



UNIVERSIDAD DE JAÉN

**FACULTAD DE CIENCIAS
EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE
LA SALUD**

TESIS DOCTORAL
**UTILIDAD PRONÓSTICA DE LA DETECCIÓN
DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES
(CTCS) EN PACIENTES CON TUMORES
SÓLIDOS DE ORIGEN EPITELIAL**

**PRESENTADA POR:
MARÍA CAMPOS SEGURA**

**DIRIGIDA POR:
DR. D. JOSÉ JUAN GAFORIO MARTÍNEZ**

JAÉN, 25 DE MAYO DE 2012

**ISBN 978-84-8439-664-2
DEPÓSITO LEGAL J-1209-2012**



Área de Inmunología

Departamento de Ciencias de la Salud

Facultad de Ciencias Experimentales

Universidad de Jaén

*Utilidad pronóstica de la detección de
células tumorales circulantes (CTCs) en pacientes
con tumores sólidos de origen epitelial.*

Tesis Doctoral

María Campos Segura

2012

***Utilidad pronóstica de la detección de células
tumores sólidos de origen epitelial.***

Memoria para optar al grado de Doctor

Jaén, 2012

Fdo: María Campos Segura

Aspirante al Grado de Doctor

El Director del trabajo:

Fdo: José Juan Gaforio Martínez

Área de Inmunología. Departamento de Ciencias de la Salud

Facultad de Biología Experimental. Universidad de Jaén

D. José Juan Gaforio Martínez, perteneciente al Área de Inmunología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de Jaén

CERTIFICA: Que el trabajo expuesto en la presente Tesis Doctoral: “Utilidad pronóstica de la detección de CTCs en pacientes con tumores sólidos de origen epitelial” presentado por D^a. María Campos Segura ha sido realizado bajo mi dirección y supervisión, cumpliendo así mismo todas las exigencias para su presentación y defensa para optar al grado de Doctor. Parte del trabajo presentado ha sido realizado durante la estancia de la doctoranda en el Laboratorio de Nuevas Dianas Terapéuticas, de la División de Oncología del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) de Pamplona.

Jaén, 3 de marzo de 2012

Fdo: José Juan Gaforio Martínez



Este trabajo ha sido subvencionado por el Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación, (FIS 02/1879, Grupo PAI CTS-442), la Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña (II Convocatoria de Ayudas a Proyectos de Investigación Médica, 2004), la Convocatoria de Becas y Ayudas para la Formación de Doctores y del Personal Docente e Investigador en las Universidades y Centros de Investigación de Andalucía (Orden de 31 de marzo de 2003; BOJA número 68), con cargo al cual la doctoranda ha disfrutado de una beca de formación de personal investigador así como de ayudas para la realización de la estancia en otro centro de investigación, y la Convocatoria de Incentivos para la Contratación Laboral de Personal Beneficiario de Becas y Ayudas para la Formación de Doctores y del Personal Docente e Investigador (Orden de 25 de noviembre de 2005; BOJA número 240), con cargo al cual la doctoranda ha disfrutado de un contrato de formación de personal investigador.

A mis padres, a mis hermanos y a Sergio

A Jose

Esta tesis ha sido obra del esfuerzo propio y de la colaboración de un grupo de gente, que con su trabajo y/o apoyo me han permitido conseguir este fin.

Por lo tanto quiero agradecer al personal que forma parte de la Universidad de Jaén (UJA), del Hospital Universitario de Jaén y al Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) de Pamplona.

Especialmente quiero dar las gracias a mi director de tesis, el Dr. José Juan Gaforio, por iniciarme en este mundo de la investigación, por estimular mi materia gris y ensañarme a aplicar el método científico.

A Fernando Warleta Arias, aunque yo lo conocí como Arias Warleta, por soportar el día a día conmigo y aún así mantener nuestra amistad, por compartir una etapa trascendental en mi vida, por imaginar negocios imposibles y por ser simplemente “él”.

A mis “compis” Jesús Ruiz-Mora y Nicolás de la Torre, por enseñarme que siempre hay otros caminos, y a Cristina Sánchez-Quesada, como firma en los artículos, por ser lo que hacía falta en los últimos momentos para ayudarme a dar ese empujón y saltar.

A los compañeros de Microbiología, especialmente Pilar Viedma, María José Grande y Hikmate Abriouel, y a los becarios del “despacho 209”, una combinación única con su propia idiosincrasia, por lo que hemos compartido.

A Ignacio Algarra y Margarita García, dos refuerzos emocionales que te hacen ver las cosas desde otra perspectiva.

A Pilar Iglesias, Antonio Luis Sancho y Ángela Ortiz, tres personas fantásticas.

A Miguel Delgado, por atender y sufrir todas mis dudas y preguntas, por esas mañanas interminables donde quiso hacerme “volver a entender” la estadística.

A la “gente” del CIMA, especialmente Alfonso Calvo, Raúl Catena y Maribel Zudaire, y a aquellos con los que, aunque no trabajé directamente, conviví y fueron muy importantes durante esos seis meses (Erik Oliemuller, Inmaculada López, Paul Alain Nguewa, Ana Fernández, Jackeline Agorreta, María José Pajares, Carlos Ortiz de Solórzano, David García, y otros que me dejó en el tintero).

A mis amigos Rocío Tiscar y Pedro Sagra, por haber sido “oídos” para mí.

A mis padres, por apoyarme sin condiciones, por involucrarse, por ser inspiración, por ser “motor”, por todo, y aún así no digo nada.

A mis hermanos, por ser ejemplo de superación personal y una de mis metas en la vida.

A Sergio, por querer que terminase este “libro”.

Al resto de mi familia por su apoyo y “fuerza”.

A Jose, por haber estado ahí, siempre ahí. Mi “pequeña y persistente” luz en la oscuridad.

A todos ellos y a los que no he nombrado.

Gracias

Dadme un punto de apoyo y moveré el mundo

(ARQUÍMEDES) 287-212 a.C.

*La explicación más simple y suficiente es la más probable, mas no
necesariamente la verdadera*

La navaja de Ockham (GUILLERMO DE OCKHAM) 1285-1349

ABREVIATURAS

Abreviaturas

Utilidad pronóstica de la detección de células tumorales circulantes (CTCs) en pacientes con tumores sólidos.

μm	micrómetro
AJCC	Comité Conjunto Americano del Cáncer, acrónimo derivado de su nombre en inglés (American Joint Committee on Cancer)
Anti-AE1-AE3	anticuerpo biclonal formado por el cóctel de los clones AE-1 y AE-3
Anti-CK	anticuerpo frente a citoqueratinas
APC	gen de la poliposis adenomatosa coli, acrónimo derivado de su nombre en inglés (adenomatous polyposis coli)
ASCO	Asociación Americana de Oncología Clínica, acrónimo derivado de su nombre en inglés (American Association Clinical Oncology)
C(D)ETCs	células epiteliales tumorales diseminadas o circulantes, acrónimo derivado de su término en inglés (circulating (disseminated) epithelial tumor cells)
CEP17	sonda centromérica del cromosoma 17, acrónimo derivado de su nombre en inglés (chromosome 17 centromere probe)
CK	citoqueratina, acrónimo derivado de la palabra inglesa (cytokeratin)
CK-/CTCs	células tumorales circulantes citoqueratina negativas, acrónimo derivado de las palabras inglesas (cytokeratin negative/circulating tumor cells)
CK+	células citoqueratina positivas, acrónimo derivado de la palabra inglesa (cytokeratin positive)
CK+/CTCs	células tumorales circulantes citoqueratina positivas, acrónimo derivado de las palabras inglesas (cytokeratin positive/circulating tumor cells)
cm	centímetro
CSCs	células madre cancerosas, acrónimo derivado de su nombre en inglés (cancer stem cells)

Abreviaturas

Utilidad pronóstica de la detección de CTCs en pacientes con tumores sólido de origen epitelial.

CTCs	células tumorales circulantes, acrónimo derivado de su nombre en inglés (circulating tumor cells)
CTM	microémbolos tumorales circulantes, acrónimo derivado de su nombre en inglés (circulating tumor microemboli)
DTCs	células tumorales diseminadas, acrónimo derivado de su nombre en inglés (disseminated tumor cells)
ECO	Observatorio Europeo del Cáncer, acrónimo derivado de su nombre en inglés (European Cancer Observatory)
MRD	enfermedad mínima residual, acrónimo derivado de su nombre en inglés (minimal residual disease)
EMT	transición epitelio-mesénquima, acrónimo derivado de su nombre en inglés (epithelial mesenchymal transition)
EpCAM	molécula de adhesión de células epiteliales, acrónimo derivado de su nombre en inglés (epithelial cell adhesion molecule)
EPISPOT	sistema de detección de proteínas tumorales, acrónimo derivado de su nombre en inglés (epithelial immunospot)
ER	receptor de estrógenos, acrónimo derivado de su nombre en inglés (estrogen receptor)
<i>ERBB2 (HER-2/neu)</i>	gen del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano.
FAP	poliposis adenomatosa familiar, acrónimo derivado de su nombre en inglés (familial adenomatous polyposis)
FAST	tecnología de escaneo láser fibro-óptico de matriz, acrónimo derivado de su nombre en inglés (fiber-optic array scanning technology)
FC	citometría de flujo, acrónimo derivado de su nombre en inglés (flow cytometry)
FCS	suero fetal bovino, acrónimo derivado de su nombre en inglés (foetal calf serum)

Abreviaturas

Utilidad pronóstica de la detección de células tumorales circulantes (CTCs) en pacientes con tumores sólidos.

FDA	Administración de Drogas y Alimentos, acrónimo derivado de su nombre en inglés (Food and Drug Administration)
FICTION	técnica de inmunofenotipación y análisis citogenético en interfase fluorescente como herramienta para la investigación de neoplasias, acrónimo derivado de su nombre en inglés (Fluorescence immunophenotyping and Interphase Cytogenetics as a Tool for Investigation of Neoplasms)
FISH	hibridación <i>in situ</i> fluorescente, acrónimo derivado de su nombre en inglés (fluorescence <i>in situ</i> hybridization)
FITC	isotiocianato de fluoresceína, acrónimo derivado de su nombre en inglés (fluorescein isothiocyanate)
GC	células granulocíticas, acrónimo derivado de su nombre en inglés (granulocytic cells)
HER2	receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano. Acrónimo derivado de su nombre en inglés (human epidermal growth factor receptor 2)
HER2+/CTCs	células tumorales circulantes que expresan HER2, acrónimo derivado de su nombre en inglés (HER2 positive/circulating tumor cells)
HNPCC	cáncer de colon hereditario no polipósico, acrónimo derivado de su nombre en inglés (hereditary non-polyposis colorectal cancer)
ICC	técnica de inmunocitoquímica, acrónimo derivado de su nombre en inglés (immunocytochemistry)
IF	técnica de inmunofluorescencia
IgG	inmunoglobulina G
IHC	técnica de inmunohistoquímica, acrónimo derivado de su nombre en inglés (immunohistochemistry)
IN	número de identificación, acrónimo derivado de su nombre en inglés (identification number)

Abreviaturas

Utilidad pronóstica de la detección de CTCs en pacientes con tumores sólido de origen epitelial.

ITCs	células tumorales aisladas, acrónimo derivado de su nombre en inglés (isolated tumor cells)
KDa	kilo dalton
M0	pacientes que no presentan metástasis a distancia
M1	pacientes que presentan metástasis a distancia
mAbs	anticuerpos monoclonales, acrónimo derivado de su nombre en inglés (monoclonal antibodies)
MACS	sistema de enriquecimiento inmunomagnético por clasificación celular, acrónimo derivado de su nombre en inglés (magnetic-activated cell sorting)
MET	transición mesénquima-epitelio, acrónimo derivado de su nombre en inglés (mesenchymal epithelial transition)
mg	miligramo
min	minuto
MIS	inestabilidad de microsatélites, acrónimo derivado de su nombre en inglés (microsatellite instability)
ml	mililitro
MNC	células mononucleares, acrónimo derivado de su nombre en inglés (mononuclear cells)
N0	nódulos negativos para la detección de células tumorales
N1	nódulos positivos para la detección de células tumorales
NIH	Institutos Nacionales de la Salud, acrónimo derivado de su nombre en inglés (National Institutes of Health)
nm	nanómetro
OMS	Organización Mundial de la Salud
OS	supervivencia global, acrónimo derivado de su nombre en inglés (overall survival)

Abreviaturas

Utilidad pronóstica de la detección de células tumorales circulantes (CTCs) en pacientes con tumores sólidos.

OSNA	amplificación de ácidos nucleicos en un solo paso, acrónimo derivado de su nombre en inglés (one-step nucleic acid amplification)
PB	sangre periférica, acrónimo derivado de su nombre en inglés (peripheral blood)
PBS	tampón fosfato-salino, acrónimo derivado de su nombre en inglés (phosphate buffered saline)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa, acrónimo derivado de su nombre en inglés (polymerase chain reaction)
PCs	células progenitoras, acrónimo derivado de su nombre en inglés (progenitor cells)
PFS	supervivencia libre de progresión de la enfermedad o tiempo libre de enfermedad, acrónimo derivado de su nombre en inglés (progression free survival)
PgR	receptor de progesterona, acrónimo derivado de su nombre en inglés (progesterone receptor)
qRT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real, acrónimo derivado de su nombre en inglés (quantitative real time-polymerase chain reaction)
RT-PCR	retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa, acrónimo derivado de su nombre en inglés (reverse transcription-PCR)
SCs	células madre, acrónimo derivado de su nombre en inglés (stem cells)
SD	desviación media, acrónimo derivado de su nombre en inglés (standard deviation)
SLN	ganglio linfático centinela, acrónimo derivado de su nombre en inglés (sentinel lymph node)
SSC	tampón citrato sódico salino, acrónimo derivado de su nombre en inglés (saline-sodium citrate)
TCs	células tumorales, acrónimo derivado de su nombre en inglés (tumor cells)

Abreviaturas

Utilidad pronóstica de la detección de CTCs en pacientes con tumores sólido de origen epitelial.

TNM	sistema de clasificación tumoral por tamaño del tumor- afectación de nódulos linfáticos-metástasis a distancia
TOP2A	gen de la topoisomerasa II alfa humana
TOPO II α	proteína topoisomerasa II alfa humana

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
I. CÁNCER DE MAMA Y COLON	3
1. Epidemiología del cáncer.....	3
2. Detección, estadificación y clasificación del cáncer de mama y colon... 4	
1.2.1. Detección del cáncer de mama y del cáncer colorrectal..... 4	
1.2.2. Estadificación y clasificación tumoral..... 4	
3. Cáncer de mama..... 5	
1.3.1.1. Cáncer de mama no invasivo (in situ)..... 8	
1.3.1.1.1. Carcinoma ductal in situ.....8	
1.3.1.1.2. Carcinoma lobular in situ9	
1.3.1.2. Carcinoma invasor 9	
1.3.2. Marcadores tumorales de cáncer de mama10	
1.3.3. Tratamiento y progresión del cáncer de mama.....11	
1.3.3.1. Cirugía11	
1.3.3.2. Tratamientos adyuvantes 12	
1.3.3.2.1. Radioterapia12	
1.3.3.2.2. Hormonoterapia13	
1.3.3.2.3. Quimioterapia13	
1.3.3.3. Terapias con anticuerpos monoclonales (Terapia dirigida)14	
1.3.3.3.1. Trastuzumab.....14	
1.3.3.3.2. Otros tratamientos dirigidos14	

4. Cáncer colorrectal.....	15
1.4.1.1. <i>Cáncer de colon no invasivo (in situ)</i>	17
1.4.1.2. <i>Carcinoma invasor</i>	17
1.4.2. <i>Marcadores tumorales de cáncer colorrectal</i>	18
1.4.3. <i>Tratamiento y progresión del cáncer colorrectal</i>	18
1.4.3.1. <i>Cirugía</i>	19
1.4.3.2. <i>Tratamientos adyuvantes</i>	19
1.4.3.2.1. <i>Radioterapia</i>	20
1.4.3.2.2. <i>Quimioterapia</i>	20
1.4.3.3. <i>Terapias con anticuerpos monoclonales (Terapia dirigida)</i>	21
1.4.3.3.1. <i>Bevacizumab</i>	21
1.4.3.3.2. <i>Cetuximab</i>	21

II. CARCINOGENESIS. MODELOS DE PROGRESIÓN TUMORAL Y FORMACIÓN DE METÁSTASIS.....22

1. Carcinogénesis.....	22
2.1.1. <i>Modificaciones del citoesqueleto celular por la EMT</i>	26
2.1.1.1. <i>Cómo afecta la EMT al citoesqueleto celular</i>	28
2. Modelos de progresión tumoral y formación de metástasis.	30
2.2.1. <i>Modelo o hipótesis de la célula madre cancerosa</i>	30
2.2.2. <i>Modelo mecanicista</i>	32
2.2.3. <i>Modelo de la “semilla y la tierra”</i>	33
2.2.4. <i>Modelo de fusión celular</i>	33
2.2.5. <i>Modelo de selección y expansión clonal del cáncer</i>	34
2.2.6. <i>Modelo de heterogeneidad dinámica</i>	35
2.2.7. <i>Modelo de la dominancia clonal</i>	36
2.2.8. <i>Modelo de evolución paralela del cáncer</i>	36
2.2.9. <i>Teoría de especiación metastásica de poblaciones tumorales</i>	37

III. CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES.....	38
1. Definición de términos.....	38
2. Introducción.....	40
3. Técnicas de enriquecimiento, aislamiento y detección de CTCs y DTCs41	
3.3.1. Técnicas de enriquecimiento y aislamiento de CTCs y DTCs	42
3.3.1.1. Sistemas basados en las características físicas de las células tumorales	42
3.3.1.1.1. Centrifugaciones en gradientes de densidad.....	42
3.3.1.1.2. Sistemas de captura celular por filtros o membranas porosas	45
3.3.1.2. Sistemas basados en las características biológicas de las células tumorales	46
3.3.1.2.1. Captura por ensayos de invasividad.....	46
3.3.1.2.2. Sistemas de inmunorosetones: RosetteSep.....	47
3.3.1.2.3. Sistema basado en afinidad magnética con “sorting” celular	48
3.3.1.2.4. Sistemas basados en ferrofluidos.....	50
3.3.2. Técnicas de detección de CTCs y DTCs	51
3.3.2.1. Técnicas histopatológicas convencionales	51
3.3.2.2. Técnicas inmunológicas.....	52
3.3.2.2.1. Técnicas inmunohistoquímicas e inmunocitoquímicas	52
3.3.2.2.2. Técnicas de citometría de flujo.....	54
3.3.2.3. Técnicas moleculares	55
3.3.3. Otras técnicas de aislamiento y detección	61
3.3.3.1. Inmunospot epitelial	61
3.3.3.2. Sistema FAST.....	62
3.3.3.3. Microchips	62
3.3.3.3.1. Microchip de aislamiento de células tumorales	62
3.3.3.3.2. Microchip ultrasónico de captura de CTC	64

3.3.3.4. Nanopartículas	65
3.3.3.5. Sistema de filtración y eliminación de CTCs	66
4. Tipos de muestra.....	67
3.4.1. Nódulos linfáticos.....	67
3.4.2. Médula ósea.....	70
3.4.3. Sangre	72
3.4.4. Otros tipos de muestra	76
5. Características biológicas de las CTCs y las DTCs.....	77
3.5.1. Características morfológicas.....	77
3.5.2. Características fenotípicas.....	78
3.5.3. Características genéticas.....	89
3.5.4. Otras características.....	92
3.5.4.1. Potencial proliferativo	92
6. Relevancia clínica de la detección de DTCs y CTCs	95
3.6.1. Diseminación linfática.....	95
3.6.2. Diseminación hematológica.....	96
3.6.2.1. Detección de DTCs en médula ósea	96
3.6.2.1. Detección de CTCs en sangre periférica.....	99
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	105
OBJETIVOS.....	109

TRABAJO EXPERIMENTAL Y RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS.....	113
CAPÍTULO 1	115
<i>Desarrollo de una técnica de aislamiento y cuantificación de células tumorales circulantes (CTCs) en sangre periférica</i>	
<i>Detección de CTCs en sangre periférica de pacientes diagnosticadas con cáncer de mama</i>	
<i>Análisis del valor pronóstico de este nuevo marcador</i>	
CAPÍTULO 2	125
<i>Desarrollo de una nueva metodología que permite de forma individual realizar el análisis simultáneo del fenotipo y genotipo de las células tumorales circulantes</i>	
CAPÍTULO 3	137
<i>Detección de células tumorales circulantes (CTCs) en sangre periférica de pacientes con cáncer de colon no metastásico</i>	
<i>Análisis del valor pronóstico de este nuevo marcador</i>	
<i>Verificación de la utilidad de la nueva metodología desarrollada y posibilidad de evaluar otros marcadores tumorales en las CTCs aisladas</i>	
CAPÍTULO 4 RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS.....	153
<i>Resultados del trabajo experimental del capítulo 1</i>	<i>155</i>
<i>1.1. Mejora del rendimiento del enriquecimiento de células tumorales circulantes empleando una centrifugación en doble gradiente de densidad</i>	<i>155</i>
<i>1.2. Eficacia y especificidad del método</i>	<i>157</i>
<i>1.3. Correlación de células CK+ en sangre periférica con las características clinicopatológicas.....</i>	<i>158</i>
<i>1.4. Análisis pronóstico</i>	<i>161</i>

Resultados del trabajo experimental del capítulo 2.....	163
2.1. Eficiencia del método de inmunoselección de células tumorales (TCs).....	163
2.2. Análisis FICTION ("Fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics as a tool for investigation of neoplasm") de las TC seleccionadas.....	164
Resultados del trabajo experimental del capítulo 3.....	168
3.1. Detección de células tumorales circulantes con expresión de citoqueratinas (CK+/CTCs) en pacientes con cáncer de colon.....	168
3.2. Caracterización de las líneas celulares tumorales por FICTION y expresión de HER2.....	170
3.3. Análisis FICTION en las CK+/CTCs inmunoseleccionadas	174
3.4. Expresión de la proteína HER2 en las CTCs	178
3.5. Inmunohistoquímica e hibridación fluorescente in situ (FISH) del tumor primario del paciente IN28	178
DISCUSIÓN GENERAL.....	181
I. CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO.....	183
1. Recogida de datos	183
2. Población de pacientes y tiempo de seguimiento	183
1.2.1. Tipo de población	183
1.2.2. Tamaño de la población de estudio y tiempo de seguimiento	190
3. Características de las técnicas empleadas	192
1.3.1. Anticuerpos utilizados	192
1.3.1.1. Anticuerpo de aislamiento de CTCs.....	192
1.3.1.2. Anticuerpo de detección de CTCs.....	195

1.3.2. Técnica de aislamiento: doble gradiente de densidad y enriquecimiento inmunomagnético.....	197
1.3.3. Técnicas de detección de CTCs.....	203
4. Conservación de las muestras	213

II. UTILIDAD CLÍNICA DE LA DETECCIÓN DE CTCs EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA..... 216

1. Trabajos existentes sobre el tema.....	216
2. Relación de la presencia de CTCs en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama con los factores pronósticos clásicos	218
3. Impacto pronóstico de la presencia de CTCs en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama	222

III. UTILIDAD CLÍNICA DE LA DETECCIÓN DE CTCs EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON CÁNCER DE COLON..... 225

1. Trabajos existentes sobre el tema.....	225
2. Relación de la presencia de CTCs en sangre periférica de pacientes con cáncer de colon con los factores pronósticos clásicos.....	227
3. Impacto pronóstico de la presencia de CTCs en sangre periférica de pacientes con cáncer de colon	228

IV. VENTAJAS DE LA TÉCNICA FICTION Y UTILIDAD CLÍNICA DE LA CARACTERIZACIÓN, GENÉTICA Y FENOTÍPICA, DE LAS CTCs EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON TUMORES SÓLIDOS EPITELIALES 229

1. Ventajas de la técnica FICTION.....	229
2. Utilidad clínica en cáncer de mama.....	230
3. Utilidad clínica en cáncer de colon.....	233

CONCLUSIONES	239
---------------------------	------------

BIBLIOGRAFÍA.....	243
--------------------------	------------

ANEXOS	305
---------------------	------------

ANEXO 1: CLASIFICACIÓN DE LAS REVISTAS EN LAS QUE SE HAN PUBLICADO LOS RESULTADOS DEL TRABAJO EXPERIMENTAL DE LA TESIS, OBTENIDO DEL JCR SCIENCE EDITION	307
---	------------

ANEXO 2: APORTACIÓN EXTRAORDINARIA RELEVANTE, PONENCIA EN CONGRESO INTERNACIONAL	315
---	------------

ANEXO 3: APORTACIONES, REFERENTES AL TEMA DE LA TESIS, PRESENTADAS EN CONGRESOS INTERNACIONALES QUE CONLLEVAN PUBLICACIÓN EN REVISTAS DE ALTO IMPACTO	323
--	------------

ANEXO 4: APORTACIÓN DE TRABAJOS PUBLICADOS NO REFERENTES AL TRABAJO DE LA TESIS	329
--	------------

INTRODUCCIÓN

I. CÁNCER DE MAMA Y COLON

1. Epidemiología del cáncer

Las estimaciones mundiales de incidencia y mortalidad para el cáncer en 2008, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), fueron unos 12,7 millones de nuevos casos diagnosticados y 7,6 millones de defunciones. El tipo de cáncer más diagnosticado en el mundo fue el de pulmón (1,61 millones; 12,7% de los casos de cáncer); seguido por el de mama (1,38 millones; 10,9%); y el colorrectal (1,23 millones; 9,7%). La causa de muerte más común fue por cáncer de pulmón (1,4 millones; 18,2%); seguida por cáncer de estómago (738.000 muertes; 9,7%); y cáncer de hígado (696.000 muertes; 9,2%) [Jemal y cols., 2001].

