



# Uso de citometría de flujo para detectar células tumorales circulantes en pacientes con cáncer de mama

Sonia Chávez-Ocaña,\* Juan Carlos Bravata-Alcántara,\* Gustavo Acosta-Altamirano,\* Octavio Reyes-Hernández,\* Mónica Sierra-Martínez\*

## RESUMEN

**Introducción.** Desde hace una década existe evidencia de la presencia de células tumorales circulantes (CTC) en pacientes con cáncer de mama, esto principalmente ha sido relacionado con estadios avanzados y con ello a mal pronóstico. Hoy en día se ha propuesto su detección para valorar eficacia de algún tratamiento y durante el seguimiento para valorar la reincidencia tumoral, esto en aspirado de médula ósea mediante RT-PCR. Recientemente se ha reportado la detección de este tipo de células en sangre periférica mediante citometría de flujo, lo que haría tener un método rápido y de menor costo, por lo que el propósito de este trabajo fue la búsqueda de CTC en sangre periférica mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales en muestras de mujeres con diagnóstico de cáncer de mama y comparar los resultados con los estándares de diagnóstico que es la mastografía y el estudio histopatológico. **Material y métodos.** Se llevó a cabo un estudio comparativo, prospectivo y transversal. En sangre periférica de 42 mujeres que acudieron por primera vez a la Clínica de Mama de Oncología en el Hospital Juárez de México, las muestras se procesaron y marcaron con un anticuerpo monoclonal (CK19). Las células marcadas se cuantificaron por citometría de flujo en un citómetro Becton-Dickinson, el porcentaje de células marcadas se comparó con los resultados de la mastografía y del estudio histopatológico. **Resultados.** Mediante una prueba de ANOVA de un solo factor se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de células marcadas con CK19 entre las pacientes con tumores benignos y aquellas con tumores malignos, siendo esta diferencia directamente proporcional al estadio de avance de la enfermedad y con la mastografía en los estadios avanzados.

**Palabras clave.** Células tumorales circulantes, citoqueratina, citometría de flujo, anticuerpo monoclonal.

## ABSTRACT

**Introduction.** For a decade EXIST evidence of the presence of circulating tumor cells (CTC) in Patients with Breast Cancer, this has been mainly linked a advanced stages and with a poor prognosis. Today it has been proposed to assess detection do effectiveness of society and treatment during any assess tumor recurrence, on bone marrow aspirate by RT-PCR. Recently reported the detection of this type of cells in peripheral blood by flow cytometry, which would have a quick method and cheaper, so that the purpose of this work was the search of CTC in peripheral blood by citometry with monoclonal antibody in women with breast cancer diagnosis and compared with the standards of diagnostic what is mammography and histopathology. **Material and methods.** A comparative, prospective and cross-sectional study was conducted. Peripheral blood of 42 patients who came first to the breast oncology clinic at the Hospital Juárez de México was obtained. The samples were processed and stained with a monoclonal antibody (CK19), the labeled cells were quantified by flow cytometry on a Becton-Dickinson, the percentage of labeled cells cytometer and compared with the results of mammography and histopathology. **Results.** Using a test ANOVA single factor was found that there were significant differences in the percentages of cells labeled with CK19 among patients with benign tumors and those with malignant tumors, this being directly proportional difference to the stage of disease progression and mammography in advanced.

**Key words.** Circulating tumor cells, cytokeratin, flow cytometry, monoclonal antibody.

\* Laboratorio de Genética, Hospital Juárez de México, Secretaría de Salud.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama corresponde al 10.5% de todos los nuevos casos de cánceres, el único tipo de cáncer que registra más casos es el de pulmón. El 45% de los casos, así como la mayoría de las muertes por cáncer de mama, se registran en los países en vías de desarrollo, y se estima un aumento en las proporciones tanto de casos como de muertes.<sup>1</sup> De 1.35 millones de nuevos casos presentados en 2009, 69,000 se ubicaron en los países de ingresos bajos, 415,000 en los países de ingreso medio-bajo y 224,000 en los países de ingreso medio-alto. La mortalidad por cáncer de mama se concentra en los países en vías de desarrollo debido, en gran medida, a la falta de acceso a la detección temprana y al tratamiento, y muestra una relación clara con el nivel de desarrollo del país. Como proporción de todas las muertes por cáncer entre mujeres, en los países en vías de desarrollo, el cáncer de mama representa 6.4% de las muertes y 7.4% del total de los años de vida saludable potencialmente perdidos (AVISA, DALYs por sus siglas en inglés). Debido a las muertes tempranas por cáncer de mama, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que los años de vida perdidos (AVISA) por cáncer de mama son alrededor de 600,000 en la región de Latinoamérica, cifra tres veces mayor que los años perdidos por muertes de cáncer pulmonar. En ausencia de intervenciones efectivas en los sistemas de salud para la detección y control del cáncer de mama la cifra aumentará a 900,000 en el 2020.<sup>2</sup>

De los más o menos 25,000 genes que se piensa existen en el genoma humano, hay un grupo pequeño que parece importante para la prevención, desarrollo, y progresión del cáncer.

Los genes que se han identificado hasta hoy han sido ordenados en dos categorías amplias, dependiendo de sus funciones normales en las células, protooncogenes, genes supresores de tumor y genes de reparación celular.

A pesar de las diferencias en sus funciones normales, estos genes contribuyen a la división celular descontrolada si se encuentran presentes en la forma mutante (oncogénica) o con algún cambio epigenético. Las proteínas mutantes pueden retener algunas de sus habilidades anteriores, pero ya no tienen la misma sensibilidad hacia los controles que las regulan, algunos oncogenes que están asociados con varios tipos de cáncer se mencionan en el cuadro 1.

