitido avanzar en la genética del cáncer.
- En los próximos años seguramente conoceremos, gracias a estas técnicas mencionadas, las características específicas de las CTC y su capacidad de metastatizar. Podremos saber qué porcentaje de ellas son células madre u otra subpoblación de células tumorales circulantes, con mayor capacidad de metastatizar, de proliferación, de resistencia a la quimioterapia y radioterapia. Esto permitiría tomar decisiones terapéuticas que aumenten la supervivencia de los pacientes afectados con tumores de órganos sólidos.
- Una perspectiva interesante para los dispositivos de enumeración CTC es que podrían eventualmente ser utilizados para el diagnóstico del cáncer. En un escenario especulativo, una muestra de sangre tomada, por ejemplo, para medir los niveles de lípidos también se podrían utilizar para la presencia de CTC y podría indicar la presencia de un cáncer no sospechado.

## REFERENCIAS

1. Ghossein RA, Bhattacharya S and Rosai J. Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in solid tumors. *Clin Cancer Res* 1999; 5:1950-60.
2. Hoffman V, Bonnetaud C, Marius I. Ilie et al. Preoperative circulating tumor cell detection using the isolation by size of epithelial tumor cell method for patients with lung cancer is a new prognostic biomarker. *American Association for Cancer Research* 2010; November 23, 10.1158/1078-0432.CCR-10-0445.
3. Cohen S, Punt C, Iannotti N, et al. Relationship of Circulating Tumor Cells to Tumor Response, Progression-Free Survival, and Overall Survival in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *Journal of clinical oncology* 2008; volume 28, number 19: 3213-3221.
4. Mocellin S, Keilholz U, Rossi CR, Nitti D. Circulating tumor cells: the 'leukemic phase' of solid cancers. *Trends Mol Med*. 2006; 12(3):130-9.

5. Ashworth TR. A case of cancer with cells similar to those in the tumors was seen in the blood after death. *Australian Med J.* 1869; 14:146
6. Kagan M, Howard D, Bendele T, Rao C and Terstappen LW. A sample preparation and analysis system for identification of circulating tumor cells. *J Clin Ligand Assay.* 2002; 25: 104-10.
7. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res* 2004; 10:6897-90.
8. Okegawa T, Nutahara K, Higashihara E. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with hormone refractory prostate cancer. *J Urol.* 2009; 181: 1091-7.
9. Olivier C, Galante I, San José L, et al. Circulating tumor cells (CTC) in three tumor types of epithelial origin: prostate, breast and colorectal, in patients with and without metastasis. *Eur Urol Suppl.* 2009;8(4):346
10. Cristofanilli M, Budd T, Ellis MJ et al. Circulating tumor cell, disease progression and survival metastatic breast cancer. *N Eng J Med.* 2004; 351: 781-91.
11. Hayes DF, Jeffrey Smerage J. Is There a Role for Circulating Tumor Cells in the Management of Breast Cancer? *Clin Cancer Res* 2008; 14(12); 3646-3650.
12. Hiraiwa K, Takeuchi H, Hasegawa H, et al. Clinical significance of circulating tumor cells in blood from patients with gastrointestinal cancers. *Ann Surg Oncol* 2008; 15:3092-100.
13. Henry NL, Hayes DF. Uses and abuses of tumor markers in the diagnosis, monitoring, and treatment of primary and metastatic breast cancer. *Oncologist* 2006; 11:541-52.
14. Moreno JG, O'Hara SM, Gross S et al. Changes in circulating carcinoma cells in patients with metastatic prostate cancer correlate with disease status. *Urology.* 2001; 58:386-92.
15. Vidaurreta M, Sastre J, Sanz-Casla M.T, Maestro ML et al. Detección y cuantificación de células tumorales en sangre periférica en pacientes con cáncer de colon. *Med Clin (Barc).* 2007; 129(9):333-4.
16. 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.
17. 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.
18. De Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, et al. circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14:6302-9.
19. Maestro ML, Sastre J, Rafael S, Veganzones S et al. Circulating tumor cells in solid tumor in metastatic and localized stages. *Anticancer Res.* 2009; 29(11): 3-7.
20. Kraan J, Sleijfer S, Strijbos S, Maestro ML et al. External Quality Assurance of Circulating Tumor Cell Enumeration Using the CellSearchVR System A Feasibility Study. *International Clinical Cytometry Society.* 2010; DOI: 10.1002/cyto.b.20573.
21. Adams AA, Okagbare PI, Feng J, Hupert ML, Patterson D, Göttert J, et al. Highly efficient circulating tumor cell isolation from whole blood and label-free enumeration using polymerbased microfluidics with an integrated conductivity sensor. *J Am Chem Soc.* 2008; 130(27):8633-41.
22. Cohen SJ, Alpaugh RK, Gross S, et al. Isolation and characterization of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2006; 6:125-132.
23. L. Resel Folkersma L, Olivier Gómez C, San José Manso L et al. Cuantificación inmunomagnética de células tumorales circulantes en pacientes con cáncer de próstata: correlación clínica y patológica. *Arch. Esp. Urol.* 2010; 63 (1): 23-31.
24. Tibbe A.G.J, Miller C.M and Terstappen LWMM. Statistical considerations for enumeration of circulating tumor cells. *Cytometry.* 2007; Part A 71a:154-162.
25. Shaffer DR, Leversha MA, Danila DC, et al. Circulating tumor cell analysis in patients with progressive castration-resistant prostate cancer. *Clinical cancer research.* 2007; 13 (7):2023-2029.
26. Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ et al. Circulating tumor cells versus imaging predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2006; 6403-6409.
27. Ghossein RA, Carusone L, Bhattacharya S. Review: polymerase chain reaction detection of micrometastases and circulating tumor cells: application to melanoma, prostate, and thyroid carcinomas. *Diagn Mol Pathol* 1999; 8:165-75.
28. Ghossein RA, Bhattacharya S. Molecular detection and characterization of circulating tumour cells and micrometastases in solid tumours. *Eur J Cancer.* 2000; 36:1681-1694.
29. Smirnov DA, Zweitzig DR, Foulk BW, et al. Global gene expression profiling of circulating tumor cells. *Cancer Res* 2005; 65:4993-7.
30. Rack B, Schindlbeck C, Schneeweiss A, et al for the SUCCESS Study Group: Prognostic relevance of CTC in peripheral blood of breast cancer patients before and after neoadjuvant chemotherapy: the German SUCCESS-trial [abstract]. *Proc Am Soc Clin Oncol.* 2008; 26-35.
31. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients

- by microchip technology. *Nature*. 2007. Dec 20; 450(7173):1235-9.
32. Asociación Americana para la Investigación del Cáncer (AACR) 100a Reunión Anual: Resumen 2608. Presented April 20, 2009. Presentada 20 de abril 2009.
  33. Bidard FC, Pierga JY, Vincent-Salomon A et al. A "class action" against the microenvironment: do cancer cells cooperate in metastasis? *Cancer Metastasis Rev* 2008; 27: 5–10.
  34. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W et al. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK). *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1180–1184.
  35. Roger S. Riley, M.D., Ph.D. and Michael Idowu, M.D. Principles and applications of flow Cytometry. Department of Pathology Medical College of Virginia/VCU Health Systems Virginia Commonwealth University Richmond, VA. 2007.
  36. Eccles SA, Welch DR. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet* 2007; 369:1742–57.
  37. Gratama JW, Kraan J, Keeney M, et al. Reduction of variation in T-cell subset enumeration among 55 laboratories using single-platform, three or four-color flow cytometry based on CD45 and SSC-based gating of lymphocytes. *Cytometry* 2002; 50:92–101.
  38. Levering WH, van Wieringen WN, Kraan J, et al. Flow cytometric lymphocyte subset enumeration: 10 years of external quality assessment in the Benelux countries. *Cytometry B Clin Cytom* 2008; 74B:79–90.
  39. Gorczyca W, Deptala A, Bedner E, Li X, et al. Analysis of human tumors by laser scanning cytometry. *Methods Cell Biol*. 2001; 64:421-43.
  40. Dagla K, Psarra K, Kapsimali V, et al. Evaluation of circulating tumor cells detection by flow cytometry. SIC and ESCCA 2010. POS-NM-04.
  41. Tibbe AG, Miller MC, Terstappen LW. Statistical considerations for enumeration of circulating tumor cells. *Cytometry A* 2007; 71A:154–162.
  42. Levering WH, Preijers FW, van Wieringen WN, et al. Flow cytometric CD34<sup>+</sup> stem cell enumeration: Lessons from nine years' external quality assessment within the Benelux countries. *Cytometry B Clin Cytom* 2007; 72B:178–188.
  43. Krivacic RT, Ladanyi A, Curry DN, et al. A rare-cell detector for cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101:10501-4.
  44. He W, Wang H, Hartmann LC et al. In vivo quantitation of rare circulating tumor cells by multiphoton intravital flow cytometry. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:11760–5.
  45. Hansen C, Quake SR. Microfluidics in structural biology: smaller, faster em leader better. *Curr Opin Struct Biol* 2003; 13:538 –544.
  46. Saloustros E, Mavroudis D. Cytokeratin 19-positive circulating tumor cells in early breast cancer prognosis. *Future Oncol*. 2010 Feb; 6(2):209-19.
  47. Negin BP, Cohen SJ. Circulating tumor cells in colorectal cancer: past, present, and future challenges. *Curr Treat Options Oncol*. 2010 Jun; 11(1-2):1-13.
  48. Leary RJ, Kinde I, Diehl F, et al. Development of personalized tumor biomarkers using massively parallel sequencing. *Sci Transl Med* 2010; 2:20.
  49. Smirnov DA, Zweitzig DR, Foulk BW et al. Global gene expression profiling of circulating tumor cells. *Cancer Res* 2005; 65:4993– 4997.
  50. Leversha MA, Han J, Asgari Z et al. Fluorescence in situ hybridization analysis of circulating tumor cells in metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:2091–2097.

*Recibido: Septiembre 9, 2010.*

*Aceptado: Abril 20, 2011.*

*Correspondencia: Luz Fernanda Sua Villegas. lufer24@hotmail.com*