Al estudiar la incidencia y mortalidad por cáncer en España durante el año 2008, según el Observatorio Europeo del Cáncer (ECO), los tumores más frecuentes diagnosticados en hombres fueron: cáncer de próstata (25.561 casos; 22,7% de los casos de cáncer); cáncer de pulmón (20.347; 18,1%); y cáncer colorrectal (16.896; 15,0%), que suponen aproximadamente el 55,8% del total de los casos de cáncer en la población masculina. Los tumores con mayor número de defunciones en esta población fueron: cáncer de pulmón (17.841 casos; 30,2% de las defunciones por cáncer); cáncer colorrectal (8.427; 14,3%); y cáncer de próstata (6.150; 10,4%). En la población de mujeres, los tumores con mayor incidencia fueron: cáncer de mama (22.240 casos; más del 30%); seguido por el cáncer colorrectal (12.005 casos; 16,8%); y cáncer de pulmón (3.159; 4,4%), y los tumores de mayor mortalidad fueron: cáncer de mama y cáncer colorrectal con valores muy similares (6.076 y 6.067, respectivamente; 18,5%); y cáncer de pulmón (2.753; 8,4%) [ECO].

2. Detección, estadificación y clasificación del cáncer de mama y colon

1.2.1. Detección del cáncer de mama y del cáncer colorrectal

La Sociedad Americana del Cáncer (American Cancer Society) recomienda seguir las guías de detección de cáncer de mama y colorrectal para conseguir así una detección temprana de estos tumores. Gracias a estos programas se ha reducido la mortalidad en ambos tipos de tumores [Andersson y cols., 1988; Day y Warren, 2000; Levin y cols., 2008; Hewitson y cols., 2007; Austoker y Hewitson, 2008].

1.2.2. Estadificación y clasificación tumoral

Tras la detección del tumor primario se realizan varias pruebas: biopsias; marcadores tumorales en tejido y serológicos; rayos-X; tomografía y tomografía de emisión de positrones (PET); y ultrasonidos, para poder dar un estado clínico al tumor según el sistema TNM (tamaño del tumor-afectación de nódulos linfáticos-metástasis a distancia) del Comité Conjunto Americano del Cáncer (AJCC). Esta estadificación clínica puede variar tras el análisis patológico del tumor (estadificación patológica TNM), y según éste se clasifican a los pacientes en estadios tumorales.

3. Cáncer de mama

Según los datos epidemiológicos, el cáncer de mama es la segunda enfermedad tumoral en términos de incidencia que afecta a la población mundial. Se puede decir que es una enfermedad que solo afecta a las mujeres, ya que los casos en hombres son raros y representan el 1% de todos los casos diagnosticados de cáncer de mama, con una mortalidad similar a la población de mujeres [Jemal y cols., 2011]. Debido a su alta incidencia, y su buena prognosis, el cáncer de mama es la enfermedad tumoral con mayor prevalencia a nivel mundial.

El cáncer de mama tiene un origen genético, que puede deberse a mutaciones en células germinales (hereditario) o a mutaciones en células somáticas (esporádico) (Figura 1):

1. El cáncer de mama hereditario causa aproximadamente del 5% al 10% de todos los casos diagnosticados. Fue descrito como un enfermedad hereditaria autosómica dominante, asociada a la presencia de mutaciones germinales en los genes de susceptibilidad [Newman y cols., 1988; Claus y cols., 1991] *BRCA1* y *BRCA2* (síndrome del cáncer de mama-ovario hereditario) [Ford y cols., 1998]. Estudios realizados en familias y gemelos [Claus y cols., 1991; Lichtenstein y cols. 2000; Antoniou y cols., 2003], indican que existe un riesgo aumentado, de un aproximadamente un 27% [Lichtenstein y cols. 2000], de padecer un tumor de mama debido a factores hereditarios.

Según el estudio de Balmain y cols. (2003) el cáncer de mama es un desorden poligenético, donde la predisposición hereditaria de desarrollar este tipo de tumor puede ser debida a los efectos

derivados de la combinación de variantes genéticas en varios locus diferentes (posiblemente múltiples locus). Según este trabajo, sólo el 15% o el 20% de los casos de cáncer de mama familiares ocurren en familias con una alta predisposición a presentar una mutación en *BRCA*; por lo que el riesgo familiar restante a desarrollar el tumor invasivo (80%-85%) podría tener un origen genético o ambiental, aunque existe una predominancia de los factores genéticos [Antoniou y cols., 2001; Antoniou y cols., 2002; Balmain y cols., 2003].

El cáncer de mama hereditario presenta una heterogeneidad molecular, igual a la del cáncer de mama esporádico, donde las mutaciones en *BCRA1/2* están correlacionadas, sobre todo, con el fenotipo del subtipo basal; y el debido a genes desconocidos (no asociado a *BRCA*), con el fenotipo del subtipo luminal A y *ERBB2* [Melchor y Benítez, 2008].

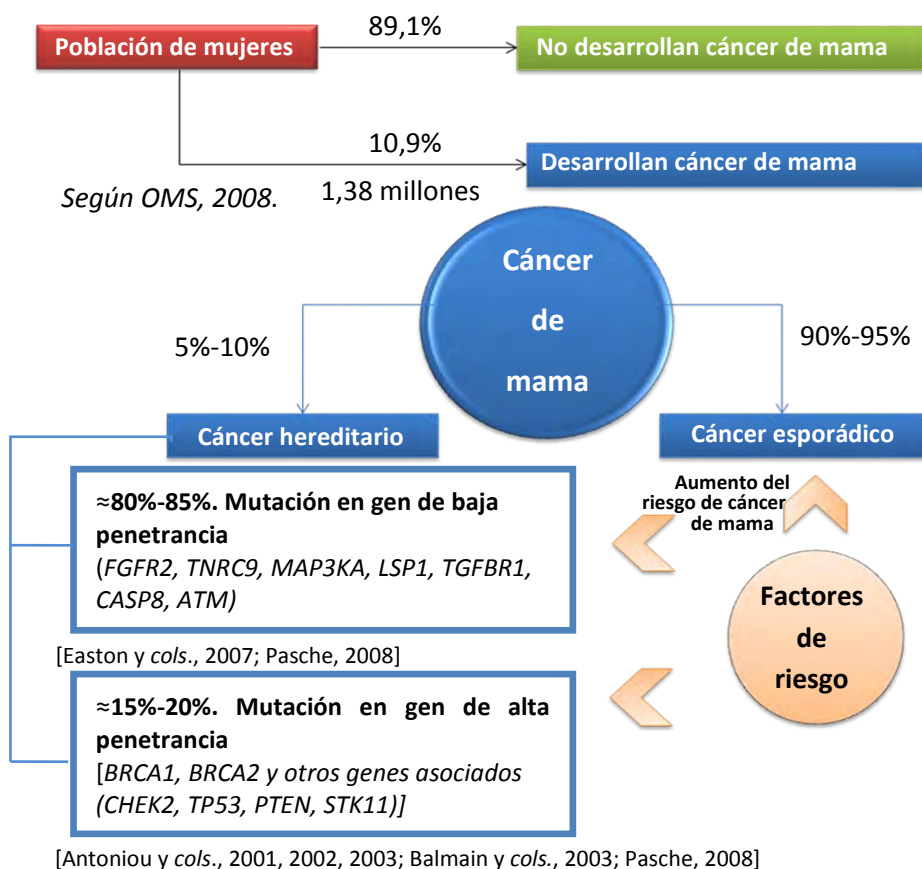
2. El cáncer de mama esporádico supone, aproximadamente, del 90% al 95% de los casos de cáncer de mama diagnosticados. Se divide en diferentes subtipos moleculares, lo más comunes son: subtipo basal, subtipo *ERBB2*, subtipo luminal A y subtipo luminal B [Melchor y Benítez, 2008].

- El subtipo basal (15,6%-23,6%) es el menos diferenciado de todos y se caracteriza por la ausencia de la expresión de: *ERBB2*; ER (Receptor de estrógenos); y PgR (Receptor de progesterona), y presenta una alta expresión de genes típicos de células basales.
- El subtipo *ERBB2* (9,2%-20,8%) presenta sobreexpresión del gen *ERBB2* y genes localizados en el amplicón 17q11, es negativo para la expresión de: ER; PgR; y marcadores basales.

- Los subtipos luminales (luminal A: 36,0%-46,2%; luminal B: 9,8%-16,5%) son positivos para marcadores luminales y ER (algunos tumores luminales B son ER-), y presentan expresión de ciertas proteínas, como TOPO II α .

En el cáncer esporádico, las alteraciones somáticas del tejido mamario pueden estar causadas por diversos factores (factores de riesgo), que al igual que en el caso del cáncer de mama hereditario pueden potenciarse entre sí. En los últimos años, diferentes estudios señalan que la heterogeneidad que encontramos en el cáncer de mama esporádico se debe a los diferentes tipos de eventos carcinogénicos que ocurren, y a la célula en la que ocurren [Melchor y Benítez, 2008].

Figura 1. Cáncer de mama esporádico y hereditario.



Algunos de los factores de riesgo que influyen para desarrollar un cáncer de mama son: edad del individuo, antecedentes familiares, edad de aparición de la menarquía, edad de aparición de la menopausia, edad en la que se tuvo el primer hijo, obesidad, nuliparidad, estilo de vida (consumición de tabaco y alcohol) [Rockhill, 2001] y estado nutricional [Sieri y cols., 2004; Fung y cols., 2005].

1.3.1.1. Cáncer de mama no invasivo (in situ)

El carcinoma *in situ* de mama se define como una proliferación de células epiteliales malignas, sin evidencia de invasión a través de la membrana basal. Es considerado una lesión preneoplásica y su incidencia se ha incrementado debido a las campañas de cribado mamográfico que se realizan [Malmgren y cols., 2008]. Dependiendo del lugar de proliferación de las células epiteliales, anatomopatológicamente, los carcinomas *in situ* se clasifican como ductales o lobulares. Sin embargo, algunas lesiones *in situ* poseen características histológicas indeterminadas y no bien clasificadas [Fisher y cols., 1997], a día de hoy están apareciendo nuevas clases histológicas de carcinomas *in situ* que antes se consideraban dentro de estos dos tipos clásicos [O'Malley, 2010].

1.3.1.1.1. Carcinoma ductal in situ

El carcinoma ductal *in situ* (DCIS) se define como una proliferación de células epiteliales malignas, que crecen en el interior de los conductos sin evidencia de invasión a través de la membrana basal [Silverstein, 1998], y es considerado una lesión precursora del carcinoma invasivo o infiltrante. En el DCIS existe una prevalencia de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* [Claus y cols., 2005] y otras características como la expresión del fenotipo angiogénico [Wülfing y cols., 2005].

1.3.1.1.2. Carcinoma lobular *in situ*

El carcinoma lobular *in situ* (LCIS) se define como una población de células monomorfas con poca cohesividad que expanden el lóbulo o el conducto lobular terminal, apareciendo en múltiples focos. La imagen final que aparece es a menudo la de un conducto terminal rodeado de un gran número de células aisladas, de tamaño uniforme pero con distinta forma [Foote y Stewart, 1941]. El LCIS es una lesión precursora del carcinoma invasivo [Simpson y cols., 2003; Gao y cols., 2010].

1.3.1.2. Carcinoma invasor [Kumar y cols., 2008]

En todas las formas de cáncer de mama invasor (infiltrante) se produce la penetración de la membrana basal limitante, y la progresión de la enfermedad produce ciertas características morfológicas locales, como una tendencia a adherirse a los músculos pectorales o la fascia profunda de la pared torácica, con la consiguiente fijación de la lesión, así como adherencia a la piel que lo recubre, con retracción o formación de hoyuelos en la piel o en el pezón. La interacción entre las células tumorales y el estroma es fundamental para permitir el paso de carcinoma *in situ* a carcinoma invasivo.

Entre los diferentes tipos de carcinoma de mama invasor encontramos:

- Carcinoma ductal invasivo: del 70% al 80%;
- Carcinoma lobulillar invasor: aproximadamente el 20%;
- Carcinoma inflamatorio: del 1% al 5%;
- Carcinomas raros: carcinoma medular (1%); carcinoma tubular (10% de los carcinomas invasores menores de 1 cm); carcinoma coloide.

1.3.2. Marcadores tumorales de cáncer de mama

Un marcador tumoral es una molécula; sustancia; o proceso, que está alterado cuantitativa o cualitativamente, en una condición precancerosa o cancerosa, detectable por una prueba. Esta alteración puede ser producida por el mismo tumor o por el tejido normal circundante, como respuesta a la lesión tumoral [Hayes y cols., 1996].

La guía de clínica práctica para uso de marcadores tumorales en la prevención, screening, tratamiento y supervivencia en cáncer de mama, publicada por la Asociación Americana de Oncología Clínica (ASCO) en 2007 [Harris y cols., 2007], recoge trece categorías de marcadores tumorales, de los cuales seis son nuevos.

Marcadores aceptados en la guía del 2007:

- ERs y PgRs;
- CA 15-3, CA 27.29 y CEA (antígeno carcinoembrionario);
- HER2.

Marcadores aceptados que aparecen como nuevo tópico en la guía del 2007:

- uPA (activador del plasminógeno tipo uroquinasa) y PAI-1 (inhibidor tipo 1 del activador del plasminógeno);
- Análisis multiparamétrico de la expresión génica (ensayo de Oncotype DX).

Otros marcadores que aparecen como nuevo tópico, pero de los cuales no existe todavía evidencia suficiente como para recomendarlos:

- Marcadores de proliferación evaluados por inmunohistoquímica;
- Fragmentos de la Ciclina E;
- Análisis proteómicos;

- Detección de micrometástasis en medula ósea;
- Detección de células tumorales circulantes (CTCs) en sangre periférica.

1.3.3. Tratamiento y progresión del cáncer de mama

Se considera que existe progresión de la enfermedad cuando tras aplicar un tratamiento el tumor aumenta de tamaño o aparece metástasis.

El tratamiento más común en cáncer de mama es la cirugía, seguido por tratamientos adyuvantes.

1.3.3.1. Cirugía

La cirugía del tumor consiste en la eliminación de éste y de los órganos afectados por el mismo, y puede ser conservativa o por mastectomía. El que se emplee una u otra depende del cirujano, ya que no presentan efecto sobre la supervivencia [Veronesi y cols., 2002].

Durante la intervención quirúrgica se suele realizar la biopsia del ganglio linfático centinela (SLN) o de varios ganglios axilares. Estos tejidos son evaluados por los patólogos y se clasifica el tumor definitivamente según: TNM patológico; estado de ER y PgRs; y estado del HER2. Si tras la biopsia del SLN o de los ganglios axilares se detectan células tumorales en estos, se realiza una cirugía posterior de eliminación de estos tejidos. En el año 2000 surge un método de detección de células tumorales en SLN que se realiza intraoperatoriamente, y se basa en la amplificación de ácidos nucleicos en un solo paso (OSNA) [Notomi y cols., 2000; Nagamine y cols., 2001]. Este ensayo permite la toma de decisión clínica,

sobre la actuación quirúrgica a seguir, durante la operación [Tsujiyoto y cols., 2007; Visser y cols., 2008; Schem y cols., 2009].

1.3.3.2. Tratamientos adyuvantes [NIH Consensus Statement, 2000; FDA]

Según las características del tumor primario (TNM, estado de receptores hormonales y del HER2) y del paciente (edad e historia clínica) los oncólogos decidirán el tratamiento adyuvante más adecuado, para lo cual se pueden ayudar de la evaluación de otros marcadores tumorales [Harris y cols., 2007].

Un adyuvante es una sustancia que contribuye a la acción de otra. Un tratamiento es adyuvante cuando acompaña a un tratamiento previo, considerado principal (cirugía). Si el tratamiento no principal va antes que el principal, se denomina neoadyuvante. En cáncer de mama se emplean tratamientos adyuvantes sistémicos, que incluyen quimioterapia y terapia hormonal; y un tratamiento adyuvante local, que es la radioterapia.

1.3.3.2.1. Radioterapia

La radioterapia es la utilización de energía radiante para eliminar las células tumorales. La aplicación de esta suele realizarse tras la cirugía, aunque también se puede emplear de forma neoadyuvante para disminuir el tamaño del tumor y que éste se pueda extirpar quirúrgicamente. La radioterapia puede aplicarse externamente [haz externo (rayos X), haz de neutrones o haz de protones], o como terapia interna, braquiterapia, implantando un material radiactivo en el tejido. Existen evidencias clínicas del beneficio de aplicar radioterapia tras la cirugía [Vinh-Hung y Verschraegen, 2004; Early Breast Cancer Trialists’

Collaborative Group, 2011; Veronesi y cols., 2001]. Un rasgo beneficioso de la radioterapia es el efecto de promoción que tiene sobre el sistema inmune, aumentando la infiltración de células inmunitarias y la activación de éstas [Shiao y Coussens, 2010].

1.3.3.2.2. Hormonoterapia

La hormonoterapia es una terapia dirigida y su aplicación dependerá de la expresión de ER y PgR en el tumor. La privación de estrógenos por parte del tumor se consigue aplicando: bloqueantes de los receptores (Tamoxifeno); supresores de la síntesis de estrógenos (Anastrozele); o eliminación de los ovarios (mujeres premenopáusicas).

1.3.3.2.3. Quimioterapia

Los tratamientos de quimioterapia son más complejos y complicados, siempre seguidos de evaluaciones de respuesta al tratamiento y progresión de la enfermedad. La aplicación de estas terapias ha demostrado una mejora de la supervivencia a largo plazo y una disminución de la aparición de recurrencia de la enfermedad.

Los regímenes más comunes son:

1. Aquellos que incluyen antraciclinas (doxorubicina y epirubicina), como: AC (doxorubicina y ciclofosfamida); CAF (ciclofosfamida, doxorubicina y 5-fluorouracilo); y CET (ciclofosfamida, epirubicina y 5-fluorouracilo).
2. Regímenes que incluyen taxanos (docetaxol o paclitaxol). Estos son los más empleados en casos con cáncer metastásico, y actualmente se está investigando su uso como tratamiento adyuvante en pacientes con cáncer de mama sin metástasis en nódulos linfáticos (N0).

Generalmente los tratamientos con quimioterapia son aplicados a pacientes con metástasis en nódulos linfáticos (N1) o tumores primarios mayores de 1 cm.

1.3.3.3. Terapias con anticuerpos monoclonales (Terapia dirigida) [FDA]

1.3.3.3.1. Trastuzumab

El trastuzumab (Herceptin) es un anticuerpo monoclonal anti-HER2, inhibe la proliferación celular y es un potente mediador de la citotoxicidad mediada por células, que ha demostrado reducir la recurrencia de la enfermedad y aumentar la supervivencia de los pacientes. En 1998 la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) aprobó, como primera línea de tratamiento, la administración de trastuzumab en combinación con paclitaxel en pacientes metastásicos cuyos tumores son HER2+. En 2006 la FDA aceptó que se podía expandir este tratamiento a pacientes con cáncer de mama en estadios tempranos HER2+. Otros tratamientos aprobados por la FDA anti-HER2 son: Lapatinib (también anti-HER1) y Pertuzumab. También hay tratamientos anti-HER1 (anti-EGFR) como Cetuximab, Gefitinib y Erlotinib.

1.3.3.3.2. Otros tratamientos dirigidos

Actualmente se está estudiando la posibilidad de emplear otros tratamientos dirigidos como: Inhibidores del factor de crecimiento tipo insulina; Inhibidores de la polimerasa 1 poli-ADP-ribosa; Inhibidores de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR; y terapia epigenética (Inhibidores de la metilación del DNA e Inhibidores de la deacetilación de histonas).

4. *Cáncer colorrectal*

Según los datos epidemiológicos, el cáncer colorrectal es la tercera enfermedad tumoral en incidencia que afecta a la población mundial. Es una enfermedad que afecta tanto a hombres como a mujeres, aunque existen diferencias en su incidencia y mortalidad según el género de la población, y entre países desarrollados y en vías de desarrollo [Jemal y cols., 2011].