### Receptores

En estadios iniciales, la mama es dependiente de estrógenos y la actividad mediada por sus receptores específicos. Aproximadamente 55-70% de los cánceres de mama expresan receptores de estrógenos (RE), por lo que son candidatos a la terapia endocrina, aunque en algunos casos hay resisten-

cia endocrina. Se ha visto que el incremento de coactivadores o inhibición de corepresores, juegan un papel importante en esta resistencia. Inicialmente la expresión aberrante de coreguladores podría ser utilizada como un marcador pronóstico suplementario para determinar la efectividad de la terapia endocrina o para monitorear la progresión del cáncer. RE+: aproximadamente 80% de los casos de cáncer de mama son de receptores de estrógeno positivos.<sup>3</sup>

Entre los procedimientos de detección se incluyen la autoexploración y el examen clínico y el estudio radiográfico. El ultrasonido se ha convertido en una valiosa herramienta, porque es ampliamente disponible, no invasivo y de menor costo que otras opciones, pero el valor de la prueba de ultrasonido depende del operador, de su habilidad y experiencia.

La mamografía moderna puede detectar lesiones muy pequeñas de más o menos 5 mm, lesiones que son imposibles de palpar, así como las microcalcificaciones (< 1 mm) que son un elemento primordial en la detección precoz del cáncer de la mama, ya que 71% de los llamados cáncer de mama mínimo son diagnosticados por su presencia aislada.<sup>4</sup> Sin embargo, incluso con una mamografía de elevada calidad, alrededor de 5 a 10% de los cánceres no son diagnosticados por esta técnica. Una de las causas más frecuentes para este hecho son las mamas radiológicamente densas, que están compuestas fundamentalmente de tejido fibroglandular denso (frecuente en los grupos jóvenes), por este motivo no se debe solicitar mamografía a una paciente menor de 35 o 40 años, esto de acuerdo con el criterio del especialista, porque las lesiones malignas pueden ser muy difíciles de distinguir del tejido normal envolvente que no ofrece el contraste suficiente para hacerlas visibles (sería como buscar una bola blanca de billar en un campo de nieve).

Por otro lado, el estudio de factores relacionados con el pronóstico de la enfermedad ha enfatizado la importancia de las características celulares y demográficas en la supervivencia y mortalidad de las mujeres con cáncer mamario. Clínicamente se toma en consideración la clasificación TNM (tumor-nódulo-metástasis).<sup>5</sup>

Las características celulares notificadas con más frecuencia incluyen la estirpe histológica, otra característica celu-

**Cuadro 1.** Oncogenes asociados al cáncer de mama.

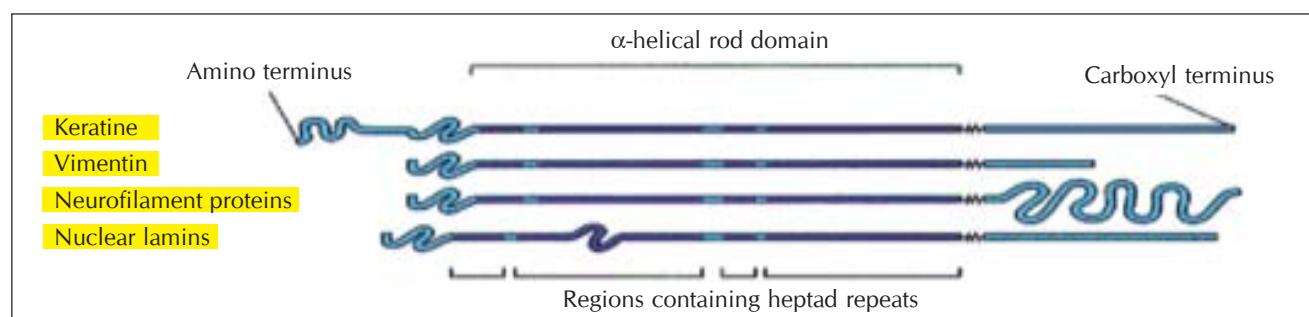
- Ras: molécula para la transducción de señales.
- Myc: factor de transcripción.
- Src: tirosina quinasa.
- hTERT: enzima que funciona en la replicación celular.
- HER-2/neu (erbB-2): receptor de factores de crecimiento.
- Bcl-2: proteína para prevenir apoptosis

lar es el grado histológico de diferenciación. De manera adicional, se ha señalado la presencia de receptores hormonales y algunos marcadores de proliferación celular como HER2/neu, p53, Bcl-2, entre otros, que caracterizan el tipo molecular de cáncer de mama.