El cáncer colorrectal puede tener un origen hereditario o ser esporádico (Figura 2):

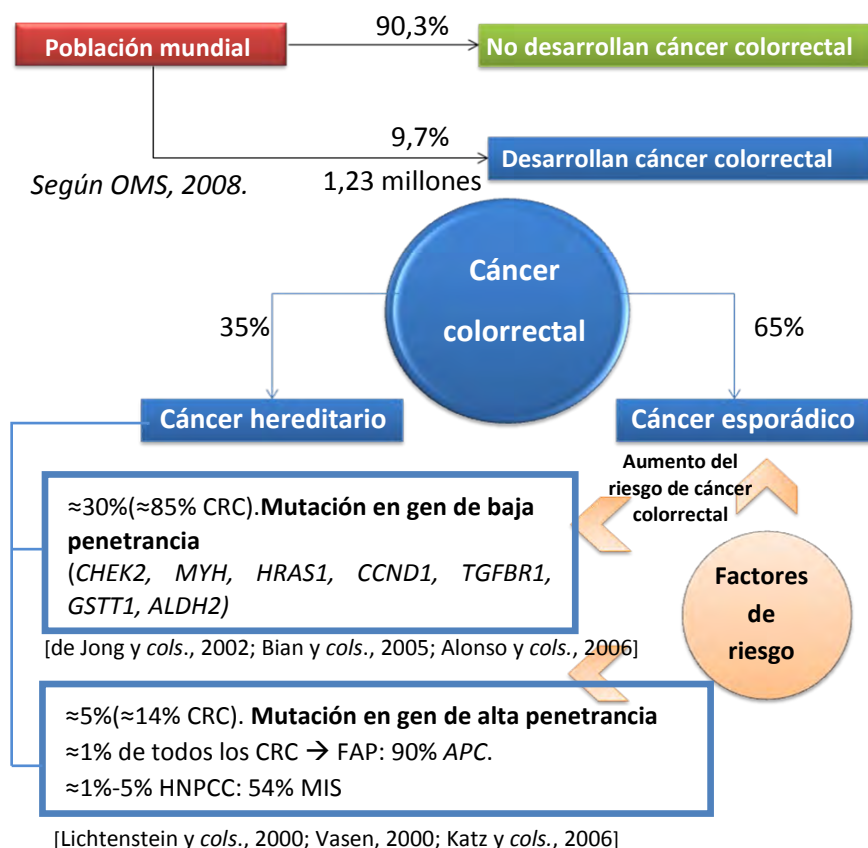
1. Los estudios realizados en familias y gemelos, permiten estimar que aproximadamente el 35% de los casos de cáncer colorrectal [Lichtenstein y cols., 2000] son una forma hereditaria de la enfermedad. Aproximadamente el 5% de estos casos hereditarios se asocia a mutaciones muy penetrantes cuyas manifestaciones clínicas están claramente caracterizadas. Los dos principales síndromes de cáncer de colon hereditario son: poliposis adenomatosa familiar (FAP), enfermedad autosómica dominante que se debe a mutaciones en el gen *APC*; y el cáncer de colon hereditario no polipósico (HNPCC), que es una predisposición autosómica dominante a desarrollar cáncer de colon debida a mutaciones en genes de reparación del DNA [Vasen, 2000; Kaz y Brentnall, 2006].

La etiología de los restantes casos de cáncer colorrectal hereditario no está definida completamente, y suelen estar causados por alteraciones en genes que son menos penetrantes,

pero más frecuentes que los síndromes bien definidos [Vasen, 2000; Kaz y Brentnall, 2006].

2. El cáncer colorrectal esporádico supone aproximadamente el 65% de los casos de cáncer colorrectal diagnosticados, y se produce por alteraciones en células somáticas, debido a diversos factores que están muy relacionados con el tipo de “vida” que lleva la persona afectada [Lichtenstein y cols., 2000].

Figura 2. Cáncer colorrectal esporádico y hereditario.



CRC = Cáncer colorrectal; FAP = Poliposis adenomatosa familiar; HNPCC = Cáncer de colon hereditario no polipósico; MIS = Inestabilidad de microsatélites.

Los factores de riesgo para el cáncer colorrectal son, entre otros: antecedentes familiares, edad, obesidad [Harriss y cols., 2009], estilo de vida (consumición de tabaco, alcohol y actividad física) [Slattery, 2004; Phipps y cols., 2011] y estado nutricional [van Duijnhoven y cols., 2009].

1.4.1.1. Cáncer de colon no invasivo (in situ) [Kumar y cols., 2008]

En la carcinogénesis colorrectal ocurre la secuencia pólipo - pólipo adenomatoso - adenoma temprano - adenoma tardío - carcinoma-metástasis. La forma precursora del adenoma tumoral es el pólipo preneoplásico. La mayoría de estos son pólipos hiperplásicos, pequeñas protuberancias de la mucosa (menores de 5 mm de diámetro), hemisféricas y lisas, que pueden aparecer de forma aislada pero es más común que sean múltiples.

El pólipo adenomatoso o adenoma varía desde tumores pequeños a lesiones grandes, que surgen como resultado de la proliferación y displasia epitelial. El riesgo de malignidad de los pólipos adenomatosos se correlaciona con la localización, arquitectura histológica e intensidad de la displasia epitelial. Los pólipos adenomatosos se clasifican en: adenoma tubular (80%), adenoma vellosos (1%); adenoma tubulovelloso (5%-10%); y adenoma serrado sésil.

1.4.1.2. Carcinoma invasor [Kumar y cols., 2008]

Aunque todos los carcinomas colorrectales empiezan como lesiones *in situ*, evolucionan de acuerdo a patrones morfológicos diferentes. En el desarrollo del cáncer se van comprometiendo las diferentes capas del colon-recto, éste se inicia en el epitelio glandular

(estadio 0) invadiendo la submucosa (estadio I) y la muscularis propia (estadio II), llegando a comprometer los linfáticos de la capa submucosa y a alcanzar los ganglios linfáticos o los capilares (estadio III). La mayoría de los carcinomas colorrectales son adenocarcinomas (98%).

1.4.2. Marcadores tumorales de cáncer colorrectal

En el 2006 se publicó una guía clínica de marcadores tumorales de cáncer gástrico que actualizaba y completaba la guía publicada en 1999 [Locker y cols., 2006].

Marcadores de cáncer colorrectal aceptados en la guía del 2006:

- CEA;
- 18q-/DCC.

Otros marcadores que aparecen como nuevo tópico, pero de los cuales no existe todavía evidencia suficiente como para recomendarlos:

- CA 19-9;
- p53 o *TP53*;
- *K-ras*;
- Inestabilidad de microsatélites por *hMSH2* o *hMLH1*;
- Ploidia del DNA o análisis de proliferación por citometría de flujo;
- Sintasa de timidina, dehidrogenasa dihidropirimidina y fosforilasa de timidina.

1.4.3. Tratamiento y progresión del cáncer colorrectal

El tratamiento más común en cáncer colorrectal es la cirugía, acompañada en algunos casos por tratamientos adyuvantes.

1.4.3.1. Cirugía

Aproximadamente el 90% de los pacientes con cáncer de colon son tratados con cirugía como primer tratamiento, con o sin tratamientos adyuvantes [Inomata y cols., 2009]. La cirugía del tumor consiste en la eliminación de éste y de los órganos afectados por el mismo, y puede realizarse de forma convencional [cirugía abierta (colostomía): colectomía, hemicolectomía derecha, hemicolectomía izquierda, colectomía transversa, sigmoidectomía], la cual conlleva una mayor convalecencia, o a través de laparoscopia. El que se emplee una u otra depende básicamente del cirujano [Clinical Outcomes of Surgical Therapy Study Group, 2004; Inomata y cols., 2009].

Generalmente, en la misma cirugía de extirpación el tumor primario y si es necesario, se realiza la extirpación de los ganglios linfáticos. Estos tejidos son evaluados por los patólogos y se clasifica el tumor definitivamente según: TNM patológico (características macroscópicas); y clasificación con base al tipo histológico (Lauren-Jarvi [Lauren, 1965]; OMS): grado de diferenciación celular y localización.

1.4.3.2. Tratamientos adyuvantes [FDA]

Según las características del tumor primario (TNM y clasificación histológica) y del paciente (edad e historia clínica) los oncólogos decidirán si se aplica un tratamiento adyuvante. Además, se pueden realizar análisis de otros marcadores tumorales para evaluar la terapia más beneficiosa para el paciente [Locker y cols., 2006].

Generalmente, los tratamientos con quimioterapia son administrados a pacientes N1 (III) o con metástasis a distancia (IV), pero

un 25% de los pacientes en estadio II sufren recurrencia. Esto hace pensar que el sistema de estadificación o las técnicas que se emplean para realizarlo no son las más adecuadas, además debido a que la presencia de metástasis en nódulos linfáticos es un predictor de la enfermedad [Cohen y cols., 1997] se ha empezado a aplicar la técnica del SLN en pacientes con cáncer de colon, para intentar identificar pacientes que podrían beneficiarse de una terapia adyuvante [Bilchik y Compton, 2007; Scabini, 2010]. A este respecto, hay que indicar que el ensayo OSNA está obteniendo buenos resultados en cáncer colorrectal [Yamamoto y cols., 2011].

1.4.3.2.1. Radioterapia

Al igual que en cáncer de mama, la radioterapia se puede emplear como radiación externa o como braquiterapia. Pero además, se puede emplear una terapia de radiación intraoperatoria.

1.4.3.2.2. Quimioterapia

Todos los pacientes en estadio III reciben un tratamiento adyuvante con quimioterapia. Actualmente existe controversia si los pacientes en estadio II podrían beneficiarse de este tratamiento, y se recomienda cuando el tumor cumple ciertos parámetros como: alto grado de diferenciación, inestabilidad de microsatélites, afectación de órganos vecinos y márgenes del tumor afectados u obstrucción del colon.

Desde 1990 la quimioterapia que se emplea es el 5-fluorouracilo con levamisole, en 2001 algunos regímenes comienzan a emplear la capecitabina de forma individual, y desde el 2004 también se emplea un régimen de oxaliplatino en combinación con 5-fluorouracilo y levamisole.

Los tratamiento quimioterápicos que se administran como primera línea a pacientes metastásicos puede ser: leucovorin (más 5-fluorouracilo); irinotecan (más 5-fluorouracilo y levamisole); capecitabina; y oxaliplatino. En casos refractarios se emplea: irinotecan; y oxaliplatino (más 5-fluorouracilo y levamisole).

1.4.3.3. Terapias con anticuerpos monoclonales (Terapia dirigida) [FDA]

1.4.3.3.1. Bevacizumab

El bevacizumab (Avastin) es un anticuerpo monoclonal anti-VEGF, que reduce la vascularización de los tumores disminuyendo su crecimiento. Aunque actualmente la FDA ha iniciado el proceso de eliminación de este tratamiento en pacientes con cáncer de mama, su uso se sigue respetando en pacientes con cáncer colorrectal. En 2004 la FDA aprobó, como primera línea de tratamiento en pacientes metastásicos, la administración de bevacizumab junto con el régimen estándar de quimioterapia IFL (irinotecan + 5-fluorouracilo + levamisole).

1.4.3.3.2. Cetuximab

El cetuximab (Erbix) es un anticuerpo monoclonal anti-EGFR que inhibe o enlentece el crecimiento del tumor. En 2004 la FDA aprobó, como tratamiento tras una respuesta refractaria en pacientes metastásicos, la administración de cetuximab individualmente o junto con irinotecan, ya que éste demostró disminuir el crecimiento del tumor sobre todo al usarlo en combinación con la quimioterapia. El cetuximab y el panitumumab, anticuerpo monoclonal anti-EGFR, no deben emplearse en pacientes con cáncer colorrectal con mutaciones en *K-ras*.

II. CARCINOGENÉISIS. MODELOS DE PROGRESIÓN TUMORAL Y FORMACIÓN DE METÁSTASIS

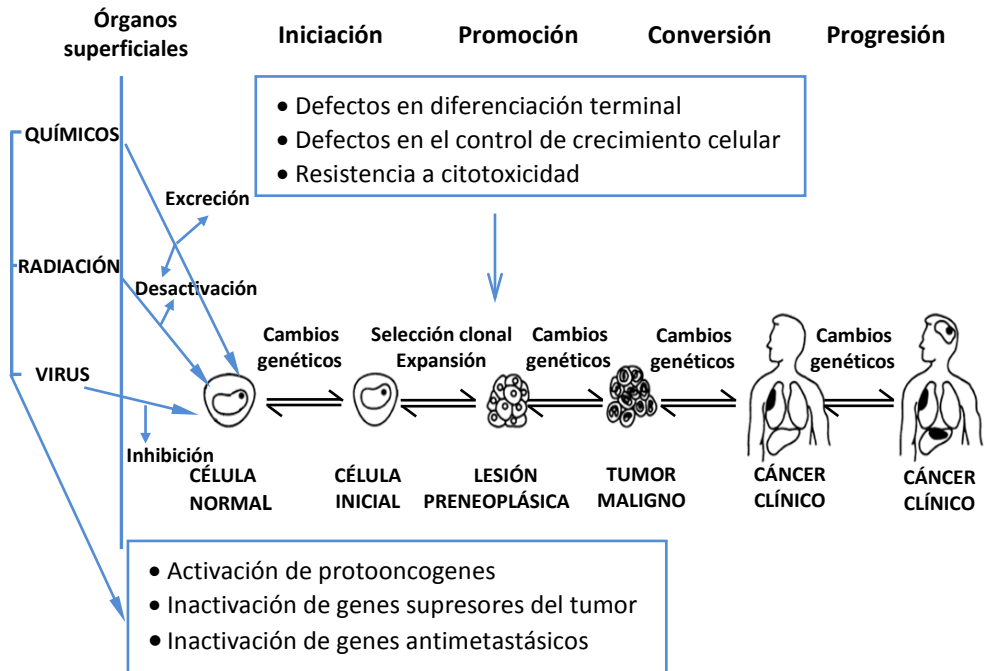
1. Carcinogénesis

La carcinogénesis es la formación del cáncer. Este es un proceso en el cuál células normales se transforman en células cancerígenas, y se caracteriza por ser una progresión de cambios celulares (genéticos, epigenéticos y fenotípicos) que reprograman a la célula para entrar en un proceso incontrolado de división.

Según Harris (1991), la *carcinogénesis* es un proceso que consta de múltiples fases producidas por daños genéticos y epigenéticos, inducidos por un carcinógeno, en células susceptibles que adquieren una ventaja de crecimiento selectivo y sufren una expansión clonal como resultado de la activación de protooncogenes y/o inactivación de genes supresores de tumores (Figura 3).

Los cambios necesarios para originar una célula cancerosa pueden ser llevados a cabo de forma diferente. Aunque todos los tumores malignos deben superar las mismas funciones regulatorias, para poder crecer y progresar, los genes involucrados y el orden en que lo hacen pueden variar.

Figura 3. Carcinogénesis: proceso de múltiples fases que envuelve cambios genéticos y epigenéticos en protooncogenes, genes supresores tumorales y genes antimetastásicos [Harris, 1991].



Cuando se producen múltiples mutaciones que afectan a múltiples genes, de forma progresiva, se generan unos atributos fenotípicos característicos del tumor que afectan a su agresividad y a su potencial maligno. Este fenómeno se denomina “*progresión tumoral*” y da lugar al fenotipo maligno del tumor, el cual viene determinado por [Hannahna y Weinberg, 2000]:

- Autosuficiencia en las señales del crecimiento;
- Insensibilidad a las señales inhibitoras de crecimiento;
- Evasión de la apoptosis;
- Potencial replicativo ilimitado;

- Desarrollo de la angiogénesis sostenida (fenotipo angiogénico);
- Capacidad para invadir y metastatizar [fenotipo metastásico, transición epitelio-mesénquima (EMT) y mesénquima-epitelio (MET)].

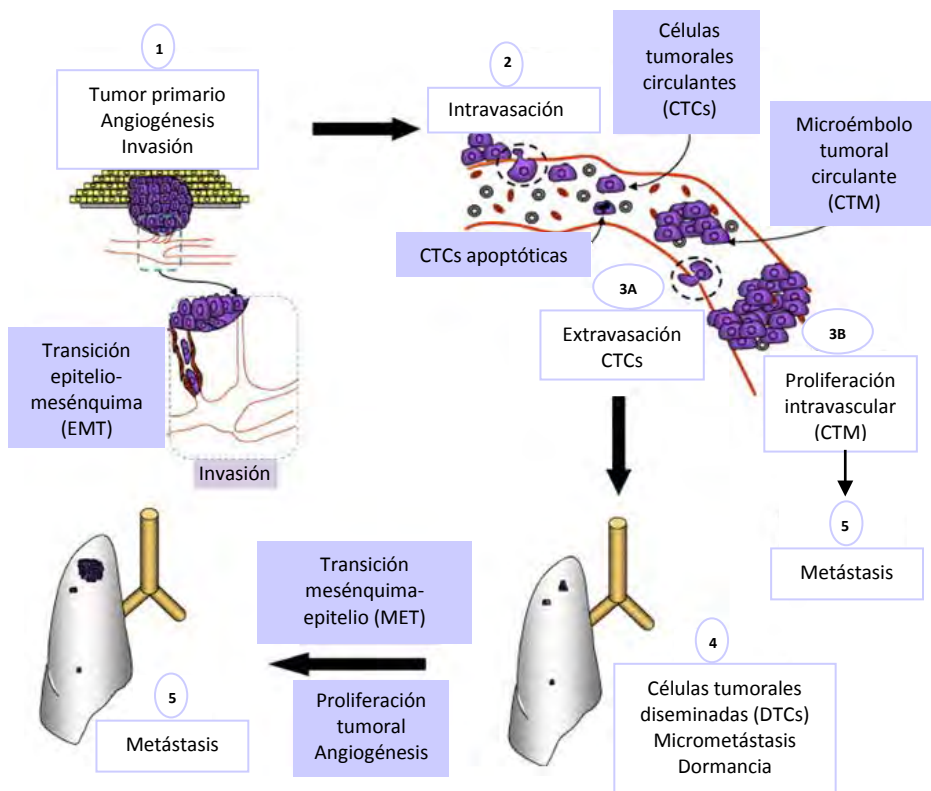
Un punto de inflexión fundamental en la carcinogénesis es la formación de metástasis. La metástasis implica una asociación activa entre diferentes moléculas en el microambiente tumoral, como proteínas asociadas al tumor: uPA; metaloproteinasas; y fibrinógeno, o complejos de señalización: Akt1/PKB; y Wnt/ β -catenina. La “cascada” metastásica conlleva: crecimiento de las células del tumor primario, escapar del tumor primario, EMT, motilidad y penetración en el estroma local, entrar en los vasos vasculares o linfáticos locales (intravasación), agregación con las plaquetas, interacción y adhesión con zonas endoteliales distante, extravasación, MET, recolonización (micrometástasis) y expansión (macrometástasis) (Figura 4). Todo esto se lleva acabo mientras las células metastásicas escapan del sistema inmune y sobreviven en estos ambientes adversos [Thompson y Newgreen, 2005; Miyazono, 2009; Gupta y Massagué, 2006; Paterlini-Brechot y Benali, 2007].

Figura 4. Pasos que llevan a la formación de metástasis. (1) El crecimiento celular supera los suministros de oxígeno y activan la angiogénesis. Se produce una regulación baja de la cadherina-E que conlleva una pérdida de la adhesión celular y una invasión de las células tumorales resistentes a la apoptosis. Las células tumorales invasivas, a través de la transición epitelio-mesénquima (EMT), pierden los antígenos epiteliales, adquieren antígenos mesenquimáticos y adquieren tendencias móviles (como los fibroblastos). (2) Tras la intravasación, entrada en los capilares sanguíneos y linfáticos, las células tumorales circulantes

Introducción

Utilidad pronóstica de la detección de CTCs en pacientes con tumores sólidos de origen epitelial.

(CTCs) entran en apoptosis o empiezan a circular como células individuales. Las CTCs se encuentran en un estado no proliferante. (3A) Las CTCs se extravasán en distintos órganos. (4) Tras la extravasación, las CTCs se denominan células tumorales diseminadas (DTCs) y pueden permanecer en un estado de dormancia o entrar en un estado de proliferación, formando micrometástasis. (5) La proliferación desenfrenada de las CTCs originan metástasis, a través de la transición mesénquima-epitelio (MET) y angiogénesis. (3B-5) Los microémbolos tumorales circulantes (CTM) representan células tumorales que migran de forma colectiva. Estos CTM poseen un alto potencial metastásico, ya que son resistentes a la apoptosis y mantienen activas sus capacidades proliferativas. Los CTM no pueden extravasarse pero pueden quedar retenidos en los capilares y proliferar, dando lugar a la ruptura de las paredes de los capilares y formando metástasis [Paterlini-Brechot y Benali, 2007].

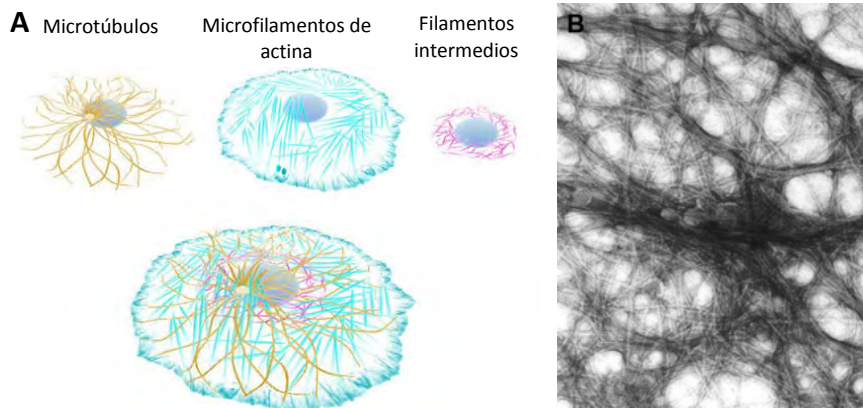


Para que las células tumorales puedan abandonar el tumor primario deben sufrir un cambio de fenotipo, desde célula epitelial (sésil) a célula mesenquimática (móvil), para esto deben atravesar la EMT. La EMT se caracteriza por ser un conjunto complejo y coordinado de cambios moleculares, que conducen a cambios en el comportamiento celular. La EMT que se produce durante el proceso metastásico se origina cuando las células tumorales epiteliales abandonan el tumor primario y migran a un nuevo órgano o tejido para formar un nuevo tumor. Para esto, inicialmente ocurre una rotura de las uniones de las células epiteliales (zonas ocludens, uniones adherentes); la deslocalización de las proteínas de estas uniones; y una reorganización del citoesqueleto celular [Zeisberg y Neilson, 2009; Miyazono, 2009]. Con la EMT las células pierden la polaridad apico-basal, presentando una morfología en forma de huso, y expresan marcadores mesenquimales. Las señales que pueden inducir a las células tumorales a atravesar la EMT derivan en parte del estroma tumoral, y son señales como HGF, EGF, PDGF, y TGF- β [Massagué, 2008], que inducen la activación de factores de transcripción como Slug, ZEB1, Twist, Goosecoid y FOXC2 [Kalluri y Weinberg, 2009].

2.1.1. Modificaciones del citoesqueleto celular por la EMT

Recuerdo del citoesqueleto celular de las células epiteliales [Kühnel, 2005]: El citoesqueleto es un entramado tridimensional dinámico de diferentes redes filamentosas que atraviesan la matriz citoplasmática. Existen tres redes bien definidas con características morfológicas diferentes: microfilamentos, filamentos intermedios (varían según el tipo celular) y microtúbulos. Cada una de estas redes está formada por proteínas específicas (Figura 5).

Figura 5. A. Estructura del citoesqueleto. B. Microfotografía electrónica de los filamentos intermedios (10 nm de diámetro) en una célula epitelial [Urban y cols., 2010].



- Microfilamentos (fibras de estrés): con un diámetro de 5 a 7 nm y compuestos por actina. Son los responsables de la forma celular (sostén estructural de las células), del movimiento de las células, y están unidos a proteínas transmembrana, cadherinas (E) e integrinas.
- Filamentos intermedios (tonofilamentos): con un diámetro de 7 a 11 nm y compuestos por citoqueratinas, cuya función es mantener la integridad celular [Sun y cols., 1979]. Las citoqueratinas son una familia de 20 polipéptidos, que se dividen en dos grupos: tipo ácido o CKs tipo I, CK9-CK20, y tipo básico o CKs tipo II, CK1-CK8 [Moll, 1991; Moll y cols., 1982]. La formación de los filamentos suele requerir dos polipéptidos de CKs diferentes [Hatzfeld y Franke, 1985]. Estas proteínas son las responsables de la rigidez celular, forman haces que se orientan en la dirección de la fuerza tensil y se extienden desde el interior hacia las placas densas de los desmosomas.
- Microtúbulos: con un diámetro externo de 21 a 24 nm e interno de 14 a 16 nm, formados por filamentos de tubulina que originan una red extendida, no contráctil y sin ramificaciones. Son los responsables de la geometría celular, el transporte intracelular de organelas e intervienen en la composición de los cinocilios, centriolos, cinetosomas y los husos mitóticos.

2.1.1.1. Cómo afecta la EMT al citoesqueleto celular

Los elementos del citoesqueleto deben ser regulados de forma coordinada para que la célula pueda cumplir con funciones como: migración; adhesión; y división. La coordinación entre los elementos del citoesqueleto se consigue a través de vías de señalización en las que participan reguladores comunes, como la familia de proteínas Rho guanosina-5'-trifosfato (GTPasas), de ésta familia las proteínas mejor caracterizadas son: Rho, Rac y Cdc42 [Hall, 2009].

Debido a la EMT aparecen cambios en el citoesqueleto que conllevan la pérdida de polaridad y de adhesión celular, además de la pérdida de expresión de proteínas como la molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM) y CKs. Todo esto resulta en un incremento de la plasticidad celular, lo que es necesario para que las células pasen a ser móviles [Thiery, 2002].

Para que se produzca la pérdida de la polaridad y la ganancia de la movilidad celular, los filamentos de actina y los microtúbulos deben variar su organización en el citoesqueleto celular. El cambio de la polaridad celular puede ocurrir de forma espontánea, a través de una retroalimentación positiva y negativa que envuelve a las proteínas Rho y Rac [Hall, 2009]. La migración celular se debe a la polimerización de los filamentos de actina en la zona anterior de la célula, lo cual genera la contracción de los filamentos de actina:miosina en la zona posterior, seguido del reclutamiento de los microtúbulos [Waterman-Storer y Salmon, 1997]. Esto conlleva la activación de Rac, que se localiza en la parte anterior, y la de Rho, que se localiza en la parte posterior de la célula. La movilidad celular, o retracción del cuerpo de la célula, requiere

de la transmisión de la fuerza que generan los movimientos de los filamentos de actina del interior celular a la matriz extracelular, esto se consigue regulando la formación de nuevos sitios de adhesión a la matriz y destruyendo las antiguas adhesiones que existían entre la célula y el sustrato [Wittmann y Waterman-Storer, 2001]. Aparece así una retroalimentación positiva entre la reorganización del citoesqueleto y destrucción-formación de uniones adherentes, donde la formación de nuevas adhesiones, más estables, y la destrucción de las antiguas estimula la reorganización del citoesqueleto celular; y la polimerización de la actina, y la reorganización del citoesqueleto celular, estimula la formación de nuevas adhesiones celulares y la destrucción de las antiguas [Parsons y cols., 2010].

Para que se produzca la migración celular, además de la polimerización de los filamentos de actina, debe ocurrir la reorientación del centrosoma hacia la zona de migración celular, a través de la reorganización de los microtúbulos por Cdc42 [Hall, 2009].

Durante la EMT ocurre una variación en la expresión de CKs, que algunas veces conlleva la pérdida o disminución de la expresión de éstas, lo que resulta en una mayor plasticidad celular [Schaller y cols., 1996]; y aparece la expresión de vimentina [Willipinski-Stapelfeldt y cols., 2005], lo que origina una mayor agresividad tumoral. Por ejemplo, en el tejido normal mamario las CKs más expresadas son las CK8, CK18 y CK19, éstas son también las CKs más expresadas en los tumores de mama [Moll y cols., 1982; Moll, 1991] y son utilizadas para identificar tanto tumores primarios como metástasis. No obstante, varios estudios han encontrado una asociación entre la pérdida de la expresión de estas CKs y la aparición de la expresión de vimentina con factores de riesgo tumoral

(grado tumoral, índice mitótico tumoral o ausencia de ER o PgR), lo que indica un peor pronóstico de la enfermedad; sobre todo la pérdida de la expresión de CK8 que parece estar correlacionada con la progresión de la enfermedad, tumores más agresivos y una menor supervivencia [Woelfle y cols., 2004; Willipinski-Stapelfeldt y cols., 2005].

Otro ejemplo de la pérdida o disminución de la expresión de CKs durante la EMT, se puede observar en los resultados obtenidos por varios grupos de investigación que analizan la detección de CTCs en sangre periférica o DTCs en médula ósea, donde se ha demostrado que estas células expresan diferentes patrones de CKs [Effenberger y cols., 2011], pudiendo ser incluso negativas para algunas de ellas [Pantel y cols., 1994; Fehm y cols., 2002; Mikolajczyk y cols., 2011], al igual que ocurre con la EpCAM [Willipinski-Stapelfeldt y cols., 2005; Rao y cols., 2005; Paterlini-Brechot y Benali, 2007; Antolovic y cols., 2010].

2. Modelos de progresión tumoral y formación de metástasis.

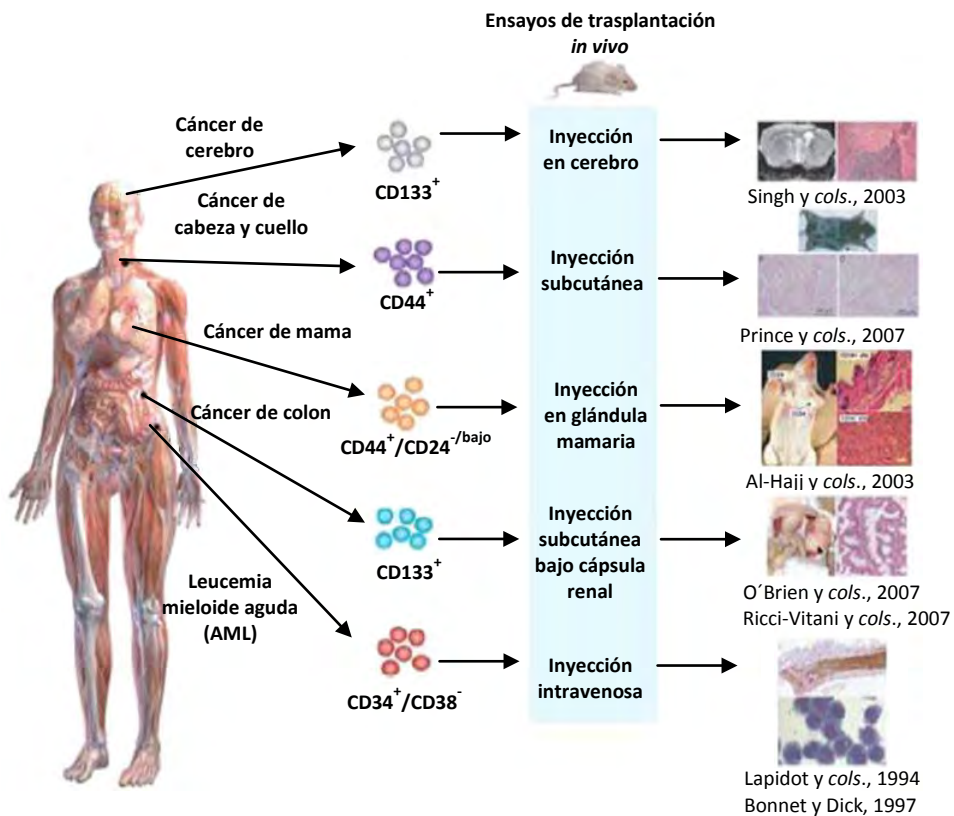
2.2.1. Modelo o hipótesis de la célula madre cancerosa

En 1855, Rudolf Virchow estableció que *“omnis cellula e cellula ejusdem generis”* (toda célula proviene de otra célula preexistente), con este enfoque se inicia la patología celular y propone que todas las enfermedades implican cambios en células normales preexistentes. En 1877 Cohnheim propone la *“teoría embrionaria”* del cáncer, la cual postula que los tumores surgen de células embrionarias que existen en los tejidos y no han alcanzado su madurez, estas serían células latentes que conservan su capacidad de proliferación. A partir de esta teoría se desarrolló la *“hipótesis de la célula madre cancerosa (CSC)”*, la cual

establece que el cáncer se desarrolla a partir de un conjunto de células malignas que poseen características de células madre, como el potencial de crecimiento indefinido [Li y cols., 2007; Goldthwaite, 2009]. Surgen así las CSCs, que expresan características tanto de células tumorales como de células madre (SC), poseen la propiedad de autorenovación, división asimétrica, resistencia a la apoptosis, crecimiento independiente, tumorigenicidad y potencial metastásico [Talmadge y Fidler, 2010].

La hipótesis de las CSCs sugiere que los tumores poseen una población de CSCs que se dividen asimétricamente y originan células progenitoras (PCs) de una forma rápida, las cuales con el tiempo se diferencian y agotan su potencial proliferativo. Las CSCs remanentes mantendrían su fenotipo original y su competencia proliferativa [Talmadge y Fidler, 2010]. Varios estudios, que han empleado modelos murinos de trasplante *in vivo*, han demostrado la existencia de las CSCs en varios tipos de tumores, y su potencial de autorenovación, originando nuevos tumores con diferentes poblaciones celulares (Figura 6).

Figura 6. Identificación de células madre cancerosas (CSCs) [Galleano, 2005].



2.2.2. Modelo mecanicista

En 1858 Rudolf Virchow propone que la diseminación metastásica del tumor es determinada por factores mecánicos (detención de émbolos de células tumorales en el sistema vascular). En 1928 James Ewing emite la teoría mecanicista de la implantación, según la cual la diseminación metastásica ocurre por factores mecánicos determinados por la estructura anatómica del sistema linfático y hematógeno. Según esta hipótesis las células tumorales saldrían del tumor primario y circularían como un trombo neoplásico, la metástasis se formarían cuando el trombo impacta y provoca un pequeño infarto, en esa zona se iniciaría el crecimiento del nuevo tumor.

2.2.3. Modelo de la “semilla y la tierra”

En 1889 Stephen Paget estableció el modelo de la “*Semilla y Tierra Fértil*”, donde propone que sólo ciertas células tumorales (semillas) pueden colonizar selectivamente órganos distantes (tierra fértil), los cuales deben poseer un microambiente apropiado para el crecimiento del nuevo tumor. Presenta así a las células tumorales que causan las metástasis, como células con un potencial de invasión (*influencia seminal*) y no solamente como un trombo neoplásico que queda atrapado en la red capilar; y al órgano secundario como un órgano predispuesto para la invasión. Estudios posteriores han demostrado la existencia de numerosos factores que determinan una interacción específica entre las células tumorales y el microambiente del órgano diana, y favorecen la formación de metástasis en sitios específicos del cuerpo [Fokas y cols., 2007].

2.2.4. Modelo de fusión celular

En 1911 Otto Aichel postula que la fusión de leucocitos con células tumorales puede dar lugar a híbridos y el producto final serían, lo que hemos llegado a definir como células malignas [Pawelek, 2005]. Esta idea ha sido apoyada por los resultados de varias investigaciones [Mortensen y cols., 2004; Vignery, 2005].

Cuando dos células se fusionan, los rasgos funcionales y genéticos de ambas se pueden apreciar en la célula hija, ya sea porque aparecen los dos núcleos parentales sin fusionarse realmente (por ejemplo, heterocarionte) o porque aparece un núcleo fusionado que expresa los genes de ambas células parentales (por ejemplo, sincarionte) [Friedl, 2005]. Actualmente, los mecanismos de fusión celular no están

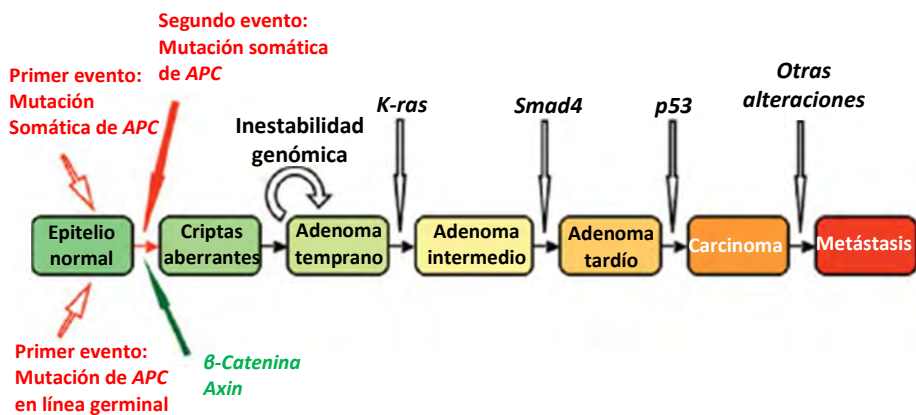
claros, aunque Pawelek (2005) menciona que esta fusión podría aparecer debido a una fagocitosis aberrante de células tumorales apoptóticas por macrófagos. Según este investigador, la fusión de células tumorales con células mieloides podría explicar la EMT que ocurre durante la progresión tumoral.

2.2.5. Modelo de selección y expansión clonal del cáncer

En 1976 Nowell propone la hipótesis de un modelo de cáncer, tanto de carcinogénesis como de progresión tumoral, que se basa en una selección y expansión clonal (*modelo de progresión o modelo estocástico*). Este modelo sugiere que la mayor parte de las neoplasias surgen de una sola célula original, y es la variabilidad genética adquirida por el clon neoplásico lo que permite que se seleccionen subpoblaciones celulares mutadas más agresivas que resultaran ser las responsables de la progresión tumoral y, por lo tanto, de la formación de las metástasis (clon más avanzado). La adquisición de la inestabilidad genética y el proceso de selección asociado que conlleva, el cual puede ser reconocido citogenéticamente, dan lugar a tumores avanzados que son biológica y cariotípicamente muy individuales. Este *modelo estocástico* es explicado con detalle en el trabajo de Fearon y Vogelstein (1990) sobre la carcinogénesis del cáncer colorrectal (Figura 7).

Este modelo sostiene que la mayoría de las células tumorales poseen un potencial metastásico bajo, pero que algunas células, menos de una entre diez millones de células tumorales, adquieren esta capacidad metastásica a través de mutaciones somáticas [Poste y Fidler, 1980].

Figura 7. Modelo de la carcinogénesis del cáncer colorrectal (adaptada de Fearon y Vogelstein, 1990). Para la iniciación del tumor son precisas mutaciones en *APC*, *β -catenina* o genes axiales. La progresión tumoral, hacia la malignidad del tumor subsecuente, se debe a la inestabilidad genética y las mutaciones secuenciales en los genes *K-ras*, *Smad4*, *TP53*, como en otros genes desconocidos [Pinto y Clevers, 2005].



Una consecuencia del *modelo de selección y expansión clonal* es que en los tumores primarios pueden existir múltiples subpoblaciones clonales que son capaces de formar focos metastásicos, lo que resulta en metástasis fenotípicamente diferentes. Además, debido a la inestabilidad genética, una metástasis clonal puede volverse rápidamente heterogénea [Talmadge, 2007; Talmadge y Fidler, 2010].

2.2.6. Modelo de heterogeneidad dinámica

En 1982 Harris y cols. proponían un modelo de heterogeneidad dinámica para la formación de las metástasis. Este modelo sugiere que la frecuencia de las variantes metastásicas que aparecen en el tumor determinan el potencial metastásico de éste, y se explicaría como un proceso estocástico que depende del tamaño del tumor, donde las

variantes metastásicas, que son inestables, estarían en un equilibrio dinámico de aparición y desaparición entre ellas mismas y con las células del tumor sin capacidad metastásica. Este modelo incorpora el concepto de fenotipo metastásico transitorio y de EMT [Talmadge, 2007].

2.2.7. Modelo de la dominancia clonal

En 1988 Kerbel y *cols.* demostraron la existencia de una dominancia clonal, este modelo sugiere que cuando un subclon metastásico surge en el tumor primario, las células de este subclon deben haber superado y dominar a la masa de células tumorales restantes. Esto daría como resultado similitudes fenotípicas entre el tumor primario y los focos metastásicos [Talmadge, 2007].

2.2.8. Modelo de evolución paralela del cáncer

En 2003 Schmidt-Kittler y *cols.* presentaron evidencias que sugerían que la selección y expansión clonal no es la mejor hipótesis para explicar el proceso metastásico, sino que éste se explica, más precisamente, por un modelo de evolución paralela. En este modelo ocurriría una diseminación de células tumorales temprana durante el desarrollo tumoral, lo que supone una propagación de células tumorales en un estadio genómico menos avanzado de lo que se pensaba, portando estas células aberraciones genéticas diferentes al tumor primario, y una evolución independiente entre las células metastásicas y las células tumorales del tumor primario. Otros estudios apoyan este modelo [Ramaswamy y *cols.*, 2003; Eide y *cols.*, 2010].

2.2.9. Teoría de especiación metastásica de poblaciones tumorales

La “teoría de especiación metastásica de poblaciones tumorales”, propuesta por Massagué [Massagué, 2009], se puede entender como una combinación entre el modelo de la CSCs y el modelo de evolución paralela del cáncer. Según ésta, los tumores son *“poblaciones celulares genéticamente diversificadas que habitan el ecosistema reactivo de nuestro organismo, donde están sometidas a presiones ambientales que generan la selección del más fuerte, de tal forma que en cada estadio del desarrollo tumoral nuevas minorías celulares quedan seleccionadas, convirtiéndose en la estirpe dominante. Si dicha estirpe, además, retiene la capacidad propagadora del tumor actuando como célula madre de cáncer, el tumor se propaga.*

Las CTCs van a ser capaces de infiltrar un órgano determinado solamente si poseen las funciones necesarias para atravesar las paredes de los capilares de este órgano [Minn y cols., 2005a; Minn y cols., 2005b; Gupta y cols., 2005; Minn y cols., 2007; Padua y cols., 2008; Nguyen y cols., 2009; Bos y cols., 2009]. De las células individuales que pasan esta selección, solamente van a ser viables aquellas que estén equipadas con funciones para sobrevivir en el nuevo entorno [Minn y cols., 2005a; Gupta y cols., 2005] y un pequeño número de estas tendrá la habilidad de reiniciar el crecimiento tumoral (células madre tumorales o células de propagación tumoral) [Gupta y cols., 2005]”. Además, las CTCs pueden colonizar su órgano de origen, en un proceso denominado “autosiembra tumoral” (“tumor self-seeding”), que podría ser la causa de la recurrencia local tras la extirpación del tumor primario. [Kim y cols., 2009].

III. CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES

1. Definición de términos

Enfermedad mínima residual (MRD de sus siglas en inglés “Minimal residual disease”): El término enfermedad mínima residual hace referencia a la persistencia de células tumorales tras el tratamiento. Estas células tumorales remanentes, son el origen de las futuras metástasis [Pantel y Brakenhoff, 2004] y su detección no es posible por técnicas convencionales. La MRD puede ser detectada en diferentes compartimientos corporales, incluyendo ganglios linfáticos [Weitz y cols., 1999; Sakorafas y cols., 2004], médula ósea [Müller y cols., 1996; Braun y cols., 2000], y sangre periférica [Gaforio y cols., 2003; Cristofanilli y cols., 2004]. La detección de la MRD ha sido posible en diferentes tipos de tumores sólidos epiteliales, como son: cáncer de mama [Gaforio y cols., 2003; Braun y cols., 2000]; cáncer de colon [Cohen y cols., 2008; Vlems y cols., 2003]; y cáncer de próstata [Moreno y cols., 2001; Swennenhuis y cols., 2009].

Células tumorales aisladas (ITCs), micrometástasis y macrometástasis: Estos términos hacen referencia a las células tumorales que se encuentran en los nódulos linfáticos, y su detección repercute en la valoración del TNM del tumor. Las ITCs son células tumorales individuales o pequeños cluster de éstas, cuyo tamaño no es superior a 0,2 mm. Las ITCs no muestran características malignas: no tienen actividad proliferativa ni presentan reacción del estroma. Las micrometástasis son cluster de células tumorales cuyo tamaño varía de los 0,2 mm a los 2 mm, y muestran características malignas. Las macrometástasis son cluster de células tumorales, o depósitos de éstas,

cuyo tamaño es superior a los 2 mm, y muestran características malignas. La detección de las ITCs, micrometástasis y macrometástasis, puede ser por hematoxilina y eosina, inmunohistoquímica o técnicas moleculares [Greene y cols., 2002].

Células tumorales diseminadas (DTCs): Este término se refiere a las células tumorales que se localizan en otros órganos, sobre todo en médula ósea, algunas veces también denominadas micrometástasis o ITCs [Naume y cols., 2004a; Wiedswang y cols., 2004]. Este término se ha empleado algunas veces para las células tumorales que se detectan en sangre periférica [Naume y cols., 2004b].

Células tumorales circulantes (CTCs): Término con el que se refiere a las células tumorales que se han desprendido del tumor primario y circulan por el torrente sanguíneo. Estas células tumorales tienen potencial maligno, el cual ha sido demostrado por la capacidad de formación de metástasis *in vivo* que poseen [Pretlow y cols., 2000] y las anomalías cromosómicas que portan [Fehm y cols., 2002; Meng y cols., 2004a; Swennenhuis y cols., 2009]. Existen otros términos que también se usan para referirse a las CTCs, por ejemplo: células citoqueratín positivas (células CK+) [Gaforio y cols., 2003]; o células epiteliales tumorales diseminadas o circulantes (C(D)ETCs) [Martin y cols., 1998; Pachmann y cols., 2008; Pachmann y cols., 2011].

Microémbolos tumorales circulantes (CTM): Este término hace referencia a las células tumorales que migran de forma colectiva por la sangre periférica o por los vasos linfáticos. Poseen un alto potencial metastásico, ya que mantienen activas sus capacidades proliferativas [Paterlini-Brechot y Benali, 2007; Cho y cols., 2012].

2. **Introducción**

En 1869 Thomas Ashworth aisló y detectó células tumorales en sangre periférica de un paciente con cáncer de próstata metastásico. Tras una comparación minuciosa de la morfología de estas CTCs con las del tumor primario, Ashworth postuló que *“las células aisladas en la sangre periférica del paciente eran idénticas a las del tumor primario, y este hecho podría explicar el origen de los múltiples tumores que se originan en una misma persona”*.