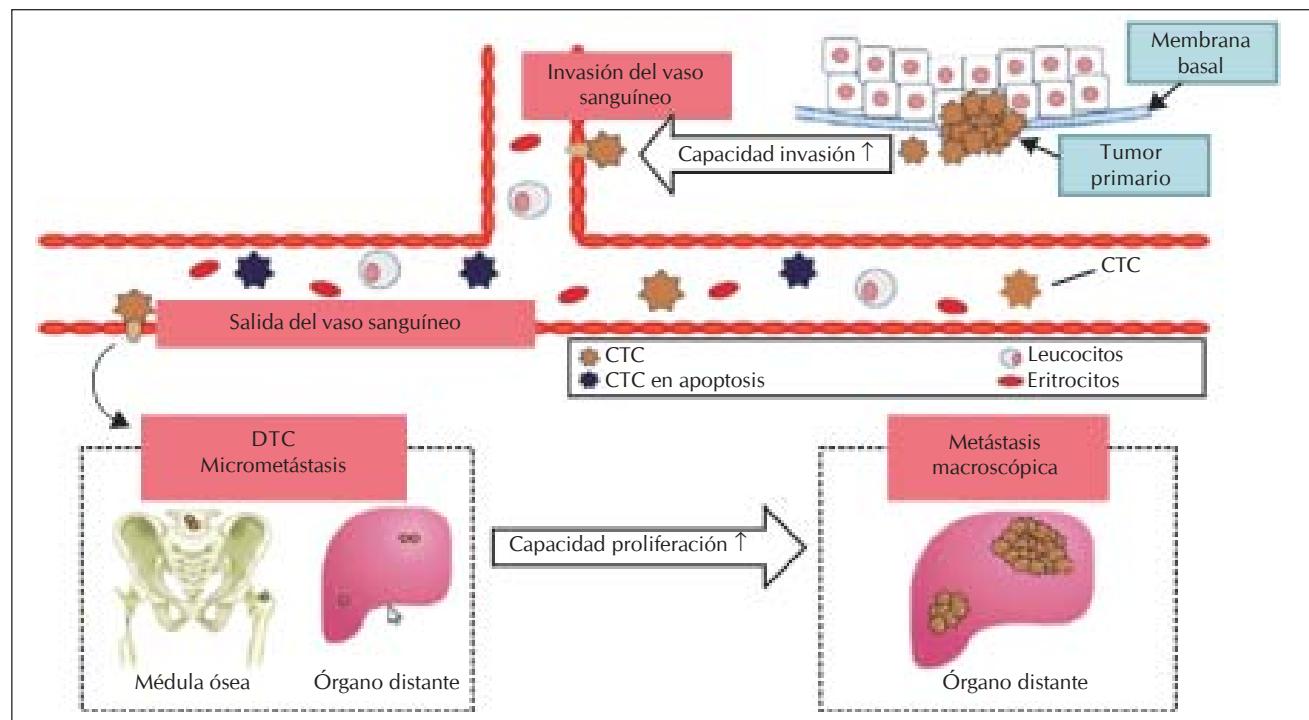
### **Antecedentes específicos**

Desde hace una década existen estudios donde detectan la presencia de citoqueratina en sangre periférica de pa-

cientes con cáncer de mama.<sup>6</sup> Las citoqueratinas (Cks) son filamentos intermedios que se encuentran dentro de las células epiteliales y son esenciales para la estructura normal y funcionamiento del tejido, son responsables de la integridad mecánica celular y tienen una participación crítica en la división celular, motilidad y el contacto célula-célula. Las CKs epiteliales están conservadas filogenéticamente y están fuertemente relacionadas bioquímica e inmunológicamente; en la actualidad se conocen 20 tipos, divididas con base en su homología:<sup>7</sup>



**Figura 1.** Estructura de los filamentos intermedios. Fuente: Carrillo y cols. 2006.<sup>29</sup>



**Figura 2.** Células tumorales circulantes y el proceso metastásico. Células tumorales circulantes y el proceso metastásico. Las CTCs a partir del tumor primario, alcanzan el torrente sanguíneo siendo capaces de sobrevivir durante largos períodos hasta que se infiltran en la médula ósea o en los órganos, dando lugar a micrometástasis que originarán metástasis macroscópicas identificables por pruebas de imagen. Fuente: Revista Eubacteria 2012; 28.

- Tipo II, básicas: 1 a 8.
- Tipo I, ácidas: 9 a 20.

Las citoqueratinas son codificadas por una amplia familia multigénica de aproximadamente 50 diferentes miembros, aunque tienen débil afinidad con otros filamentos intermedios y en general tienen una estructura similar con tres dominios, amino terminal, carboxilo terminal y un dominio alfa hélice (Figura 1).

La expresión de estas Cks se produce con frecuencia en un órgano o tejido específico, por ejemplo, la CK7 se expresa en epitelio del tracto genitourinario mientras que CK20 es más común en el tracto gastrointestinal.

Los subgrupos de Cks que expresa una célula epitelial dependen principalmente del tipo de epitelio, del momento de diferenciación terminal y de la fase de desarrollo. Por lo tanto, son como huellas dactilares que permiten clasificar todos los epitelios según su perfil de expresión.<sup>8</sup>

Además, esto también se aplica a la contraparte maligna del epitelio (los carcinomas), ya que el perfil de citoqueratina tiende a permanecer constante cuando el tejido sufre una transformación maligna. Normalmente, las Cks muestran muy baja solubilidad, modificaciones postraducionales en el dominio central son relativamente raras, pero en los extremos N- y C-terminal, como fosforilación glicosilación y transglutaminación, influyen en la actividad biológica de los filamentos resultando en incremento de la solubilidad y reorganización.

Recientemente, se ha considerado el papel de las Cks durante la apoptosis. La falla de las células que llevan a una muerte celular apropiada se ve en varias patologías, incluyendo cáncer (Figura 2). Las características morfológicas de apoptosis como la fragmentación nuclear y la formación de cuerpos apoptóticos, son el resultado de un rompimiento vía caspasas, la mayoría de las Cks son substrato para caspasas, una consecuencia de esta digestión es la exposición de un epítopo sugiriendo como causa de los fragmentos encontrados en el espacio extracelular.<sup>9</sup>

La utilidad clínica de las CKs como marcadores tumorales está bien establecida y reflejan actividad tumoral teniendo un valor predictivo de la enfermedad muy preciso; pudiendo detectarse antes que el resto de los métodos convencionales, siendo una buena herramienta para ver efectividad de un tratamiento y con ello tomar decisiones mucho más precisas.

Uno de los estudios de Cks más utilizados es la medición de fragmentos solubles de CK19<sup>10</sup> como marcador de cáncer de mama, colon, pulmón y vejiga, viendo la necesidad de utilizar otros marcadores que contribuyan a su especificidad.

Algunos estudios han buscado la presencia de la expresión de CK19 en las pacientes con cáncer de mama tratándolo de relacionar desde los estadios tempranos como un valor de mal pronóstico, llegando a compararlo incluso con la clasificación TNM, receptores de estrógenos, grado histológico, entre otros, refiriendo que la presencia de CK-19 es un factor de mal pronóstico.<sup>11,12</sup> Por otro lado, no es claro si el DNA libre que es amplificado en sangre periférica es de CTCs o si proviene de tumores primarios, tumores metastásicos o de tejido normal; con la RT-PCR se han identificado en sangre periférica pequeñas cantidades de moléculas de mRNA específicas de determinadas proteínas que sólo son expresadas por las células epiteliales de tumores sólidos. Este fenómeno, además de demostrar la presencia de la célula tumoral en sangre, también demuestra que posee su maquinaria de transcripción activa y, por tanto, su capacidad invasiva está intacta.<sup>13,14</sup>

Con el uso de la RT-PCR se ha conseguido aumentar la sensibilidad, pudiendo discriminar la transcripción ilegítima, resolviendo en gran parte los falsos positivos que puedan aparecer. Aunque estas técnicas indirectas presentan el inconveniente de no observar la morfología celular, lo compensan con la posibilidad de usar gran cantidad de marcadores moleculares simultáneamente aumentando la sensibilidad y la especificidad de una forma significativa, convirtiéndose en un método idóneo para la detección de recidivas por vía hematogena y para identificar el alto riesgo de metástasis en el cáncer de mama.<sup>15,16</sup>

### **Papel de las CTCs en el cáncer de mama**

Las CTCs han sido ampliamente estudiadas por su valor pronóstico en el cáncer de mama. Cuando están presentes en sangre periférica, después de una cirugía potencialmente curativa, es lógico pensar en riesgo de recidiva y, por tanto, las pacientes son obvias candidatas al tratamiento adyuvante.<sup>17,18</sup>

Hay autores que sugieren que la detección precoz del cáncer de mama metastásico se puede realizar mediante la detección de CTCs mediante la cuantificación por Cell-SearchR, RT-PCR y RT-PCR a tiempo real con el marcador CK19, proponiéndolo como un factor pronóstico independiente que disminuye el intervalo libre de enfermedad (*disease-free interval, DFS*) y la supervivencia general (*overall survival, OS*).<sup>19,20</sup> A la misma conclusión han llegado otros investigadores usando otros marcadores como la Maspina, que es una proteína relacionada con la familia serpina de inhibidores de la proteasa, sintetizada por las células epiteliales del tejido mamario.<sup>21</sup>

También la mamo-globina (MGA), proteína que exhibe homología con varias proteínas secretoras epitelia-



les, formando parte de la superfamilia de las secretoglobinas (SCGB). La determinación de MGA se ha convertido en uno de los principales métodos para la detección de CTCs mediante RT-PCR, y es el marcador de cáncer de mama más estudiado después de la CK-19, proponiéndolo como un indicador pronóstico adicional.<sup>22,23</sup> La citometría de flujo es un tecnología que nos proporciona información cuantitativa precisa, analiza células rápida e individualmente comparándola incluso con la RT-PCR, por lo que recientemente se ha propuesto como método que indica la progresión de cáncer de mama en los estadios II a IV.<sup>24</sup>

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional, prospectivo, comparativo, transversal. Se trabajó con muestras de sangre periférica de pacientes del Hospital Juárez de México, mientras que la investigación se efectuó en el laboratorio central, laboratorio de citometría de flujo en la unidad de Investigación del Hospital Juárez de México, así como en la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional.

Los criterios de inclusión fueron pacientes que llegaran a la consulta de mama por primera vez al Servicio de Oncología del Hospital Juárez de México, sin antecedentes de otro tipo de neoplasias y que hayan aceptado ingresar al estudio bajo firma del consentimiento informado, las pacientes que acudieron con reporte de tumoración benigna se tomaron como controles.

### **Obtención y procesamiento de las muestras**

Se tomaron muestras de sangre periférica en tubos con EDTA de las pacientes que cubrían los criterios de inclusión, eliminando los primeros 5 mL, para evitar contaminación con la piel.

Se llevó a cabo la cuantificación de las células nucleadas en el analizador automático para biometría hemática Cell Dyn 3000  $\times 10^6$  / $\mu$ L. Se ajustó la cantidad de 0.5-1  $\times$   $10^6$ /L de células nucleadas en PBS, a partir de la cual se tomaron alícuotas de 120  $\mu$ L para ser depositadas en los tubos Falcon; posteriormente se determinó la cantidad de células positivas para CK19 por citometría de flujo en cada muestra del paciente.

### **Tinción**

Para la detección de células positivas para CK19 se colocaron en un tubo Falcon 0.5-1  $\times$   $10^6$ /L células mononucleares viables en 100  $\mu$ L de anticuerpo marcado con

CK19. Se procedió a la permeabilización de las células con 200 mL de solución permeabilizadora por 7 min, luego se lavó con amortiguador de fosfatos, se resuspendió, se volvió a centrifugar a 300 x g durante 5 min, se eliminó el sobrenadante, se resuspendió en vórtex a baja velocidad y se adicionaron 20  $\mu$ L de anticuerpo monoclonal CK19. Se mezcló e incubó durante 25 min a 4°C en la oscuridad. Transcurrido este tiempo se adicionaron 2 mL de PBS, se centrifugó, decantó y se resuspendió en PBS para la adquisición de datos.<sup>17</sup>

### **Adquisición de datos**

La adquisición de los datos se realizó por medio del programa Cell Quest Pro versión 3.2.1. Apple System 7.6.1, analizando 500,000 eventos totales, posteriormente, en un gráfico de puntos ajustando primero la autofluorescencia de las células, colocando los marcadores de los cuadrantes en un valor entre 101 y 102, tanto para el eje de las abscisas como para el eje de las ordenadas, colocando dicha autofluorescencia en el cuadrante inferior izquierdo.