El segundo trabajo que habla de la detección de células tumorales en sangre periférica de pacientes con cáncer, fue el de Engell en 1955. En 1959 este autor analizó la presencia de células tumorales en sangre periférica de 125 pacientes con cáncer gastrointestinal [Engell, 1959] y detectó que el 61% de los casos presentaban células tumorales en las muestras sanguíneas, y esta presencia estaba asociada con el grado de diferenciación tumoral. Debido a que el 51% de los pacientes que sobrevivieron de 5 a 9 años, tras la resección del tumor, presentaban células tumorales, Engell sugirió que *“la diseminación de estas células hacia el torrente sanguíneo debía haber ocurrido antes o durante la cirugía”*.

Actualmente sabemos que el factor más importante que afecta a los pacientes con tumores sólidos invasivos, es la propagación tanto regional (nódulos linfáticos regionales) como sistémica del tumor. En muchos pacientes la formación de metástasis ya se ha producido en el momento del diagnóstico del tumor primario, aunque clínicamente no existan evidencias de éstas [Talmadge y Fidler, 2010]. Por ejemplo, aproximadamente entre el 25% y el 30% de los pacientes N0 con cáncer

de mama presentan recurrencia de la enfermedad tras la extirpación del tumor primario [Janni y cols., 2005a; Riethdorf y cols., 2008]; en el caso de cáncer colorrectal, aproximadamente el 50% de los pacientes que son sometidos a cirugía curativa mueren por enfermedad metastásica a los 5 años, incluso los pacientes NO presentan una recurrencia de aproximadamente el 30% [Riethdorf y cols., 2008]. Esto indica que debe existir una diseminación hematógena oculta [Janni y cols., 2005b; Riethdorf y cols., 2008], y que ésta es indetectable por los métodos diagnósticos tradicionales empleados [Hosch y cols., 2001; Hawes y cols., 2001].

3. Técnicas de enriquecimiento, aislamiento y detección de CTCs y DTCs

El primer paso en la detección eficaz de las CTCs y DTCs es distinguir entre células tumorales y normales. En el caso de muestras de tejido, como médula ósea y nódulos linfáticos, las células tumorales pueden ser identificadas por técnicas histológicas, mientras que la identificación de las células tumorales en la circulación hematógena representa un desafío más complejo.

Todas las técnicas de detección de CTCs y DTCs se enfrentan a dos problemas:

1. la escasez de células tumorales presentes en la muestra, sobre todo en el caso de las muestras sanguíneas;
2. la necesidad de emplear un marcador lo más específico posible que diferencie células tumorales de células normales.

3.3.1. Técnicas de enriquecimiento y aislamiento de CTCs y DTCs

Los sistemas de enriquecimiento y aislamiento de células tumorales son necesarios en el análisis de muestras sanguíneas, y en el análisis de muestras de tejido que no se haga por cortes o secciones del mismo. Se puede decir que existen dos sistemas básicos de enriquecimiento y aislamiento, que no son excluyentes entre sí, y están basados en las características físicas y biológicas de las CTCs y DTCs.

3.3.1.1. Sistemas basados en las características físicas de las células tumorales

3.3.1.1.1. Centrifugaciones en gradientes de densidad

Los métodos de centrifugación en gradiente de densidad permiten la separación de las células de la muestra sanguínea o del aspirado medular. Las interfases celulares que aparecen en la muestra tras la centrifugación, son utilizadas para un posterior enriquecimiento de la muestra o para la detección por métodos inmunológicos o moleculares de las CTCs y DTCs.

Los métodos de centrifugación en gradiente de densidad más utilizados son:

- Centrifugación en gradiente de densidad simple: Emplea un solo ficoll para el aislamiento de las células nucleadas. Tras añadir la muestra sanguínea al ficoll y realizar la centrifugación, las células sanguíneas quedan distribuidas de la siguiente forma: plaquetas; eritrocitos y polimorfos nucleares, que quedan separados en el pellet; y las células mononucleares (MNC), que quedan en la

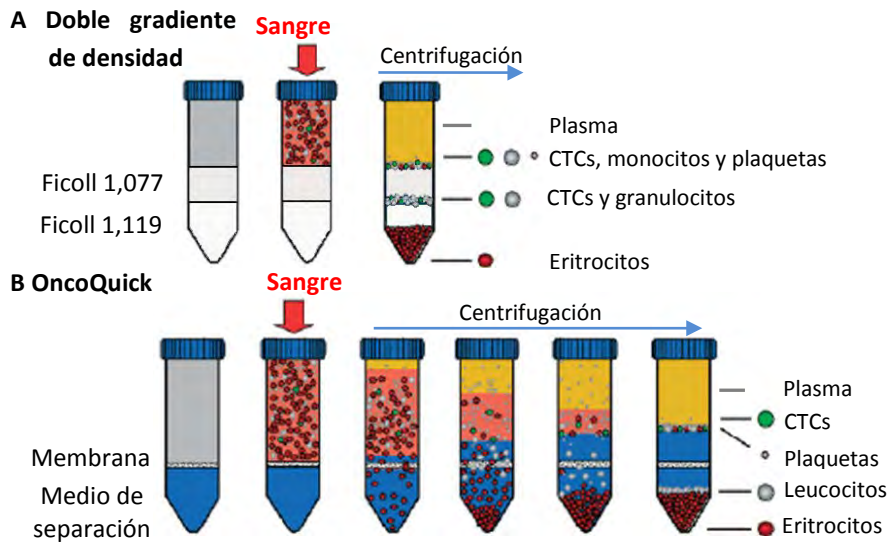
interfase que se crea entre el ficoll y el plasma (plasma/ficoll). Las CTCs se aíslan en esta interfase de células nucleadas. Para el aislamiento de las DTCs en aisparados de médula ósea, también se emplea un solo medio de separación y las DTCs aparecen en la interfase MNC [Naume y cols., 2001; Wiedswang y cols., 2003; Benoy y cols., 2004; Pantel y Barkenhoff, 2004].

Centrifugación en gradiente de densidad OncoQuick (Greiner Bio-one): Este sistema se emplea para el aislamiento de CTCs en muestras sanguíneas. El kit viene equipado con tubos de centrifugación que poseen una membrana porosa sobre un medio de separación. Tras añadir la muestra sanguínea y realizar la centrifugación, las células sanguíneas quedan distribuidas de la siguiente forma: eritrocitos, en el pellet; leucocitos, encima del pellet; plaquetas, retenidas en la membrana. Las CTCs, y algunas plaquetas, aparecen en la interfase plasma/medio de separación (Figura 8). Este sistema permite una mayor recuperación de CTCs que el sistema de centrifugación en gradiente de densidad simple [Rosenberg y cols., 2002]. Actualmente existe una variación de este sistema que es la centrifugación en gradiente de densidad OncoQuick plus, el cual es muy similar al sistema previo pero permite una mayor recuperación de CTCs y reproducibilidad de los ensayos [Königsberg y cols., 2010].

- Centrifugación en doble gradiente de densidad discontinuo: este sistema fue desarrollado por English y Andersen (1974), para permitir la separación simultánea de las MNC y las células granulocíticas (GC) de la muestra sanguínea. Gaforio y cols. (2003) emplearon este sistema de enriquecimiento y comprobaron que

permitía una mayor recuperación de CTCs que el sistema de gradiente de densidad simple. Este sistema emplea dos medios Ficoll-Histopaque con densidades diferentes, 1,077 y 1,119. Tras añadir la muestra sanguínea al doble gradiente de densidad y realizar la centrifugación, las células sanguíneas quedan distribuidas de la siguiente forma: eritrocitos, separados en el pellet; granulocitos, en la interfase ficoll-1,077/ficoll-1,119; y células mononucleares y plaquetas, en la interfase plasma/ficoll-1,077. Las CTCs se aíslan en ambas interfases de células nucleares (Figura 8).

Figura 8. A. Esquema del sistema de centrifugación en doble gradiente de densidad. El doble gradiente de densidad se forma al extender un volumen de Ficoll-Histopaque 1077 sobre un volumen igual de Ficoll-Histopaque 1119. La sangre se extiende cuidadosamente sobre el medio superior (Ficoll-Histopaque 1077) y se centrifuga la muestra a 18-26 °C durante 30 min a 700Xg. Tras este proceso, las células sanguíneas quedan divididas entre las interfases celulares y el pellet: las células de las series granulocíticas se encuentran entre el Ficoll-Histopaque 1077 y el 1119, mientras que los linfocitos, otras células mononucleares y las plaquetas se encuentran en la zona entre el plasma y el Ficoll-Histopaque 1077. Las células tumorales circulantes (CTCs) aparecen en las interfases celulares plasma/Ficoll-Histopaque 1077 y Ficoll-Histopaque 1077/1119 [English y Andersen, 1974; Sigma-Aldrich]. **B. Esquema del sistema de centrifugación en gradiente de densidad OncoQuick.** En el kit vienen los tubos de prolipropileno con el medio y la membrana porosa de separación celular. Tras depositar la sangre periférica se centrifuga la muestra a 4 °C durante 20 min a 1.600Xg. Tras la centrifugación las células aparecen divididas entre la interfase, la membrana y el pellet. Las CTCs aparecen en la interfase celular plasma/medio de separación [Greiner Bio-one].



3.3.1.1.2. Sistemas de captura celular por filtros o membranas porosas

Los filtros que se emplean en la captura de CTCs son membranas porosas, con un tamaño de poro determinado que permite retener a las células tumorales.

Algunos ejemplos de estos sistemas son:

- Microfiltro en 3D de CTCs viables, desarrollado por Zheng y cols. (2011). El cual consiste en dos membranas con poros de 9 y 8 μm de diámetro, posicionadas en dos capas paralelas de forma que los poros no coinciden, y dejando un espacio entre sí donde quedan retenidas las CTCs. La membrana inferior disminuye la fuerza que se ejerce sobre la membrana citoplasmática de las CTCs, de forma que se mantiene la viabilidad celular. Tras la captura, las CTCs se pueden detectar por microscopía electrónica de barrido o por microscopía de fluorescencia o confocal.

- Ensayo de aislamiento de células epiteliales por su tamaño (ISET), desarrollado por Vona y cols. (2000). Este sistema filtra las muestras sanguíneas, inferiores a 1 ml de volumen, mediante un sistema de vacío a través de un módulo de filtración que lleva incorporada una membrana de policarbonato con poros de 8 μm de diámetro. Tras la filtración, la membrana es lavada y aparecen las células tumorales aisladas y retenidas en ella.

Este sistema de filtrado se puede emplear tras el enriquecimiento de CTCs por centrifugación en gradiente de densidad, demostrando una mayor detección de células tumorales que cuando se emplea únicamente el sistema de captura celular por filtración [Kahn y cols., 2004].

3.3.1.2. Sistemas basados en las características biológicas de las células tumorales

3.3.1.2.1. Captura por ensayos de invasividad

Estos métodos se denominan funcionales y permiten el enriquecimiento de la muestra basándose en las características invasivas de las CTCs. Las CTCs son capaces de degradar matrices de adhesión celular (CAM) e invadirlas, esta propiedad sirve para diferenciar CTCs de células no tumorales y de células tumorales no viables.

Estos ensayos se realizan exponiendo la CAM a la sangre periférica de pacientes con cáncer, las CTCs de estas muestras se unen a la matriz, y posteriormente la invaden y la degradan. Lo que se hace es marcar la CAM fluorescentemente, de forma que cuando las CTCs la degraden queden marcadas debido a que ingieren fragmentos de la

membrana (CAM+), a la misma vez se emplean anticuerpos epiteliales (anti-EpCAM, anti-ESA y anti-panCKs) marcados con fluorocromos diferentes a la CAM, para así realizar una doble marcación de estas células tumorales viables y poder reconocerlas por microscopía de fluorescencia (Figura 9). Además, las muestras son marcadas con un anticuerpo anti-panleucocitario (anti-CD45), para asegurar que las CTCs son CD45- [Fan y cols., 2009; Lu y cols., 2010].

Figura 9. Detección de células tumorales circulantes (CTCs) por ensayo de invasividad, muestra de sangre periférica de una paciente con cáncer de ovario (estadio IIIc). En las fotografías se pueden apreciar dos CTCs que han ingerido fragmentos fluorescentes de CAM (CAM+) y positivas para los marcadores epiteliales empleados (Epi+) (imagen de la izquierda y del medio). Las células hematopoyéticas se marcan con anti-CD45 y el revelado se hace por el sistema alcalin-fosfatasa (imagen de la derecha) [Fan y cols., 2009].



3.3.1.2.2. Sistemas de inmunorosetones: RosetteSep (StemCell Technologies)

Este sistema utiliza un cóctel de anticuerpos, que son complejos tetraméricos formados por la unión de cuatro anticuerpos: un anticuerpo anti-células hematopoyéticas (anti-CD2, -CD16, -CD19, -CD36, -CD38, -CD45 y -CD66b), un anticuerpo anti-eritrocitos (anti-glicoforina A), y dos anticuerpos de anclaje; o dos anticuerpos anti-glicoforina A, y dos anticuerpos de anclaje.

El cóctel de anticuerpos se añade a la muestra sanguínea antes de realizar una centrifugación en gradiente de densidad, de forma que las células hematopoyéticas quedan marcadas y unidas entre sí formando inmunorosetones. Estos agregados celulares tienen una mayor densidad y tras la centrifugación se depositan en el pellet, mientras que las células tumorales, que quedan sin marcar, aparecen como una población enriquecida en la interfase plasma/medio de separación.

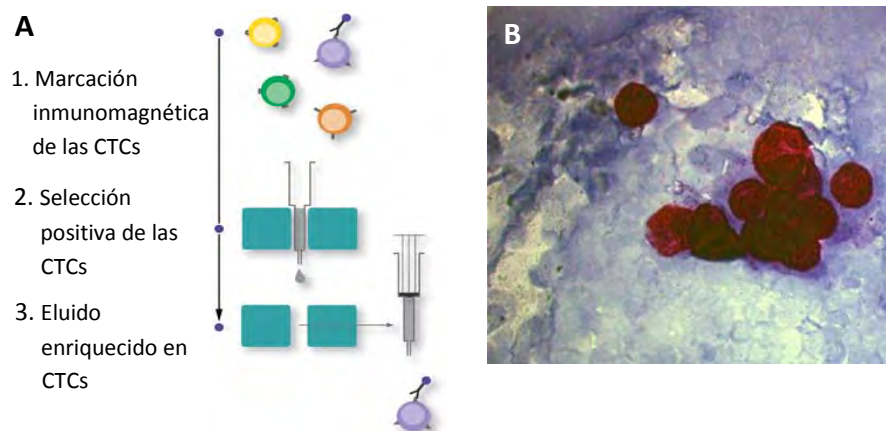
Este sistema presenta una recuperación de células tumorales superior a los sistemas OncoQuick, pero menor que los sistemas que emplean anticuerpos monoclonales (mAbs) conjugados con partículas magnéticas [Königsberg y cols., 2010].

3.3.1.2.3. Sistema basado en afinidad magnética con "sorting" celular

El sistema MACS y los sistemas de microesferas magnéticas [AdnaTest BreastCancer (AdnaGen)], son sistemas que no interfieren ni en la viabilidad, ni en la funcionalidad celular. Están basados en el uso de partículas de óxido de hierro, de aproximadamente 50 nm de tamaño y biodegradables, conjugadas con mAbs. Estos mAbs pueden estar dirigidos contra los antígenos presentes en las células de interés, por ejemplo: EpCAM; CKs 7/8; y MUC1 (selección positiva) (Figura 10) [Molnar y cols., 2001; Fhem y cols., 2002; Gaforio y cols., 2003; Guo y cols., 2004; Fehm y cols., 2007; Königsberg y cols., 2010], o pueden reconocer antígenos de las células contaminantes de la muestra, por ejemplo, el antígeno común panleucocitario (anti-CD45) presente en las células de origen hematopoyético (selección negativa) [Guo y cols., 2004; Yang y cols., 2009].

Una vez marcadas las células, se aíslan mediante la utilización de una columna y de un separador magnético. Con este sistema se consigue retener en el interior de la columna, a las células marcadas con el anticuerpo conjugado con las microesferas. La obtención de la población celular de interés se consigue, en el caso de la selección positiva, mediante la liberación de la columna del separador magnético; y en el caso de la selección negativa, recogiendo el líquido eluido de la columna.

Figura 10. A. Esquema del sistema MACS de selección positiva de células tumorales circulantes (CTCs). 1. Marcación inmunomagnética de las CTCs con anticuerpos monoclonales conjugados con microesferas magnéticas. 2. Las CTCs quedan retenidas en la columna sometida a un campo magnético (separador magnético). 3. Tras retirar la columna del separador magnético las CTCs son eluidas en una fracción celular enriquecida [Miltenyi Biotec]. **B. Cluster de CTCs aisladas por este método y detectadas por inmunocitoquímica en sangre periférica de una paciente neoadyuvante con cáncer de mama** [Fotografía del grupo de investigación del Dr. Gaforio].



3.3.1.2.4. Sistemas basados en ferrofluidos

Son sistemas compuestos por coloides de 1 nm, cuyo corazón magnético está recubierto con albúmina sérica bovina (BSA) conjugado con anticuerpos, como la EpCAM, para capturar las células diana. Tras la incubación con las partículas coloidales sigue una separación magnética de las células marcadas.

El sistema más conocido es el CellSearch® Circulating Tumor Cell Kit de Veridex, el cual contiene un reactivo de captura basado en un ferrofluido y reactivos inmunofluorescentes. El ferrofluido consiste en nanopartículas con un núcleo magnético rodeado de una capa polimérica revestida con anticuerpos dirigidos frente al antígeno EpCAM, para la captura de las CTCs. Este kit además de la captura inmunomagnética y el enriquecimiento, permite la detección de las CTCs añadiendo a la muestra reactivos fluorescentes: anti-CK-ficoeritrina (PE) (anti-CK 8/18/19), específico para células epiteliales; anti-CD45-aloficocianina (APC), específico para leucocitos; y DAPI, que marca los núcleos celulares [Veridex, LLC. Jhonson & Jhonson company].

La muestra es insertada, de forma automática, en un cartucho que se introduce en un dispositivo de presentación celular MagNest®. El fuerte campo magnético del dispositivo MagNest® atrae a las células epiteliales marcadas magnéticamente hacia la superficie del cartucho. La mezcla reactivo/muestra y la separación magnética se realiza mediante el CellTracks® AutoPrep® System, y la lectura de la muestra se realiza mediante el CellTracks Analyzer II® o CellSpotter® Analyzer que exploran automáticamente toda la superficie del cartucho, adquieren las imágenes y muestran al usuario cualquier evento donde CK-PE y la fluorescencia DAPI aparezcan en el mismo lugar [Cristofanilli y cols., 2004; Cristofanilli y cols., 2005; Cohen y cols., 2008; Swennenhuis y cols., 2009].

Tanto para los sistemas basados en las características físicas como citológicas, para demostrar el enriquecimiento exitoso en células tumorales, sería necesario analizar las porciones celulares no capturadas en el asilamiento celular [Köstler y cols., 2000; Kasimir-Bauer y cols., 2001].

3.3.2. Técnicas de detección de CTCs y DTCs

Tras el enriquecimiento, que es del orden de 10.000 veces en las células de interés [Ring y cols., 2004], la muestra todavía presenta células contaminantes. Por lo tanto, se deben emplear métodos que permitan reconocer las células tumorales.

3.3.2.1. Técnicas histopatológicas convencionales

Estos sistemas se emplean en cortes de tejido, generalmente nódulos linfáticos, incluidos en parafina o formalina. Por lo tanto, no es necesario aplicar un sistema de enriquecimiento previo. Los métodos histopatológicos convencionales utilizan protocolos de tinción con hematoxilina y eosina en combinación con un examen citológico para identificar las células tumorales. La valoración microscópica es subjetiva, y la diferenciación entre células atípicas y células no relevantes tiene que ser realizada por un citopatólogo experto. La aplicación de los métodos histológicos convencionales no abarca el análisis de médula ósea y sangre, debido a la gran presencia de células multinucleadas que aparecen en estos tipos de muestras [Zehentner, 2002].

3.3.2.2. Técnicas inmunológicas

3.3.2.2.1. Técnicas inmunohistoquímicas e inmunocitoquímicas

La IHC (marcaje de células tumorales en tejido) y la ICC (marcaje de células tumorales en citospin o en frotis), pertenecen a un grupo de técnicas de inmunotinción que permiten demostrar la expresión de una gran variedad de antígenos presentes en las células, utilizando mAb conjugados con sistemas enzimáticos. Estas técnicas presentan una mayor sensibilidad y especificidad que las técnicas histopatológicas convencionales, y por lo tanto sirven para detectar células tumorales en nódulos linfáticos, médula ósea y sangre [Leikola y cols., 2005; Klevesath y cols., 2005].

Si estas técnicas se emplean sobre un corte de la muestra de estudio, no se precisa de un enriquecimiento previo y se realiza directamente la marcación. Pero, si se emplean en sangre o en aspirado de tejido es preciso el enriquecimiento de la muestra antes de la marcación de las células de interés [Pantel y cols., 2003].

Los mAbs que se emplean reconocen antígenos específicos, como pueden ser las mucinas y las CKs [Naume y cols., 2001; Benoy y cols., 2004; Slade y cols., 2005]. La expresión diferencial de las CKs, según el tipo de carcinoma, las convierten en unos marcadores útiles de subtipos histológicos [Moll y cols., 1982; Moll, 1991], y su grado de expresión en la célula viene determinado por el tipo de epitelio y el grado de maduración o diferenciación celular [Melchor y Benítez, 2008]. La detección de CKs, en un ambiente donde no se encuentra de forma habitual (como la sangre periférica), se ha propuesto como un marcador de células tumorales de origen epitelial [Gaforio y cols., 2003; Cristofanilli y cols., 2004; Cohen y cols., 2008] (Figura 10.B. Cluster de CTCs aisladas por este método y detectadas por ICC en sangre periférica de una paciente neoadyuvante con cáncer de mama).

Los sistemas enzimáticos, conjugados con los mAbs que identifican a las células tumorales, más empleados son la peroxidasa y la fosfatasa alcalina. Pueden aparecer falsos positivos tanto debido a los mAbs, por ejemplo: anti-mucinas [Brugger y cols., 1999] y anti-CKs [Vagunda y cols., 2001]; como debido a los sistemas de revelado [Braun y Pantel, 1999], aunque la evaluación morfológica de estas células puede ayudar a descartar los falsos positivos detectados [Borgen y cols., 2006]. Aún así, usar el mAb y el sistema de revelado adecuado es crucial para la especificidad de la reacción y la identificación correcta de las células tumorales.

Un límite que presentan estas técnicas es que el estudio de grandes volúmenes de material consume una gran cantidad de tiempo, por lo que la alternativa es el uso de sistemas automáticos o semiautomáticos [Borgen y cols., 2001; Witzig y cols., 2002; Pierga y cols., 2004; Cristofanilli y cols., 2005; Swenhenious y cols., 2009].

Una variedad de estas *técnicas de detección* es la *inmunofluorescencia (IF)*, la cual puede ser directa o indirecta. La IF se basa en emplear mAb primarios que van marcados con moléculas fluorescentes (IF directa); o sin marcar, los cuales son reconocidos por mAb secundarios marcados con moléculas fluorescentes (IF indirecta). Con esta técnica se eliminan los falsos positivos debidos a los sistemas de revelado enzimáticos. Actualmente, diversos grupos de investigación utilizan esta técnica para la detección de CTCs en sangre periférica [Cristofanilli y cols., 2004; Cristofanilli y cols., 2005; Cohen y cols., 2008; Swenhenious y cols., 2009].

Una ventaja que presentan estas técnicas inmunológicas es que, tras el reconocimiento de las células tumorales en las muestras, posibilitan el estudio genético de las células detectadas [Fehm y cols., 2002; Meng y cols., 2004; Swenhenious y cols., 2009; Wind y cols., 2009].

Una modificación de la técnica de IF es la técnica de *Inmunofenotipación y análisis citogenético en interfase fluorescente como herramienta para la investigación de neoplasias (Fluorescence immunophenotyping and Interphase Cytogenetics as a Tool for Investigation Of Neoplasm, FICTION)*, desarrollada por Weber-Matthiesen y cols. en 1992. Esta técnica permite el análisis simultáneo del fenotipo y genotipo de las células tumorales [Weber-Matthiesen y cols., 1992; Weber-Matthiesen y cols., 1993] y ha demostrado ser útil en el estudio de neoplasias hematógenas [Nylund y cols., 1993; Haferlach y cols., 1997; Temple y cols., 2004; Young y cols., 2006] y algunos tumores sólidos [Terada y cols., 2000; Zhang y cols., 2000; Dettori y cols., 2003; Campos y cols., 2008].

3.3.2.2.2. Técnicas de citometría de flujo

Otra técnica inmunológica es la citometría de flujo (FC). A través de las técnicas de FC se consigue el aislamiento y la enumeración de las células tumorales, de forma individual, por marcación con mAbs [Moreno y cols., 2001; Beitsch y Clifford, 2001; Cornfield y cols., 2003; Rao y cols., 2005]. La FC permite la medición simultánea de múltiples características físicas y químicas de las células en suspensión, por lo tanto permite conocer el tamaño y la complejidad interna, además de realizar una evaluación química y fenotípica de las células estudiadas.

Hay que tener en cuenta que sólo un pequeño número de células tumorales son aisladas en la sangre de los pacientes con tumores sólidos, incluso en casos de pacientes metastásicos, en general menos de 10 células por ml. Debido a esto, estas técnicas de detección por FC no son las más precisas a la hora de detectar las células de interés en la muestra sanguínea [Swerts y cols., 2004]. Por lo tanto, es imprescindible la utilización de sistemas de enriquecimiento de la muestra para el uso de técnicas de detección por FC [Ring y cols., 2004]. Actualmente se están empleando técnicas de FC multiparamétricas que presentan una sensibilidad de detección alta, 10 células tumorales por mililitro de sangre (volumen total de 7,5 a 10 ml), demostrando que es posible la detección y fenotipación de las CTCs por esta metodología [Pluim y cols., 2012; Hristozova y cols., 2012; Fusi y cols., 2012].

3.3.2.3. Técnicas moleculares

Los métodos moleculares empleados se basan en la detección de DNA y mRNA de las células tumorales en las muestras.

En un principio, los métodos moleculares de detección de células tumorales eran usados en el estudio de la MRD de enfermedades hematológicas malignas, como la leucemia mieloide crónica o la leucemia linfoblástica aguda, y su uso se centraba en la detección de cambios genéticos [Miyamura y cols., 1992; Delage y cols., 1991]. Posteriormente, las técnicas moleculares demostraron ser útiles en la detección de células tumorales en pacientes con tumores sólidos, tanto en sangre en sangre periférica como médula ósea y nódulos linfáticos [Zehentner, 2002; Ghossein y Bhattacharya, 2000; Ring y cols., 2004; Mostert y cols., 2009].

Inicialmente se empleaba la detección de DNA, pero ésta solo indica la presencia de ácidos nucleicos y no necesariamente de células tumorales, y su detección puede deberse al deterioro de las células tumorales. Por consiguiente, la presencia de marcadores de DNA, amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), no confirman necesariamente la presencia de células tumorales viables pero son indicativo de la carga tumoral [Ghossein y Bhattacharya, 2000; Zehentner, 2002; Ring y *cols.*, 2004; Mostert y *cols.*, 2009]. Posteriormente se empezó a emplear la detección de mRNA [Chen y *cols.*, 2000; Shaw y *cols.*, 2000], ya que éste presenta una viabilidad baja en las muestras clínicas, y su detección sugiere que esté presente en el contexto de célula tumoral viable [Zehentner, 2002; Ring y *cols.*, 2004; Mostert y *cols.*, 2009; Beiske y *cols.*, 2009].

La disponibilidad de la tecnología de PCR en tiempo real, o PCR cuantitativa (real time-PCR, qRT-PCR), ofrece nuevas ventajas incluyendo: reducción del riesgo de contaminación; cuantificación directa; alto rendimiento, debido a minimizar el proceso de lectura de la polimerasa; y el uso de programas de ciclo rápidos [Zehentner, 2002; Ring y *cols.*, 2004; Mostert y *cols.*, 2009].

Las técnicas moleculares presentan la ventaja de una alta sensibilidad, detección de 1 célula tumoral entre 10^7 células mononucleares, pero presentan una baja especificidad [Ghossein y Bhattacharya, 2000], aunque la qRT-PCR permite discernir entre una expresión baja y alta del marcador estudiado, lo que aumenta el poder discriminar entre mRNA de células normales y de células tumorales [Mostert y *cols.*, 2009]. Sin embargo, la aparición de falsos positivos es un problema importante cuando se emplean estas técnicas, ya que se produce la pérdida morfológica de la célula tumoral, y estos se suelen deber a: la presencia de pseudogenes

[Tschentscher y cols., 1997; Smith y cols., 2001; Hurteau y Spivack, 2002]; la expresión ilegítima de los marcadores estudiados [You y cols., 2008]; o la existencia de células epiteliales no tumorales contaminantes en la muestra.

Tanto en la detección de DNA como de mRNA por PCR o qRT-PCR, es necesario realizar diversos controles que aseguren la eficacia, sensibilidad y especificidad de la reacción [Ghossein y Bhattacharya, 2000], y seguir un protocolo que involucra varios pasos:

- El primero paso es aislar las células mononucleares de la muestra. Normalmente, el primer paso es una centrifugación por gradiente de densidad [Koch y cols., 2005], aunque algunos grupos de investigación han usado la separación inmunomagnética directamente [Chen y cols., 2005] o ambas técnicas [Pantel y Brakenhoff, 2004]. También es posible realizar la detección de DNA y mRNA en muestras de plasma y suero, por lo que no es preciso realizar un enriquecimiento de la muestra [Chen y cols., 2000; Shaw y cols., 2000].
- En el caso de la detección de DNA por PCR, el segundo paso es la obtención del DNA total de la muestra; el tercer paso es la amplificación por PCR, mediante cebadores específicos del marcador de DNA escogido; el cuarto paso es la detección de los productos obtenidos, para lo que se realiza una electroforesis en gel de agarosa y la marcación del DNA con bromuro de etidio u otro agente intercalante que sea fluorescente (por ejemplo, SYBR Green); y el paso final, es cuantificar semicuantitativamente los valores obtenidos, para poder extrapolar el tamaño de los fragmentos de DNA estudiado se usan marcadores de peso molecular, y se comparan los tamaños de las bandas de DNA diana con los resultados obtenidos de amplificar secuencias de genes

constitutivos en las muestras y los resultados obtenidos en controles de voluntarios sanos, donde se realiza el mismo protocolo.

- En el caso de la detección de mRNA por PCR, el segundo paso es la obtención del mRNA total; el tercer paso es la obtención, utilizando la transcriptasa inversa, del DNA complementario a éste (cDNA). A partir de aquí se trabaja igual que en el caso de la detección de DNA. Algunas veces, para aumentar la sensibilidad, se realiza una segunda reacción de PCR sobre el producto de la primera reacción de amplificación, utilizando cebadores diferentes [Huang y cols., 2003].
- En la detección de mRNA por qRT-PCR, se siguen los mismos pasos que antes, pero las enzimas, los cebadores y los termocicladores que se utilizan son diferentes. Con la qRT-PCR la cuantificación es cuantitativa, y se suele realizar comparando el cambio en los niveles de expresión del mRNA estudiado (curvas de los marcadores estudiados) con el nivel de expresión, obtenido usando el mismo protocolo de la qRT-PCR, de genes constitutivos en las muestras (genes de normalización). Además se puede establecer un rango normal en el ensayo empleando controles, de forma que se obtiene un punto de corte que se utiliza para identificar las muestras positivas y negativas, mejorando la especificidad del test [Schuster y cols., 2003; Ring y cols., 2004; Pantel, 2003].

Al igual que en los protocolos de detección por técnicas inmunológicas, la metodología basada en el estudio del DNA y mRNA es laboriosa, sobre todo la del mRNA.

En la detección de CTCs y DTCs por técnicas moleculares se han empleado con éxito varios marcadores, por ejemplo en la detección de DNA se han utilizado: mutaciones en protooncogenes o en genes supresores de

tumores [Conzelmann y cols., 2004]; inestabilidad de microsatélites [Shaw y cols., 2000; Schwarzenbach y cols., 2009]; secuencias oncogénicas virales [Kobayashi y cols., 1998; Im y cols., 2003]; o metilaciones del DNA [Umetani y cols., 2005]; en el caso de la detección de mRNA se han utilizado: «tránscritos asociados al tumor» como el CEA [Kim y cols., 2005; Wang y cols., 2005; Guo y cols., 2004], el antígeno asociado al melanoma [Kufer y cols., 2002; Sienel y cols., 2007], la subunidad β de la gonadotropina coriónica humana [Fabisiewicz y cols., 2004]; mucinas [Felton y cols., 2004; de Cremoux y cols., 2000], hTR y hTERT [Chen y cols., 2000]; y «tránscritos específicos de tejido» como el antígeno específico de la próstata [Ross y cols., 2005] en el caso del carcinoma de próstata, CKs [Yun y cols., 2000; Shaw y cols., 2000; Retz y cols., 2001; Felton y cols., 2004; Zhang y cols., 2005; Fabisiewicz y cols., 2004; Koch y cols., 2005] para tumores sólidos epiteliales, tirosinasa [Reinhold y cols., 2001] en casos de melanoma, y mamaglobulina [Suchy y cols., 2000; Corradini y cols., 2001; Fabisiewicz y cols., 2004] en tumores de mama (Tabla 1).

Desde el año 2000 se está utilizando la técnica OSNA para la detección de CTCs en el SLN de forma intraoperatoria, la cual es una modificación de la qRT-PCR que permite la amplificación de ácidos nucleicos en un solo paso [Notomi y cols., 2000; Nagamine y cols., 2001], sin utilizar un método de enriquecimiento previo [Visser y cols., 2008; Schem y cols., 2009; Tsujimoto y cols., 2007].

Tabla 1. Detección de CTCs y DTCs por métodos moleculares [Pantel y Otte, 2001].

Tejido de análisis	Tipo de Tumor	Marcadores moleculares
Médula Ósea	Cáncer de mama	CK19, CEA, Mamaglobulina
	Cáncer colorrectal	CEA, CK19, CK20
	Cáncer de estómago	CEA, CK20
	Cáncer de páncreas	CEA
	Cáncer de próstata	PSA, CK19
Nódulos Linfáticos	Cáncer de mama	CK19, MUC1, β -hCG
	Cáncer de cérvix	HPV16-E6/E7
	Cáncer colorrectal	CEA, CK19, CK20, Mutaciones <i>TP53</i> y <i>K-ras</i>
	Cáncer de próstata	PSA, PSM
	Cáncer de piel (melanoma)	Tirosinasa
	Cáncer de pulmón	Mutaciones <i>TP53</i> y <i>K-ras</i>
	Cáncer de páncreas	Mutaciones <i>K-ras</i>
	Cáncer de cabeza y cuello	Mutaciones <i>TP53</i>
Sangre	Cáncer de mama	CK19, EGFR, β -hCG, Telomerasa, Mamaglobulina
	Cáncer colorrectal	Mutaciones <i>K-ras</i> , CK20
	Cáncer de páncreas	Mutaciones <i>K-ras</i>
	Cáncer de próstata	PSA, PSM
	Cáncer de piel (melanoma)	Tirosinasa, MUC18, MAGE-3
	Cáncer de pulmón	Alteraciones en microsatélites
	Cáncer de estómago	CK20
	Cáncer de hígado	α -Fetoproteína
	Cáncer de cabeza y cuello	Alteraciones en microsatélites
Hígado	Cáncer de páncreas	Mutaciones <i>K-ras</i>
Resección de los márgenes tumorales	Cáncer de cabeza y cuello	Mutaciones <i>TP53</i>

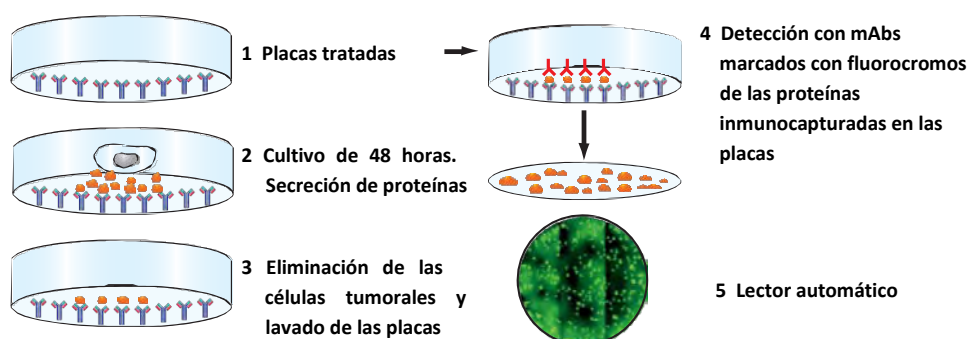
CEA = Antígeno carcinoembrionario; CK19 = Citoqueratina 19; CK20 = Citoqueratina 20; EGFR = Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano; HPV16- E6/E7 = Genes E6 y E7 del papilomavirus humano tipo 16; *K-ras* = Gen *K-ras*; MAGE-3 = Antígeno 3 asociado a melanoma; MUC1 = Mucina 1; MUC18 = Mucina 18; PSA = Antígeno específico de la próstata; PSM = Antígeno de membrana específico de la próstata; *TP53* = Gen *TP53*; β -hCG = Subunidad β de la gonadotropina coriónica humana.

3.3.3. Otras técnicas de aislamiento y detección

3.3.3.1. Inmunospot epitelial

El sistema Inmunospot epitelial (EPISPOT) es un método de detección funcional y consiste en la detección de proteínas, como MUC1, PSA o CKs, que son producidas y secretadas por las CTCs o DTCs en cultivo tras 48 horas. Antes de realizar el cultivo celular se emplea un enriquecimiento inmunomagnético negativo (marcación con CD45) y la muestra enriquecida se pone en contacto con placas de cultivo celulares tratadas, cuyas superficies presentan mAb específicos. Tras 48 horas de cultivo, las células son eliminadas y las placas de cultivo se lavan antes de ser marcadas con mAb conjugados con fluorocromos que reconocen las proteínas inmunocapturadas en las placas (Figura 11). Con este sistema solo se detectan células tumorales viables, y actualmente ha sido utilizado para detectar tanto CTCs como DTCs en pacientes con cáncer de mama y próstata [Alix-Panabières y cols., 2007].

Figura 11. Esquema del sistema EPISPOT: Placas tratadas con mAbs que se ponen en contacto con células tumorales aisladas de muestras clínicas de pacientes con cáncer. Tras 48 horas de cultivos las células secretan proteínas que quedan inmunocapturadas en la placa, tras retirar las células las placas son lavadas y marcadas con mAbs conjugados con fluorocromos [Alix-Panabières y cols., 2008].



3.3.3.2. Sistema FAST

La tecnología FAST emplea un escaneo láser fibro-óptico de matriz combinado con un sistema automatizado de microscopia fluorescente digital [Krivacic y cols., 2004]. Este sistema permite escanear unas 300.000 células por segundo con una alta sensibilidad y especificidad: el sistema FAST localiza las CTCs, las cuales son observadas a través del microscopio de fluorescencia y el sistema automatizado digital permite la captura de imágenes, posteriormente las CTCs son marcadas en Wright-Giemsa o Papanicolau, y se observan a través de un microscopio óptico [Marrinucci y cols., 2007; Marrinucci y cols., 2010].

Esta tecnología se ha empleado para detectar CTCs marcadas fluorescentemente y permite evaluar el pleomorfismo de las mismas, determinar el cociente núcleo/citoplasma y observar la cromatina [Marrinucci y cols., 2007; Marrinucci y cols., 2010; Marrinucci y cols., 2012]. Actualmente se ha empezado a utilizar esta metodología en la detección de CTCs de pacientes con tumores sólidos epiteliales [Marrinucci y cols., 2012; Cho y cols., 2012], donde se ha podido diferenciar CTCs individuales y agregados de estas células [Cho y cols., 2012].

3.3.3.3. Microchips

3.3.3.3.1. Microchip de aislamiento de células tumorales

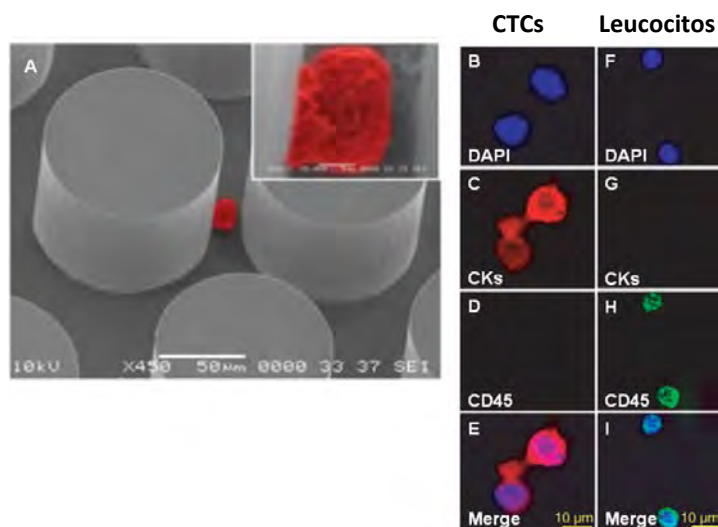
En 2007 un grupo de investigadores [Nagrath y cols., 2007] desarrolló un dispositivo que permitía el aislamiento, en un solo paso, de CTCs de sangre periférica sin procesar (sin un enriquecimiento celular previo). Este dispositivo es una cámara de silicio grabado con 78.000 micropostes que están recubiertos con el anticuerpo anti-EpCAM. A través de éste se hacen

pasar de 2 a 4 ml de sangre que fluye por todo el chip, la cinética del flujo ha sido optimizada de forma que el mayor número posible de CTCs entre en contacto con los micropostes recubiertos de anticuerpos. Las CTCs capturadas en los micropostes son visualizadas por la marcación con anticuerpos anti-CKs o por otros marcadores específicos. Con este sistema se consigue, tanto la enumeración de las CTCs, a través de la toma de imágenes del dispositivo completo usando un sistema de semiautomático; como realizar análisis moleculares de las CTCs aisladas (Figura 12).

El chip de CTCs permite un alto rendimiento en la captura de CTCs (media de 50 CTCs por mililitro) y de pureza (0,1%-50%) [Nagrath y cols., 2007]. El límite principal de esta técnica es el tiempo que debe transcurrir entre la extracción de sangre y el análisis, que debe ser de unas pocas horas. Aunque gracias a esto y a que no existe fijación, las células siguen siendo viables tras la captura.

Actualmente este ensayo es técnicamente difícil de realizar y no está estandarizado para conseguir un alto rendimiento, pero ofrece muchas posibilidades. Por ejemplo, esta metodología se ha empleado con éxito en pacientes con cáncer de pulmón [Maheswaran y cols., 2008], demostrando la posibilidad de realizar análisis moleculares en las CTCs y de monitorizar los cambios genéticos que pueden ocurrir durante el tratamiento. Además, han surgido varias modificaciones de este chip que mejoran la captura de CTCs, como es el “bosque de nanotubos” de carbono porosos [Chen y cols., 2011] o el chip microfluídico “nano-velcro” [Wang y cols., 2011a].

Figura 12. A. Imagen de microscopía electrónica de una célula tumoral capturada en el microchip de CTCs. La línea celular NCI-H1650 de cáncer de pulmón fue mezclada con sangre periférica de un voluntario sano, y se aisló con el dispositivo de microfluidos (coloreada en rojo). El cuadro superior de la derecha muestra una imagen ampliada de la célula tumoral. **B-I. Imágenes tomadas de CTCs capturadas (20x) y de células hematopoyéticas de un paciente con carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC),** marcadas con DAPI, CK y CD45. Las imágenes fusionadas de los paneles B-E (merge) muestran las CTCs, y las de los paneles F-I las células hematopoyéticas [Nagrath y cols., 2007].



3.3.3.3.2. Microchip ultrasónico de captura de CTC

En 2010 investigadores españoles [González y cols., 2010] presentaron un nuevo microchip que permitía la separación y clasificación de partículas en suspensión en un líquido. Este microchip incluye un microcanal por el cual la muestra (fluido), que contiene las partículas en suspensión diana, fluye en paralelo con otro líquido.

El principio de funcionamiento de este sistema se basa en el uso de ultrasonidos en la sección transversal del chip e incluye un nódulo de presión,

que está estratégicamente colocado en la parte del colector de fluídos, de forma que las partículas diana quedan retenidas en él. Con este chip se ha conseguido una alta eficiencia (95%) en la separación de partículas, a diferentes concentraciones y tasas de flujo, lo que demuestra la viabilidad del microchip para realizar la separación de partículas en suspensión en un líquido. Actualmente esta metodología no se ha empleado en muestras clínicas.

3.3.3.4. Nanopartículas

En 2011 investigadores americanos [Wang y cols., 2011b] desarrollaron una nueva metodología que emplea la espectroscopia resonante superficial Raman amplificada, para cuantificar la presencia de CTCs en sangre. Este sistema emplea nanopartículas de oro recubiertas de un polímero conjugado con una proteína de bajo peso molecular, que en este caso es el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el cual se une a las CTCs. El uso de esta metodología en muestras clínicas, 19 pacientes con cáncer de cabeza y cuello, ha demostrado tener éxito, obteniendo un rango de detección de 1 a 720 CTCs por mililitro de sangre.

Actualmente existen variaciones de esta metodología, como la que emplea Pallaoro y cols. (2011) que usan dos sets de nanopartículas de plata, uno funcionalizado con el péptido RPARPAR, que se une al receptor de la neuropilina-1 expresado en las células tumorales; y el otro, que actúa como control positivo, funcionalizado con un péptido derivado de la proteína TAT del HIV, el cuál se une tanto a células tumorales como a células normales. Actualmente estos investigadores solo han realizado ensayos *in vitro* con líneas celulares epiteliales, tumorales y no tumorales inmortalizadas, y han comprobado que tras la marcación con ambos sets de nanopartículas de

plata se pueden distinguir las células tumorales de las normales con una eficiencia bastante alta.