### **Análisis**

La selección de la región de las células de interés (R1) se hizo a partir de una gráfica de puntos *dot plot*, se analizó la expresión de las células CK19+. Se obtuvieron los resultados de dicha región en forma de porcentaje. Se compararon y analizaron los resultados.

Inmunohistoquímica de líneas celulares de cáncer de mama: se recabaron los datos obtenidos en las biopsias de cáncer de mama sobre receptores de estrógenos, receptores de progesterona y Her2/neu.

### **Captura y procesamiento estadístico de datos**

Aceptamos un riesgo de 5% y deseamos un poder estadístico de 95% para detectar diferencias, si es que existían.

El procesamiento de los resultados se realizó con el programa SPSS.18, utilizando ANOVA de un solo factor, particularmente con el modelo lineal general univariante, se analizó la homogeneidad de los grupos con prueba le Levenne y la variabilidad entre grupos con la prueba de Tukey.

## **RESULTADOS**

Se incluyeron 42 pacientes, de las cuales 13 fueron controles sanas y 29 positivas a cáncer de mama (Cuadro 2); el promedio de porcentaje de presencia CK19 en las pacientes con resultado de biopsia negativa a malignidad (para el

**Cuadro 2.** Niveles de porcentaje de CK 19 según estadio.

Negativas	I	II	III	IV
3.22	34.87	34.28	72.55	82.02
15.99	35.80	26.58	71.34	93.70
2.31	38.59	43.66	30.68	88.34
11.69	28.40	53.05	71.34	94.66
3.92	27.93	42.55	66.65	93.62
25.99	44.87	22.40	68.40	
2.87	33.22	43.26	72.35	
1.29			62.22	
7.95			56.03	
10.00			57.48	
3.22				
1.00				
3.24				

Promedio para el grupo control negativo: 7.1%. Estadio I: 33.70%. Estadio II: 38.6%. Estadio III: 62.9%. Estadio IV: 90.1%. Claramente son mayores mientras mayor es el estadio de las pacientes.

**Cuadro 3.** Niveles promedio de CK19 por grupo.

N	Media	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
		Límite inferior	Límite superior		
Estadio I	7	33.7514	30.0360	37.4669	27.93
Estadio II	6	38.6000	26.3954	50.8046	22.40
Estadio III	10	62.9040	53.7170	72.0910	30.68
Estadio IV	6	90.1117	85.0209	95.2025	82.02
Negativo	13	7.1300	2.7411	11.5189	1.00
Total	42	41.1967	31.7608	50.6325	1.00

Número de pacientes por grupo: controles negativas a cáncer: 13. Estadio I: siete. Estadio 2: seis. Estadio 3: 10. Estadio 4: seis. Las medias por grupo únicamente entre el estadio 1 y 2 son muy parecidas. El intervalo de confianza por grupo no es desproporcionado, al igual que los niveles de los límites superior e inferior.