3.3.3.5. Sistema de filtración y eliminación de CTCs

En 2011 investigadores americanos [Scarberry y cols., 2011] desarrollaron un sistema de filtración y eliminación de CTCs de líquido peritoneal. Estos investigadores emplean nanopartículas magnéticas funcionalizadas con ligandos, péptidos miméticos al efrina-A1 selectivos para el EphA2R, que se unen a receptores específicos en las células malignas. Este ensayo fue realizado en un modelo murino de cáncer de ovario en el cual tras extraer por paracentesis el líquido peritoneal, éste se mezcla con las nanopartículas magnéticas. Una vez realizada la marcación de las células tumorales, se realiza una filtración magnética y la muestra resultante es reintroducida intraperitonealmente en los sujetos de estudio. Así se obtuvo una reducción en el título de células tumorales, lo que prolongó significativamente la aparición de metástasis. Además, este grupo de investigación ha comprobado como es posible eliminar células tumorales en el líquido peritoneal de pacientes con cáncer de ovario, y sugieren que esta metodología podría aplicarse en tumores como las leucemias.

4. Tipos de muestra

La elección de la técnica de detección apropiada depende del tipo de tejido o muestra que va a ser analizado y del origen histológico del tumor estudiado.

3.4.1. Nódulos linfáticos

A la hora de estudiar los nódulos linfáticos, se realiza una linfadenectomía, que dependerá de la localización del tumor. Tras esta cirugía, se analizan los nódulos linfáticos a través de la realización de cortes seriados, lo que incrementa la posibilidad de detectar células tumorales [Pargaonkar y cols., 2003; Liu y cols., 2000]. La detección de células tumorales se puede realizar por técnicas histopatológicas convencionales, IHC o técnicas moleculares. No obstante, este procedimiento consume mucho tiempo por lo que no se realiza de forma rutinaria [Zehentner, 2002].

Las técnicas IHC que emplean mAb anti-CKs, en la detección de células tumorales o micrometástasis, tienen más sensibilidad que las técnicas histopatológicas convencionales [Passlick y Pantel, 2000; Péley y cols., 2001; Noguchi, 2001]. Sin embargo, hay que tener en consideración que en los nódulos linfáticos hay células no tumorales que expresan CKs, originando falsos positivos, y se debe realizar la valoración morfológica de las células que son detectadas como positivas para un correcto diagnóstico.

En cáncer de mama [Péley y cols., 2001; Takei y cols., 2007] y melanoma [Landi y cols., 2000; Roberts y Cochran, 2004], se emplea una técnica de cartografía de varios nódulos linfáticos de drenaje del tumor, que se denominan técnica del SLN. El SLN son nódulos linfáticos de drenaje de una zona determinada, donde es más probable la detección de células

tumorales, e incluso pueden ser los únicos ganglios afectados [Cabanas, 1977; Tanis y cols., 2001a]. La biopsia y estudio de los SLN puede ser un procedimiento útil en la evaluación de la enfermedad, por ser un método poco agresivo sobre todo si se compara con la disección completa de los nódulos linfáticos [Choi y cols., 2003; Doubrovsky y cols., 2004; Harish, 2005]. Actualmente no existe un consenso general que indique que esta técnica es útil en otros tipos de patologías tumorales, pero existen diferentes estudios que señalan la posibilidad de su uso, a la hora de evaluar la diseminación tumoral, en pacientes con: cáncer de colon [Saha y cols., 2004; Bilchik y cols., 2006; Stojadinovic y cols., 2007a; Nordgård y cols., 2009a]; cáncer gastrointestinal [Ajisaka y Miwa, 2003]; cáncer de cuello y de cabeza [Payoux y cols., 2005]; cáncer oral y orofaríngeo [Nieuwenhuis y cols., 2005].

Las técnicas moleculares, sobre todo la RT-PCR y la qRT-PCR, se han usado con éxito y poseen una alta sensibilidad en la detección de células tumorales en nódulos linfáticos y SLN [Denninghoff y cols., 2004; Giese y cols., 2005; Nordgård y cols., 2009b]. Los marcadores que se emplean varían según el tumor estudiado (Tabla 2).

El inconveniente general que tienen las técnicas de evaluación de los ganglios linfáticos y el SLN, es que los análisis se realizan tras la operación y tardan aproximadamente una semana en obtenerse los resultados. De forma que sería necesario volver a someter al paciente a una cirugía de eliminación de los nódulos linfáticos si los resultados son positivos (nódulos linfáticos o SLN con presencia de células tumorales). Algunos estudios realizados en pacientes con cáncer de mama y melanoma, emplean análisis intraoperatorios del SLN por técnicas histopatológicas, para intentar evitar a los pacientes una segunda intervención quirúrgica, pero la sensibilidad de estos métodos no es muy alta [Tanis y cols., 2001b; Funasako y cols., 2010].

Tabla 2. Marcadores moleculares de detección de DTCs en nódulos linfáticos
[Tímár y cols., 2002].

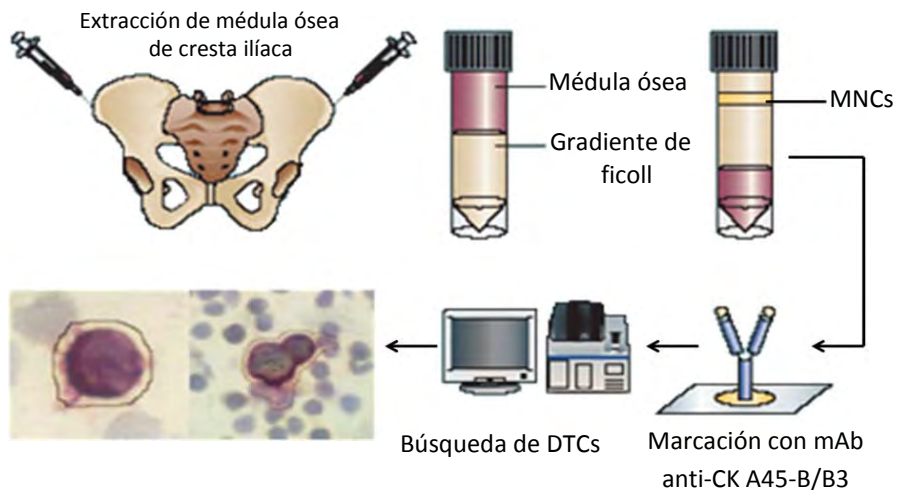
Tumor Primario	Marcador molecular mRNA/DNA
Cáncer de mama	<i>CK19, CK20, MUC1, β-hCG, CEA, MGB1</i>
Cáncer colorrectal	<i>CK19, CK20, CEA, β-hCG, HGFR, TP53, K-ras, MGB2, MUC2, MMP7</i>
Cáncer gástrico	<i>CK19, CEA, MGB2</i>
Cáncer de pulmón	<i>MUC1, TP53, K-ras</i>
Melanoma	<i>Tirosinasa, MAGE-3, MART1</i>
Cáncer de cabeza y cuello	<i>SCC, TP53</i>
Cáncer del tracto biliar	<i>MGB2, CEA</i>
Cáncer cervical	<i>CK19, HPV, HPV18-E6, HPV16-E6/E7</i>
Cáncer de próstata	<i>PSA, PSM, hK2</i>
Cáncer de páncreas	<i>K-ras</i>
Cáncer esofágico	<i>CEA, MGB2</i>

Como se ha comentado anteriormente (*Tratamiento y progresión del cáncer de mama y colorrectal*), en el año 2000 se empieza a emplear la técnica OSNA, para el análisis intraoperatorio del SLN, cuya utilidad clínica se ha comprobado inicialmente en pacientes con cáncer de mama, pero está obteniendo buenos resultados en otros tipos de tumores como el cáncer colorrectal. En cáncer de mama, también se emplea el ensayo de evaluación intraoperatorio, por PCR en tiempo real (qRT-PCR), de nódulos linfáticos de Veridex LLC (BLN assay), el cual está obteniendo resultados similares al OSNA [Tanis y cols., 2001b].

3.4.2. Médula ósea

La aparición de metástasis en médula ósea es habitual en tumores de origen epitelial, y éstas suelen permanecer ocultas, ya que no son detectadas por los métodos diagnósticos habituales. Las muestras de médula ósea se pueden obtener por aspiraciones, durante la cirugía, y ser evaluadas por ICC [Naume y cols., 2001; Braun y cols., 2001a; Braun y cols., 2001b; Steinert y cols., 2008] (Figura 13) o por técnicas moleculares [Dieterle y cols., 2004; Sienel y cols., 2007; Beiske y cols., 2009].

Figura 13. Detección por ICC de DTCs en médula ósea [Pantel y Barkenhoff, 2004]. El proceso se inicia con la utilización de un gradiente de ficoll para aislar las células mononucleares (MNCs), en esta fracción celular aparecen las células tumorales. Se emplean anticuerpos monoclonales (mAbs) frente a las CKs para identificar a las células epiteliales tumorales metastásicas, la mayor parte de investigadores emplean combinaciones de mAbs que reconocen varias CKs o un mAb de amplio espectro que reconoce un epítipo específico común en la mayoría de las CKs. Esto se debe a que la expresión de las CKs se puede ver disminuida en tumores epiteliales como el cáncer de mama. El proceso de búsqueda de DTCs en las muestras citológicas se puede automatizar con los nuevos sistemas de análisis de imagen. Las dos imágenes de la figura (a la izquierda una célula aislada y a la derecha un cluster de dos células) son un ejemplo representativo de tres células que son marcadas con el mAB anti-CK A45-B/B3. Las células de médula ósea que rodean a las DTCs aparecen sin marcar, excepto por una marcación ligera nuclear debido a la contratinción de DNA que se emplea, lo que permite la cuantificación de todas las células de los portaobjetos. Se están desarrollando diferentes procedimientos para el enriquecimiento de células tumorales, utilizando varios gradientes de densidad y partículas magnéticas combinadas con mAbs, para mejorar la detección de las DTCs. Actualmente no está claro si estos nuevos procedimientos proporcionan más información que la obtenida por el procedimiento estándar de gradiente de densidad utilizado para aislar MNCs [Wiedswang y cols., 2003]. Imagen de las DTCs del trabajo de Pantel y cols. (2003).



Sin embargo, existe una gran diferencia en los resultados obtenidos por diferentes grupos. Estas diferencias se deben principalmente a la variedad de anticuerpos utilizados, para la detección de células tumorales, y las diferentes metodologías empleadas [Borgen y *cols.*, 2006]. Por lo tanto, es fundamental estandarizar un método, que permita comparar los resultados entre los diferentes grupos, y realizar estudios multicéntricos.

La sensibilidad de detección de DTCs en médula ósea por técnicas moleculares es mayor que la de la ICC [Pantel y *cols.*, 2003; Vogelaar y *cols.*, 2010]. Pero estas son técnicas menos específicas, que presentan falsos positivos y negativos, y la carencia de la existencia de marcadores tumorales específicos limita su aplicación.

El análisis de médula ósea y su implantación en la clínica, implica ciertos problemas, posiblemente el de mayor envergadura sea el que la obtención de médula ósea es un proceso doloroso para el paciente, que requiere personal cualificado y ciertas condiciones que impiden su implantación como técnica ambulatoria de rutina. Por este motivo, en los

últimos años muchos estudios se han centrado en la detección de CTCs, en sangre venosa periférica, de pacientes con tumores sólidos.

3.4.3. Sangre

La principal ventaja de utilizar este tipo de muestra para la detección de CTCs, es que la extracción de sangre periférica es un procedimiento habitual y en ella se realizan la mayoría de las determinaciones analíticas, tanto en clínica hospitalaria como ambulatoria. Además, es un proceso poco invasivo, no doloroso, se pueden obtener muestras de sangre cuantas veces sea necesario, y no requiere de un personal muy cualificado ni de otros requerimientos especiales, lo que la hace ideal para el seguimiento de la enfermedad.

El estudio de la presencia de CTCs en sangre se ha abordado desde distintos puntos de vista. Se ha utilizado para ello diferentes tipos de muestras: desde sangre periférica [Koch y cols., 2005; Chen y cols., 2005], a suero o incluso plasma [Chen y cols., 2000; Shaw y cols., 2000]. Las técnicas de detección empleadas también varían, una de las más usadas es la RT-PCR que se ha utilizado para demostrar la presencia de CTCs, y para predecir una posible recaída de la enfermedad [Zehentner, 2002; Ring y cols., 2004; Mostert y cols., 2009]. En el caso de la utilización de técnicas inmunológicas, éstas permiten, además, la identificación directa de las CTCs [Gaforio y cols., 2003; Cristofanilli y cols., 2004], y por lo tanto, completar el estudio con análisis morfológicos; fenotípicos; e incluso, genotípicos de las mismas [Fehm y cols., 2002; Meng y cols., 2004a; Wind y cols., 2009; Campos y cols., 2008; Swennenhuis y cols., 2009].

La detección de CTCs puede verse afectada por el momento en que se realice la extracción de la muestra sanguínea, por ejemplo: el tratamiento

quimioterápico afecta a la presencia de CTCs en la sangre [Camara y cols., 2007; de Bono y cols., 2008; Pachmann y cols., 2008]; el tratamiento hormonal puede generar una regulación baja de la expresión del marcador tumoral de interés, por ejemplo: los antiandrógenos interfieren en la expresión de PSA [Sauter y cols., 1998; Sauter y cols., 2002]. Por tanto, un estudio completo debería incluir extracciones secuenciales que definan el número de CTCs antes, durante y al final de la terapia, de forma que nos determinen con más exactitud tanto el vertido tumoral a sangre, el cual que se piensa que ocurre intermitentemente y desde estadios tempranos de la enfermedad [Weitz y cols., 1998; Gaforio y cols., 2003; Meng y cols., 2004b], como la eficacia de la terapia administrada [Köstler y cols., 2004a; Köstler y cols., 2004b; Mazouni y cols., 2007; Camara y cols., 2007; de Bono y cols., 2008; Pachmann y cols., 2008; Cohen y cols., 2008; Pachmann y cols., 2011]. Actualmente no se conoce si existe una extracción, que realizada en un determinado momento de la evolución de la enfermedad, nos de la mayor información posible sobre ésta.

La pérdida de especificidad en el ensayo puede ocurrir por la pequeña proporción que existe de CTCs comparadas con la cantidad de células hematopoyéticas presentes (aproximadamente 1 célula tumoral entre 10^6 - 10^7 células nucleares) o por la variación en la expresión del marcador utilizado en el estudio [Fehm y cols., 2002; Antolovic y cols., 2010; Willipinski-Stapelfeldt y cols., 2005; Paterlini-Brechot y Benali, 2007; Rao y cols., 2005; Effenberger y cols., 2011; Mikolajczyk y cols., 2011]. Así pues, tanto la técnica escogida como el marcador utilizado para la detección son cruciales para obtener la mayor sensibilidad y especificidad posible [Ko y cols., 2000; Silva y cols., 2001; Vlems y cols., 2002; Schuster y cols., 2004].

Los marcadores moleculares empleados varían dependiendo del tipo de tumor estudiado, y pueden ser: CEA, CK20, EGFR y mucinas, en cáncer del tracto gastrointestinal y de vejiga [Soeth y cols., 1997; Hardingham y cols., 2000; Gazzaniga y cols., 2001; Retz y cols., 2001; Tsouma y cols., 2010]; PSA en cáncer de la próstata [Ross y cols., 2005; Chen y cols., 2005]; tirosinasa, p97 y MelanA/MART1 en melanoma [Kunter y cols., 1996; Gogas y cols., 2002; Palmieri y cols., 2003]; péptido liberador de gastrina, SCG3 y marcadores de muerte celular (neopéptidos de CK18 escindidos por caspasas y DNA nucleosomal), en cáncer de pulmón [Lacroix y cols., 2001; Saito y cols., 2003; Moss y cols., 2009; Hou y cols., 2009]; y CK19, CEA, HER2 y MUC1 en cáncer de mama [Zach y cols., 1999; de Cremoux y cols., 2000; Felton y cols., 2004; Ignatiadis y cols., 2008; Chen y cols., 2010].

Los marcadores inmunológicos utilizados no varían tanto, basándose más en marcadores específicos de tejido, como son los marcadores de subtipos histológicos, que en marcadores asociados al tumor, aunque estos últimos también se han empleado, por ejemplo la detección de CTC que expresan HER2 (CTC HER2+) [Stojadinovic y cols., 2007b; Fehm y cols., 2010; Ignatiadis y cols., 2011]. Los marcadores inmunológicos más utilizados son: CKs 8/18/19 [Cristofanilli y cols., 2004; Cristofanilli y cols., 2005; Cohen y cols., 2008; Wind y cols., 2009; Swennenhuis y cols., 2009]; y CKs 7/8 [Molnar y cols., 2001; Fehm y cols., 2002; Gaforio y cols., 2003].

Previo a la detección de las CTCs, la mayoría de los grupos de investigación realizan un enriquecimiento de la muestra. Como se ha indicado antes, los procedimientos utilizados son la centrifugación en gradiente de densidad [Fehm y cols., 2002; Gaforio y cols., 2003], la lisis de eritrocitos [Rolle y cols., 2005; Camara y cols., 2006; Yang y cols., 2009],

filtración [Vona y cols., 2000; Kahn y cols., 2004] y el enriquecimiento inmunomagnético [Molnar y cols., 2001; Fehm y cols., 2002; Gaforio y cols., 2003; Cristofanilli y cols., 2004; Ulmer y cols., 2004; Cohen y cols., 2008; Swennenhuis y cols., 2009]. No obstante, hay que tener presente que la utilización de estos y otros procedimientos implica la posibilidad de cierta pérdida de células tumorales durante el procesamiento de la muestras. Así, las variaciones en los rangos de detección de los distintos grupos se deben, entre otras cosas, a las distintas técnicas utilizadas en cada laboratorio. A pesar de ello, podemos considerar que los protocolos de enriquecimiento celular son recomendables y pueden aumentar la sensibilidad de la detección de CTCs en sangre periférica [Guo y cols., 2004].

El procedimiento de enriquecimiento celular de la muestra más utilizado es el aislamiento celular por inmunoselección. En el caso de la selección positiva, hay que tener en cuenta la heterogeneidad de cada tumor, ya que cada tipo expresa no sólo diferentes antígenos epiteliales específicos, sino también diferentes niveles de expresión de estos antígenos. Por consiguiente, las células tumorales pueden escapar a esta selección [Fehm y cols., 2002; Willipinski-Stapelfeldt y cols., 2005; Rao y cols., 2005; Antolovic y cols., 2010; Effenberger y cols., 2011; Mikolajczyk y cols., 2011; Paterlini-Brechot y Benali, 2007], y para demostrar el enriquecimiento exitoso sería necesario analizar las porciones celulares no capturadas. El método de selección negativa posibilita el uso de muestras más grandes y puede mejorar la sensibilidad de la técnica [Naume y cols., 1998]. Sin embargo, los protocolos disponibles no erradican completamente la presencia de células hematopoyéticas, pudiendo quedar atrapadas las células tumorales entre éstas y pasando de esta forma inadvertidas. También es posible realizar la combinación de ambos métodos de selección, positiva y negativa, para mejorar los resultados obtenidos [Guo y cols., 2004].

3.4.4. Otros tipos de muestra

La detección de células tumorales en otros tejidos diferentes a nódulos linfáticos, médula ósea y sangre, puede proporcionar una valiosa información sobre el pronóstico de la enfermedad en ciertos tipos de tumores.

Por ejemplo, la detección de células tumorales en lavados peritoneales de pacientes con cáncer de páncreas o colon, por ICC, ha demostrado tener valor pronóstico [Vogel y cols., 2002; Hoffmann y cols., 2007]. En el cáncer de pulmón se usan nuevas técnicas moleculares para descubrir células tumorales en el esputo [Palmisano y cols., 2000; Belinsky y cols., 2005]. En el caso de cáncer urotelial, se están utilizando multisondas (marcación de varios genes con distintos fluorocromos) para el análisis citogenético por FISH, obteniendo una gran sensibilidad y especificidad en la detección de células tumorales en la orina y en lavados de vejiga [Bubendorf y cols., 2001; Bergman y cols., 2008]. También se utilizan técnicas moleculares para la detección de mutaciones de DNA en muestras de heces de pacientes con cáncer colorrectal [Dong y cols., 2001; Calistri y cols., 2003]. En el caso de pacientes con tumores de mama, se usan aspirados del pezón o fluidos de lavados ductales, para la detección de marcadores moleculares que puedan predecir la presencia de la enfermedad [Sauter y cols., 2002; Sauter y cols., 2007], o metilaciones del DNA [Lee y cols., 2004; Fackler y cols., 2006].

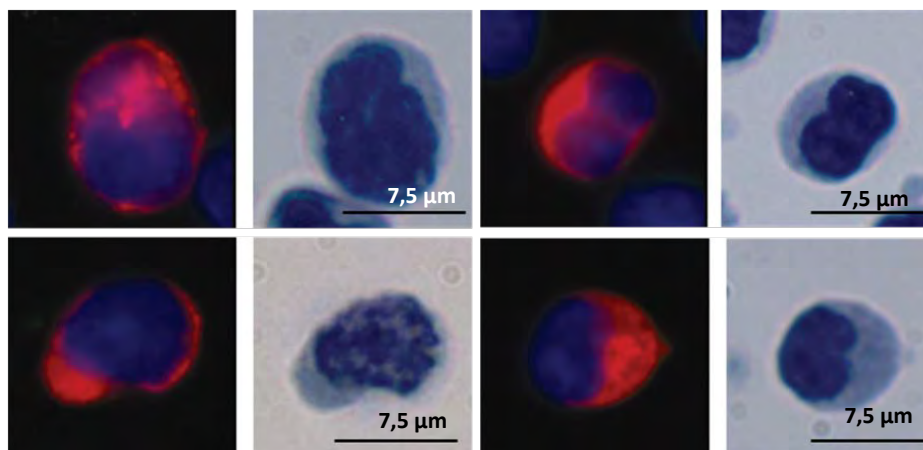
5. Características biológicas de las CTCs y las DTCs

La caracterización de las CTCs y las DTCs tiene dos objetivos básicos: primero, indicar su origen tumoral, y segundo, identificar otras características celulares que puedan ser utilizadas a la hora de emplear terapias dirigidas o individualizadas.

3.5.1. Características morfológicas

La morfología característica de las CTCs y las DTCs es de células típicamente tumorales, es decir, células de un tamaño mediano-grande y nucleadas, con un gran ratio núcleo/citoplasma y núcleo, generalmente, granulado. Aunque suelen ser células pleomórficas (Figura 14) [Marrinucci y cols., 2007; Marrinucci y cols., 2010].

Figura 14. Pleomorfismo de las CTCs detectadas en sangre periférica de pacientes con cáncer colorrectal metastásico, utilizando: fluorescencia y marcación Papanicolau [Marrinucci y cols., 2010]. Tipos representativos de CTCs identificadas en los pacientes. Izquierda: Marcación fluorescente de las CTCs; Rojo: Alexa 555-CK, y Azul: DAPI. Derecha: Marcación Papanicolau de las correspondientes CTCs.



3.5.2. Características fenotípicas

La característica fenotípica principal de las CTCs y las DTCs de tumores de origen epitelial es la expresión de marcadores epiteliales, como son las CKs y la EpCAM.