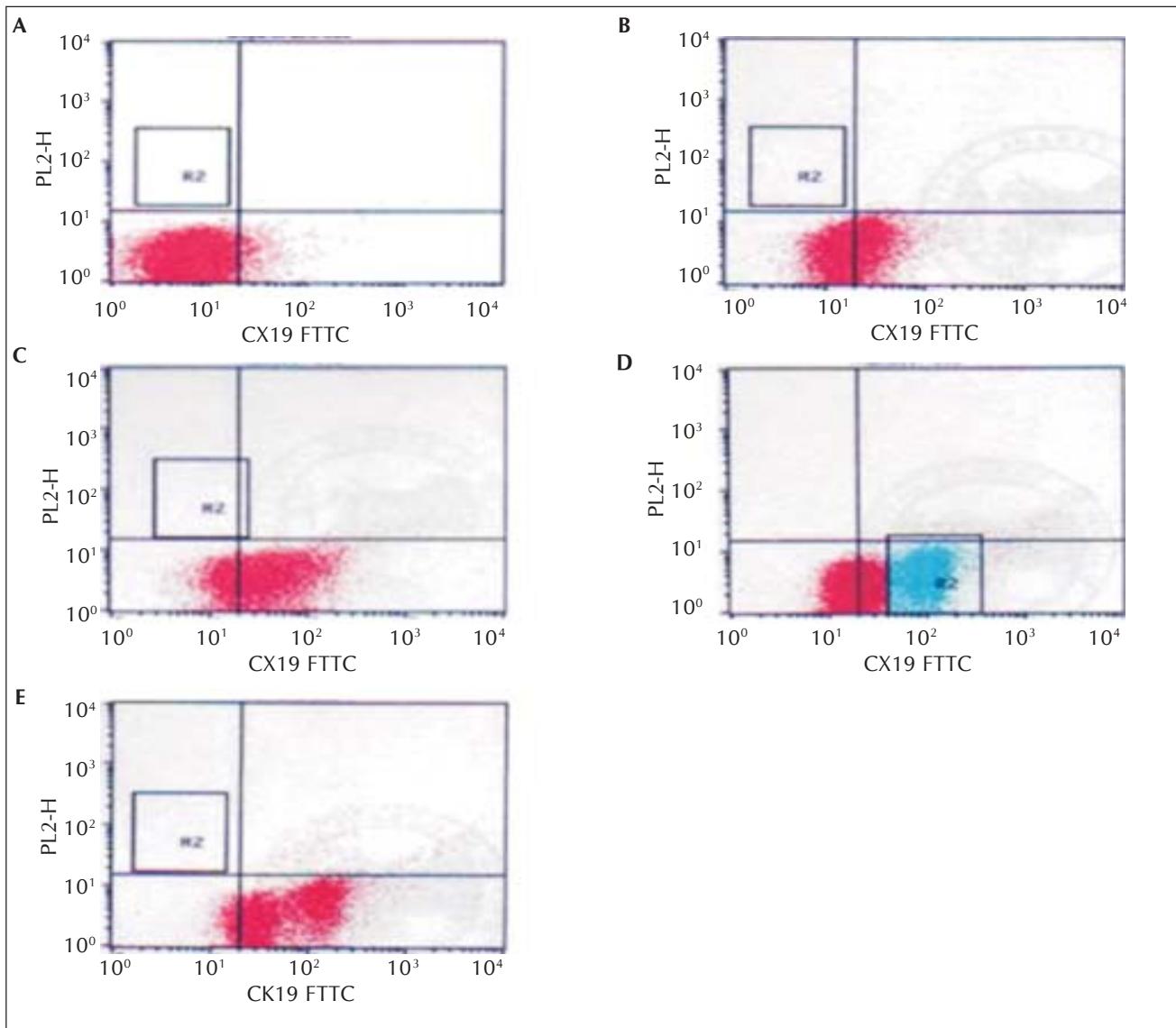
grupo control) fue de 7.1, en el estadio clínico (EC) I de 34.81 con siete casos; EC II, 38, siete casos; EC III, 62.9, 10 casos; EC IV, 90.46, cinco pacientes (Figura 3); aunque aparentemente los resultados son diferentes en el grupo de las pacientes control –negativas a cáncer–, hubo una paciente con niveles muy cercanos a los que las pacientes de estadio I presentaban; asimismo, entre el estadio I y II la diferencia no es significativa al contrario de las pacientes con EC III y IV (Figura 4).

En el análisis inter e intragrupos de Tukey de los niveles de positividad para CK19 encontramos diferencia estadísticamente significativa entre las pacientes que fueron negativas a cáncer y las pacientes de cualquier estadio, además la variación intragrupo, la diferencia a excepción de entre los grupos I y II es estadísticamente significativa (Cuadro 3). Este mismo análisis sólo es estadísticamente significativo en el estadio IV con el análisis de BIRADS y sin diferencia respecto a la presencia de receptores de es-

trógenos, de progesterona Her2/neu y el porcentaje de CK19 encontrado.

## DISCUSIÓN

Es preocupante el incremento de los casos de cáncer de mama en la población mundial. En nuestro país también se ha presentado este incremento, probablemente se deba a las modificaciones en nuestra alimentación y al sedentarismo, así como la falta de medidas preventivas y de detección eficaces; sin embargo, debemos de enfocar nuestro esfuerzo para encontrar métodos confiables que puedan detectar el padecimiento desde estadios tempranos y con ello disminuir su mortalidad. Actualmente, casi 10% de las mujeres tienen riesgo de desarrollar cáncer y a pesar de que existen mejores medicamentos, el pronóstico a cinco años es menos de 50%.



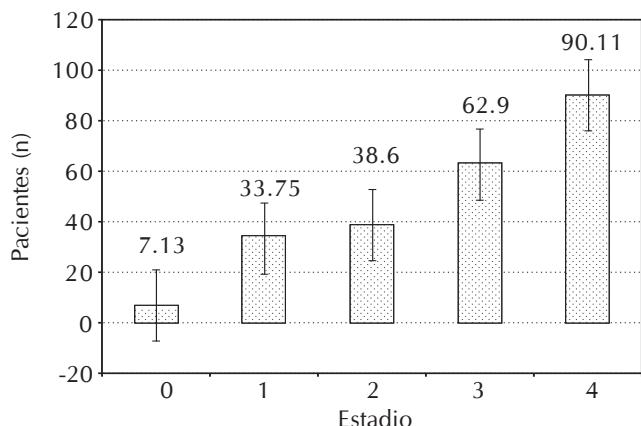
**Figura 3.** Adquisición de datos por grupo. **A.** Baja presencia de células que se marcan con el anticuerpo monoclonal para CK19, en la región del cuadrante inferior izquierdo, en este caso fue una paciente control negativa a cáncer con 2.31% de positividad, mientras que el promedio de este grupo fue de 7.1%. Promedio de positividad para CK19: **B.** Estadio I, 33.70%. **C.** Estadio II, 38.6%. **D.** Estadio III, 62.9%. **E.** Estadio IV, 90.1%.

El estudio de factores relacionados con el pronóstico de la enfermedad ha enfatizado la importancia de las características celulares y demográficas en la supervivencia y mortalidad de las mujeres con cáncer de mama.

La incidencia de cáncer mama a nivel mundial y en nuestro país está en ascenso; el cambio en el estilo de vida, el poco apego a medidas preventivas y de detección hace que la prevalencia de estadios avanzados sea elevada, y como consecuencia repercute en su mortalidad. El estudio de factores pronósticos y predictivos de esta enferme-

dad ha mejorado la sobrevida y el periodo libre de enfermedad.

Estudios previos indican que células epiteliales del tumor inicial pueden ser reconocidas en sangre periférica (células tumorales circulantes, CTC), las cuales han sido asociadas a recurrencia y metástasis del cáncer de mama. Las CKs y en especial CK19 se ha propuesto como un marcador útil para detectar células tumorales en sangre periférica y con ello predecir la recurrencia, mejorando así la sobrevida.<sup>25,26</sup> Existe evidencia de que esta liberación no sólo es



**Figura 4.** Cuantificación de CK19 por grupo.

por un proceso de apoptosis, sugiriendo incluso que pueden contribuir a la progresión del cáncer, dando un valor estadísticamente más significativo con respecto a la presencia de otras líneas celulares cancerosas previamente conocidas como MUC1, los receptores de estrógenos y la clasificación TNM, aunque también se ha sugerido su uso simultáneo para elevar su sensibilidad y especificidad o incluso en combinación con otros marcadores moleculares.

La citometría de flujo es una tecnología que aparte de dar información precisa es rápida, y en cuanto a la cuantificación de poblaciones celulares se ha comparado con la precisión de RT-PCR, y así evitar la expresión ilegítima.<sup>27-29</sup>

En este estudio se analizaron 42 muestras de pacientes que acudieron a la consulta de mama por primera vez. Existe diferencia significativa entre el grupo de mujeres sanas y las pacientes con diagnóstico de cáncer de mama; aunque el número de casos es bajo, se abre una puerta para continuar su vigilancia, incluso de estos mismos grupos viendo el seguimiento y realizar varias medidas a lo largo de su tratamiento y vigilancia.

Del grupo control vale la pena ver el seguimiento, ya que incluso algunos investigadores proponen que se pueden encontrar CTC con meses de antelación a la presencia clínica del cáncer y así establecer una ventana de diferencia en cuanto a las pacientes sanas y en las que tienen riesgo de desarrollar cáncer. Por otro lado, tal como lo sugieren Ignatidis y Banbarg, entre otros investigadores, es conveniente que se incremente el número de marcadores que también se han relacionado con la presencia de CTC y en un futuro establecer un tamizaje de fácil acceso y con alto índice de sensibilidad. Los estudios de CTC dan un nuevo valor que pueda utilizarse como valor pronóstico y puede en tiempo real redirigir el tratamiento en pacientes con cáncer de mama.<sup>21</sup> Algunos investigadores sugieren que la presencia de CK19 podría buscarse en los nódulos centi-

nelas, siendo superiores a otros marcadores ya estudiados como p63, receptores de estrógenos o junto con ellos como MGB1<sup>24</sup> y HER221 y en pacientes bajo tratamiento o incluso posterior al mismo.

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

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

## CONCLUSIONES

- La presencia de CK19 en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama se encuentra más elevado mientras mayor es el estadio clínico.
- Los niveles de CK19 no tienen relación con la presencia de receptores de estrógenos.
- Los niveles de CK19 no tienen relación con los porcentajes de receptores de progesterona.
- Los niveles de CK19 no tienen relación con la presencia de receptores de Her2/neu.
- El uso de multimarcadores para la detección de CTCs aumenta la probabilidad de detectar las células que hayan perdido algún marcador epitelial como consecuencia de la diseminación tumoral, y además de servir como herramienta pronóstica, definiría las subpopulaciones de CTCs con gran capacidad invasiva y resistentes en función de los marcadores detectados.

## REFERENCIAS

1. Noriega Reyes MY, Langley McCarron E. Correguladores del receptor de estrógenos y su implicación en el cáncer mamario. *Cancerología* 2008; (3): 29-40.
2. Murray CJ, López AD. *The Global Burden of Disease: a comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020*. Harvard University Press, Cambridge; 1996.



3. Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Miller MC, 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(14, Pt. 1): 4218-24.
4. Rodríguez-Cuevas S, Guisa-Hohenstein F, Labastida-Almendaro S. First breast cancer mammography screening program in Mexico: Initial results 2005-2006. *Breast J* 2009; 15(6): 623-31.
5. Liska V, Holubec L Jr, Treska V, Vrzalova J, Skalicky J, et al. Evaluation of tumour markers as differential diagnostic tool in patients with suspicion of liver metastases from breast cancer. *Anticancer Res* 2011; 31(4): 1447-51.
6. Rack B, Schindlbeck C, Jückstock J, Andersgassen U, Hepp P, et al. Circulating tumor cells predict survival in early average-to high risk breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2014; 106(5).
7. Schweizer J, Bowden PE, Coulombe PA, Langblein L, Lane B, Magin TM, et al. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol* 2006; 174(2): 169-74.
8. You F, Robers LA, Kang SP, Nunes RA, Dias C, Iglehart JD, et al. Low-Level expression of HER2 and CK19 in normal peripheral blood mononuclear cells: relevance for detection of circulating tumor cells. *J Hematol Oncol* 2008; 1: 2.
9. Markou A, Strati A, Malamos N, Georgoulas V, Lianidou ES. Molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer by a liquid bead array hybridization assay. *Clin Chem* 2011; 57(3): 421-30.
10. Saloustros E, Mavroudis D. Cytokeratin 19-positive circulating tumor cells in early breast cancer prognosis. *Future Oncol* 2010; 6(2): 209-19.
11. Alix-Panabières C, Vendrell JP, Sliper M, Pelle O, Barbotte E, Mercier G, et al. Full length cytokeratin-19 released by human tumor cells: a potential role in metastatic progression of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2009; 11(3): R39.
12. Fisher CS, Cole DJ, Mitas M, Garrett-Meyer E, Metcalf JS, Gillanders WE, et al. Molecular detection of micrometastatic breast cancer in histopathology-negative axillary lymph nodes fails to predict breast cancer recurrence: a final analysis of prospective multi-institutional cohort study. *Ann Surg Oncol* 2010; 17 (Suppl. 3): 312-20.
13. Chen Y, Zou TN, Wu ZP, Zhou YC, Gu YL, et al. Detection of cytokeratin 19, human gammaglobin, and carcinoembryonic antigen-positive circulating tumor cells by three-marker reverse transcription-PCR assay and its relation to clinical outcome in early breast cancer. *Int J Biol Markers* 2010; 25(2): 59-68.
14. Huang SB, Bae JW, Lee HY, Kim Hy. Circulatin Tumor Cells Detected by RT-PCR for CK-20 before surgery indicate Worse Prognostic Impact in Triple-Negativa and HER Subtype Breast Cancer. *J Breast Cancer* 2012; 15(1): 34-42.
15. Zhao S, Liu Y, Zhang Q, Li H, Zhang M, Ma W, et al. The prognostic role of circulating tumor cells (CTCs) detected by RT-PCR in breast cancer: a meta-analysis of published literature. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 130(3): 809-16.
16. Marrakchi R, Querhani S, Benamar S, Rouissi K, Bouhaha R, Bougatef K, et al. Detection of cytokeratin 19 mRNA and CYFRA21-1 (cytokeratin 19 fragments) in blood of Tunisian women with breast cancer. *Int J Biol Markers* 2008; 23(4): 238-43.
17. Xenidis N, Ignatiadis M, Apostolaki S, Perraki M, Kalbakis K, Agelaki S, et al. Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells after adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(13): 2177-84.
18. Daslakati A, Angelaki S, Perraki M, Apostolaki S, Xenidis N, Stathopoulos E, Kontopodis E. Detection of citokeratin-19 mRNA positive cells in the peripheral blood and bone marrow patients with operable breast cancer. *Br J Cancer* 2009; 101(4): 589-97.
19. Effenberger KE, Borgen E, Eulenborg CZ, Bartkowiak K, Grosser A, Synnestvedt M, et al. Detection and clinical relevance of early disseminated breast cancer cells depend on their cytokeratin expression pattern. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 125(3): 729-38.
20. Wang L, Wang Y, Liu Y, Chang M, Wu Y, Wei H. Flow cytometric analisis of CK19 expression en the peripheral blood of breast carcinoma patients: relevance for circulating tumor cell detection. *J Exp Clin Cancer Res* 2009; 28: 57.
21. Ignatiadis M, Kallergi G, Ntoulia M, Perraki M, Apostolaki S, Kafousi M, et al. Prognostic value of the molecular detection of circulating tumor cells using a multimarker reverse transcription-PCR assay for cytokeratin 19, gammaglobin and HER2 in early breast cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14(9): 2593-600.
22. Tjensvoll K, Oltedal S, Farmen RK, Shammas FV, Heikkilä R, Kvæloey JT, et al. Disseminated tumor cells in bone marrow assessed by TWIST1, cytokeratin 19, and gammaglobin A mRNA predict clinical outcome in operable breast cancer patients. *Clin Breast Cancer* 2010; 10(5): 378-84.
23. Payne RE, Hava NL, Page K, Blighe K, Ward B, Slade M, Brown J, et al. The presence of disseminated tumour cells in the bone marrow is inversely related to circulating free DNA in plasma in breast cancer dormancy. *Br J Cancer* 2012; 106(2): 275-82.
24. Reinholtz MM, Kitzmann KA, Tenner K, Hillman D, Dueck AC, Hobday TJ, et al. Cytokeratin-19 and gammaglobin gene expression in circulating tumor cells from Metastatic Breast Cancer patients enrolled in North Central Treatment Group Trials, N0234/336/436/437. *Clin Cancer Res* 2012; 17(22): 7183-93.
25. Sanisho L, Vertakova-Krakovska B, Kuliffay P, Brtko J, Galbava A, Galvavy S. Detection of circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. *Endocr Regul* 2011; 45(3): 113-24.
26. Visser M, Jiwa M, Horstman A, Brink AA, Pol RP, van Diest P, et al. Intra-operative rapid diagnostic method based on CK19



- mRNA expression for the detection of lymph node metastases in breast cancer. *Int J Cancer* 2008; 122(11): 2562-7.
27. Kwon Y, Ro J, Kang HS, Kim Sk, Hong EK, Khang SK, et al. Clinicopathological parameters and biological markers predicting non-sentinel node metastasis in sentinel node-positive breast cancer patients. *Oncol Rep* 2011; 25(4): 1063-71.
28. Pujol JL, Grenier J, Daurès JP, Daver A, Pujol H, Michel FB. Serum fragments of cytokeratin subunit 19 measured by CYFRA 21-1 immunoradiometric assay as a marker of lung cancer. *Cancer Res* 1993; 53(1): 61-6.
29. Carrillo-González N, Ortúñoz-Sahagún D, Gudiño-Cabrera G. Expresión de las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  del mRNA del GFAP durante la diferenciación de PNM de BO de rata adulta hacia el fenotipo

de aldainoglía y en glía envolvente purificada. En: Avances en la Investigación Científica en el CUCBA. México, 2006; 267-73.

**Solicitud de sobretiros:**

Sonia Chávez-Ocaña  
Laboratorio de Genética  
Hospital Juárez de México  
Secretaría de Salud  
Av. Instituto Politécnico Nacional, Núm. 5160  
Col. Magdalena de la Salinas  
C.P. 07760, México, D.F.  
Tel.: 5747-7560  
Correo electrónico: soncargen@yahoo.com.mx