Hay que tener en cuenta que tanto las CTCs como las DTCs han atravesado la EMT, en el caso de las DTCs también el proceso inverso (MET), por lo que estas células tumorales varían la expresión de las CKs y la EpCAM, e incluso llegan a no expresarlas [Pantel y cols., 1994; Thiery, 2002; Fehm y cols., 2002; Willipinski-Stapelfeldt y cols., 2005; Rao y cols., 2005; Paterlini-Brechot y Benali, 2007; Antolovic y cols., 2010; Effenberger y cols., 2011; Mikolajczyk y cols., 2011].

Otras características fenotípicas (Tabla 3) de las CTCs y las DTCs son:

1. Expresión de HER2, la cual se puede emplear para: una mejor clasificación de los pacientes, como en los estudios de Braun y cols. (2001c), Schindlbeck y cols. (2005) y Wülfing y cols. (2006), donde se observa que la expresión de HER2 en las CTCs y DTCs (células CK+) se correlaciona con una menor supervivencia y tiempo libre de enfermedad en pacientes con cáncer de mama; la evaluación de la respuesta frente a tratamientos específicos [Ignatiadis y cols., 2011; Solomayer y cols., 2006; Krawczyk y cols., 2009]; e incluso para estudiar la biología de la progresión tumoral [Solomayer y cols., 2006; Wülfing y cols., 2006]. En algunos de estos estudios se observa como la expresión de HER2 aparece en las DTCs y CTCs (células CK+ o EpCAM+ o MUC1+) de pacientes con tumores primarios de mama HER2 negativos [Becker y cols., 2005; Solomayer y cols., 2006; Fehm y cols., 2007; Pestrin y cols., 2009; Tewes y cols., 2009; Krawczyk y cols., 2009; Fehm y cols., 2010;

Somlo y cols., 2011]. Por ejemplo, Fhem y cols. (2010), evaluaron la expresión de HER2 en las CTCs aisladas de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama metastásico, utilizando el ensayo CellSearch (células EpCAM+) y el AdnaTest BreastCancer (células EpCAM+ y MUC1+), y lo compararon con la expresión de esta proteína en el tumor primario. Sus resultados mostraron que, considerando solamente los pacientes que eran CTCs+ en ambos test [62 (50% CellSearch y 39% AdnaTest BreastCancer)], el 50% (31/62) presentaban CTCs HER2+ (41% CellSearch y 47% AdnaTest BreastCancer), además, la detección de CTCs HER2+ aparecía también en pacientes cuyo tumor primario era HER2-. Los resultados de varios estudios indican que la expresión de HER2 aparece durante la progresión tumoral y, además se debe tener en cuenta la expresión de ésta proteína en las CTCs y las DTCs para poder administrar tratamientos frente al HER2.

2. Expresión de EGFR, la cual se puede emplear para definir tratamientos más específicos y evaluar la respuesta frente a estos [Schlimok y Riethmüller, 1990; Liu y cols., 2010; Punnoose y cols., 2010]. Liu y cols. (2010), presentaron el caso de una mujer con cáncer de mama metastásico (ER-, RP-, HER2+ y EGFR+ solo en el 2% del tumor) a la cual, tras varios tratamientos de quimioterapia, se le realiza una extracción de 20 ml de sangre periférica para la detección de CTCs. Se detectaron 28 CTCs (células CK+) de las cuales 24 expresaban EGFR (80%), por lo que se inició un tratamiento con capecitabina y lapatinib y se monitorizaron las CTCs en sangre durante el mismo, obteniendo: en las primeras semanas una disminución de 8 veces en el número de las CTCs aisladas, además de una disminución del 50% del tumor; tras nueve semanas de tratamiento, la desaparición de las CTCs (no se detectaron) y se produjo una reducción de las lesiones del 80%; tras 18 semanas de tratamiento un aumento del marcador CA 15.3 y la detección de 2 CTCs EGFR-, este resultado se

mantuvo tras 30 y 42 semanas de tratamiento. La conclusión a la que llegaron estos autores es que, este caso demuestra como es posible utilizar la detección y fenotipación de CTCs para definir los tratamientos opcionales que pueden emplearse de forma personalizada en los pacientes.

3. Variación de la expresión del ER, la cual se puede emplear para una mejor clasificación de los pacientes y la evaluación de la respuesta frente a tratamientos específicos, e incluso para estudiar la biología de la progresión tumoral [Fehm y cols., 2008; Aktas y cols., 2011; Somlo y cols., 2011]. En el estudio de Fehm y cols. (2008), se observa como la expresión del ER α , detectada por IF, desaparece en las DTCs (células CK+) [42% (107) de los pacientes presentaba DTCs; la evaluación de la expresión de ER α en estas células fue: 88% ER α -; 12% ER α +; y 26% expresión heterogénea de ER α], aisladas de pacientes con cáncer de mama de tumores primarios ER α + (82% tumores primarios ER α +; concordancia entre la expresión de ER α en el tumor primario y las DTCs del 28%). Lo que podría explicar la pérdida de efectividad del tratamiento hormonal en estos pacientes.
4. Expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHCI), la cual se puede emplear para estudiar la evolución de la enfermedad y la biología de la progresión tumoral [Pantel y cols., 1991; Zia y cols., 2001]. Zia y cols. (2001) evaluaron la expresión del HLA I (antígeno leucocitario humano clase I) en las DTCs (células CK+) aisladas en aisparados de médula ósea de 30 pacientes con cáncer de mama en estadio M0. Sus resultados mostraron que 16 pacientes (53,3%) presentaban expresión de HLA I, mientras que 6 (20%) presentaban una pérdida parcial de éste. Además, las DTCs que se detectaron con pérdida parcial o total del HLA I

derivaban de pacientes cuyo tumor primario era pobremente diferenciado y su presencia se asoció a una supervivencia menor de la población.

5. Carencia de expresión de Ki67, tanto en DTCs como CTCs, lo cual indica que la mayor parte de estas células tumorales se encuentran en fase G0 (estado de dormancia). El estudio de la expresión de ésta proteína en las CTCs y las DTCs se puede emplear para evaluar la respuesta a los tratamientos quimioterápicos [Pantel y cols., 1993a; Müller y cols., 2005]. En el estudio de Müller y cols. (2005), se analizaron 47 (23 pacientes M0 y 24 pacientes M1) muestras de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama, antes y después de haber recibido terapia sistémica, para detectar las CTCs (células CK+) y analizar la expresión de Ki67 en éstas. Sus resultados mostraron que 9 de los 47 pacientes (1 paciente M0 y 8 pacientes M1) presentaban CTCs y ninguna de estas células tumorales expresaba el marcador Ki67, lo que indica que la proliferación de las CTCs es un evento raro e independiente del tratamiento o del estado de la enfermedad.
6. Expresión del marcador de apoptosis M30, el cual se puede emplear para evaluar la respuesta de los pacientes a la terapia administrada [Larson y cols., 2004; Fehm y cols., 2006; Swennenhuis y cols., 2009]. Fehm y cols. (2006), analizaron 157 aspirados de médula ósea de pacientes con cáncer de mama para detectar DTCs apoptóticas. Sus resultados mostraron que el 26% (36/157) de los pacientes presentaban DTCs (células CK+) M30+ o apoptóticas, de los cuales 17 solo poseían DTCs apoptóticas y 19 presentaban tanto DTCs apoptóticas como no apoptóticas. Debido a que no se detectaron DTCs apoptóticas en los pacientes que presentaban progresión de la enfermedad, y a que sí se detectaron en el 14% de los pacientes con remisión parcial o completa vs.

el 4% de los pacientes con enfermedad estable, estos autores concluyeron que la presencia de DTCs apoptóticas reflejaba la respuesta a la terapia. Además, un subgrupo de pacientes con enfermedad estable y remisión parcial o completa, presentaban tanto DTCs apoptóticas como no apoptóticas, lo que mostraba una respuesta heterogenea a la terapia.

7. Expresión de p53 mutada en DTCs, la cual se puede emplear para estudiar la progresión tumoral y como diana terapéutica [Offner y cols., 1999]. Offner y cols. (1999) analizaron los aspirados de médula ósea de 114 pacientes con tumores sólidos epiteliales (cáncer de pulmón, colorrectal, mama, estómago, páncreas, tracto urogenital y de origen desconocido), para detectar DTCs y estudiar en éstas la expresión de la proteína p53 mutada por ICC. Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que 46 de los pacientes (40%) presentaban DTCs en médula ósea y solo 4 pacientes [3,5% de los 114 pacientes; o el 8,7% de los pacientes con DTC (4/46)] presentaban la proteína mutada con heterogeneidad de la marcación. Además, en este estudio se comprobó que la expresión de p53 mutada en el tumor primario de 47 pacientes con cáncer de pulmón (46,8%, 22/47 p53+), se correlacionaba con la presencia de células tumorales en nódulos linfáticos pero no en médula ósea. Por lo que los autores postularon que la mutación de p53 no es un evento necesario para la diseminación hematógena pero parece favorecer la diseminación en el cáncer de pulmón.
8. Expresión de EMMPRIN, la cual se puede emplear para estudiar la evolución de la enfermedad y la biología de la progresión tumoral [Reimers y cols., 2004; Buergy y cols., 2009]. Reimers y cols. (2004), evaluaron la expresión de EMMPRIN en las DTCs (células CK+) aisladas de 31 pacientes con cáncer de mama M0, sus resultados mostraron como

esta proteína era altamente expresada por las DTCs independientemente de su expresión en el tumor primario [35,0% de las muestras de médula ósea eran CK+ (11 muestras de las 31 analizadas (11/31). En las que se encontraron 38 células CK+]; 89,0% de las células CK+ (34/38) expresaban EMMPRIN. Como control positivo de este estudio, se evaluó la expresión de EMMPRIN en 1 paciente M1 en el que se detectaron 190 DTCs, de las cuales 169 expresaban EMMPRIN (89,0%). En este trabajo un bajo porcentaje células mononucleares expresaba EMMPRIN.

9. Expresión del receptor del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPAR), el cual se puede emplear para estudiar la evolución de la enfermedad [Allgayer y cols., 1997; Heiss y cols., 2002; Thomas y cols., 2009]. Heiss y cols. (2002), observaron que aquellos pacientes con cáncer próstata que presentaban DTCs (células CK+; 97/157 pacientes) con expresión de uPAR (51,92%; 81/156 pacientes) mostraban una menor supervivencia y un menor tiempo libre de enfermedad, indicando que este marcador podría ser un factor pronóstico independiente. Además la expresión de uPAR en las DTCs se correlacionaba con el estadio tumoral y la expresión de uPAR y PAI-1 en el tumor primario.

10. Fenotipo CD44⁺/CD24^{-bajo}. El trabajo de Al-Hajj y cols. (2003), sugiere que solamente un tipo de células tumorales, CSC o células iniciadoras del cáncer, son las que poseen capacidad tumorigénica. En cáncer de mama estas células se identifican con el fenotipo CD44⁺/CD24^{-bajo}, y solamente 100 de éstas células, extraídas de pacientes, son capaces de generar el tumor en ratones inmunocomprometidos generando células tumorales de diferentes líneas. Estas CSC representan una población baja (10-20%) en el tumor primario [Abraham y cols., 2005]. Debido a que estas células son las

iniciadores del cáncer, sería necesario desarrollar terapias específicas que afecten a esta subpoblación celular. Balic y cols. (2006) analizaron el porcentaje de células con fenotipo $CD44^{+}/CD24^{-/bajo}$ que se podían detectar en aspirados medulares de pacientes con cáncer de mama en estadio M0, en los que se había detectado previamente la existencia de DTCs (células CK+). Sus resultados mostraron que éste fenotipo de células madre putativas se podía encontrar en todas las muestras con células CK+. La prevalencia media de estas células con fenotipo $CD44^{+}/CD24^{-/bajo}$ fue del 72% y del 65% (33%-100%) entre las DTCs totales por paciente. Este trabajo, es la primera evidencia de la existencia de una subpoblación de células con fenotipo de células madre/progenitoras putativas dentro de las DTCs detectadas en médula ósea. Debido a que estos autores encontraron este fenotipo celular en todos los pacientes en los que se detectaron células CK+, sus resultados sugieren que la mayoría de los pacientes que presentan DTCs en médula ósea pueden tener un riesgo de por vida para presentar la recaída de la enfermedad. Actualmente hace falta asociar la presencia de estas células con fenotipo de células madre/progenitoras putativas con los factores clínicos de riesgo aceptados, el tiempo libre de progresión y la supervivencia global de la población. La detección de esta subpoblación celular, en pacientes sometidos a cirugía del tumor primario en estadios tempranos de la enfermedad, podría explicar los fallos que se producen al aplicar la quimioterapia adyuvante. Alix-Panabières y cols. (2007) detectaron células con fenotipo de células madre putativas $CK19^{+}/MUC1^{-}$, siendo éste otro fenotipo que se le ha asociado a las CSCs (células $ESA^{+}/MUC1^{-}$, las cuales pueden expresar posteriormente CK19) [Gudjonsson y cols., 2002], en médula ósea de pacientes con cáncer de mama y próstata. Sus resultados mostraron que el número de DTCs detectadas era inferior en los pacientes

M0 que en los pacientes M1, pero que la mayoría de las DTCs detectadas en los pacientes M0 tenían un fenotipo CK19+/MUC1-. Estos resultados, junto con otros de este mismo grupo de investigación, demuestran que las DTCs en pacientes con cáncer de mama y próstata son viables y heterogéneas, en cuanto a la secreción de proteínas, y hace falta una caracterización más profunda de las células CK19+/MUC1- para identificar a las células madre putativas.

11. Expresión de marcadores de la EMT. En el trabajo de Aktas y cols. (2009) se realizó la monitorización del número de CTCs a 39 pacientes con cáncer de mama metastásico durante el tratamiento (quimioterapia, hormonoterapia o con anticuerpos), y los pacientes fueron divididos según su respuesta a éste. En este trabajo se analizaron 226 muestras de sangre para la detección de CTCs con el sistema Adna Test Breast Cancer (enriquecimiento inmunomagnético con los mAbs anti-EpCAM y anti-MUC1), tras este enriquecimiento se analizaron las muestras para los transcritos de EpCAM, MUC1 y HER2; marcadores de EMT: Twist1, Akt2 y PI3K α ; y el marcador de células madre ALDH1. Los resultados de este estudio mostraron que: el 31% (69/226) de las muestras eran positivas para la detección de CTCs; en el grupo de muestras CTCs+ el 62% eran positivas para la detección de al menos uno de los marcadores de la EMT y el 69% eran positivas para ALDH1; en el grupo de muestras CTCs- los porcentajes fueron 7% y 14%, respectivamente. Por lo que una proporción elevada de las CTCs aisladas en los pacientes con cáncer de mama metastásico presenta características de la EMT y de células madre. Además, se observó que existía una mayor expresión de los marcadores de la EMT y células madre en la población de pacientes que no respondía al tratamiento, 62% (EMT) y 44% (ALDH1) vs. 10% (EMT) y 5%, (ALDH1), en los pacientes que si respondían al tratamiento, lo que podría indicar la

utilidad de estos marcadores para identificar una subpoblación celular resistente a la terapia, y ser utilizados como marcadores de mal pronóstico.

Tabla 3. Características fenotípicas de las CTCs y las DTCs. [Modificación de la tabla de características fenotípicas de las DTCs (CK+) de médula ósea, publicada por Pantel y Braun (2001)].

Marcador	Tumor	DTC o CTC	Nº de pacientes con CTC/DTC que expresan el marcador (%)	Estudio
Marcadores histológicos				
PSA	Próstata	DTC	5/13 (38,5%).	Riesenberg y cols., 1993
CD45	Mama/CRC	DTC	0; 0.	Schlimok y cols., 1987
	Mama	CTC	0.	Cristofanilli y cols., 2004
	Colon	CTC	0.	Cohen y cols., 2008
	Próstata	CTC	0.	Swennenhuis y cols., 2009
Vimentina	Mama/CRC	DTC	0.	Pantel y cols., 1994
Antígenos asociados a proliferación				
PCNA	Próstata	DTC	0.	Mueller y cols., 1998
Ki67	Mama/CRC/Estómago	DTC	1/12 (8,3%); 0/13; 0/8.	Pantel y cols., 1993a
	Pulmón	DTC	0/7.	Pantel y cols., 1993b
	Mama	CTC	0.	Müller y cols., 2005
p120	Mama/CRC/Estómago	DTC	1/11 (9,1%); 5/12 (41,7%); 4/13 (30,8%).	Pantel y cols., 1993a
	Pulmón	DTC	3/10 (30%).	Pantel y cols., 1993b
Proteínas mutadas				
p53	Mama/CRC/Estómago/Pulmón/Gastrointestinal/Páncreas	DTC	29/63 (46%) pacientes con DTCs. 4/63 (6,3%) DTCs p53+.	Offner y cols., 1999

Marcador	Tumor	DTC o CTC	Nº de pacientes con CTC/DTC que expresan el marcador (%)	Estudio
Receptores hormonales				
ER	Mama	DTC	13/107 (12%).	Fehm y cols., 2008
MHC clase I				
HLA Clase I	Mama/CRC/Estómago	DTC	9/26 (34,6%); 12/17 (70,6%); 8/11 (72,7%).	Pantel y cols., 1991
	Mama	DTC	16/30 (53,3%).	Zia y cols., 2001
Receptores de factores de crecimiento				
EGFR	Mama/CRC	DTC	10/37 (27%); 4/15 (26,7%).	Schlimok y Riethmüller, 1990
	NSCLC	CTC	16/20 (80%).	Punnoose y cols., 2010
HER2	Mama/CRC/Estómago	DTC	48/71 (67,6%); 14/50 (28,0%).	Pantel y cols., 1993a
	Mama	DTC	20/46 (43%).	Solomayer y cols., 2006
	Mama	CTC	122/225 (50%) CK+. 50/122 (41%) HER2+.	Fehm y cols., 2010
	Mama	CTC	90/229 (39%) MUC1+, EpCAM+. 42/90 (47%) HER2+.	Fehm y cols., 2010
Receptor de transferrina	Mama	DTC	17/59 (28,8%).	Schlimok y Riethmüller, 1990
	Pulmón NSCLC	DTC	0.	Pantel y cols., 1993b
Proteasas o proteínas asociadas a las proteasas				
EMMPRIN	Mama	DTC	11/31 (35%) CK+, con 38 DTC → 34/38 (89%) EMMPRIN+.	Reimers y cols., 2004
	Colon/Gástrico	DTC	11/38 (28,94%) CK+, el 16% de las DTC EMMPRIN+; 4/13 (30,76%), el 48,5% de las DTC EMMPRIN+.	Buergy y cols., 2009
uPAR	Gástrico	DTC	81/156 (51,92%).	Heiss y cols., 2002
	Próstata	DTC CTC	28/47 (60%); 9/47(19%).	Thomas y cols., 2009

Introducción

Utilidad pronóstica de la detección de CTCs en pacientes con tumores sólidos de origen epitelial.

Marcador	Tumor	DTC o CTC	Nº de pacientes con CTC/DTC que expresan el marcador (%)	Estudio
Marcadores de apoptosis				
M30	Mama	DTC	36/157 (23%).	Fehm y cols., 2006
	Próstata	CTC	10/10 (100%)→ Todos los pacientes CTC M30+. 24 muestras con 765 CTC.	Larson y cols., 2004
	Próstata	CTC	590/765 (77,12%) CTC M30-. 175/ 765 (22,87%) CTC M30+.	Swennenhuis y cols., 2009
Marcadores de células tumorales totipotenciales				
CD44 ⁺ CD24 ⁻	Mama	DTC	47 pacientes CK+. 141/218 DTC (65%) CD44 ⁺ /CD24 ⁻	Balic y cols., 2006
ALDH1	Mama	CTC	69/226 (31% muestras) EpCAM+, MUC1+, HER2+. 69% fueron ALDH1+.	Aktas y cols., 2009
Marcadores de EMT				
Twist1, Akt2 y/o PI3Kα	Mama	CTC	69/226 (31% muestras) EpCAM+, MUC1+, HER2+. 62% fueron EMT+: 42% Twist1+; 62% Akt2+; y 58% PI3Kα+.	Aktas y cols., 2009

ALDH1 = Proteína aldehído deshidrogenasa; Akt2 = Proteína quinasa B de serina/treonina; CD24 = Sialoglicoproteína de superficie que se expresa en granulocitos maduros y células B, molécula de diferenciación de grupo 24; CD44 = Glicoproteína de superficie envuelta en las interacciones célula-célula, adhesión y migración celular, molécula de diferenciación de grupo 44; CD45 = Antígeno leucocitario común o molécula de diferenciación de grupo 45; CK = Citoqueratina; CRC = Cáncer colorrectal; CTC = Células tumorales circulantes; DTC = Células tumorales diseminadas; EGFR = Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano; EMMPRIN = Molécula de adhesión celular inductora de metaloproteasas de matriz extracelular; EpCAM = Molécula de adhesión celular epitelial; ER = Receptor de estrógenos; HLA = Antígeno leucocitario humano; ICAM-1 = Molécula 1 de adhesión intercelular; HER2 = Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano; Ki67 = Antígeno Ki67 o proteína nuclear de proliferación celular; p120 = Catenina delta 1, proteína asociada a cadherina; p53 = Proteína tumoral de 53 KDa; M30 = Péptido derivado de la rotura de la CK18 durante la apoptosis; MHC = Complejo mayor de histocompatibilidad; NSCLC = Carcinoma de pulmón de células no pequeñas; PCNA = Antígeno nuclear de células en proliferación; PI3Kα = Polipéptido alfa del enzima quinasa 3 fosfatilinositol; PSA = Antígeno específico de próstata; uPAR = Receptor del activador del plasminógeno tipo uroquinasa; Twist1 = Factor de transcripción 1.

3.5.3. Características genéticas

Algunas de las anomalías genéticas que se han detectado en las CTCs y las DTCs de tumores de origen epitelial son (Tabla 4):

1. Acumulación de desequilibrios genómicos, donde lo más general es la ganancia de cromosomas. Müller y cols. (1996) describieron, por primera vez, aberraciones en el número de copias del cromosoma 17 en las DTCs (células CK+) aisladas de aspirados de médula ósea de 9 pacientes con cáncer de mama. Sus resultados mostraron que las DTCs eran aneusómicas; y que en las DTCs individuales era más común que aparecieran monosomías y disomías, y en los cluster de DTCs polisomías. Fehm y cols. (2002) fueron los primeros autores en describir la presencia de aneusomías cromosómicas en las CTCs aisladas de sangre periférica de 31 pacientes con diferentes tipos de tumores (cáncer de mama, colon, pulmón, próstata y riñón). En 20 de los 31 pacientes aparecen más de una CTC, y las aneusomías que presentan para los cromosomas 1, 3, 4, 7, 8, 11 y 17 son en algunos casos (6/20) homogéneas y en otros (8/20) heterogéneas. Posteriormente, realizaron dos estudios más: (i) analizaron el cambio del número de cromosomas (cromosomas 1, 7, 8 y 17) en las CTCs aisladas en 20 pacientes con cáncer de mama, y sus resultados mostraron como la mayoría de las CTCs eran aneusómicas, al menos para uno de los cromosomas estudiados, y es más común la ganancia (44%; 64%; 75%; y 45%, respectivamente) que la pérdida de cromosomas (cromosomas 1, 8 y 17; 8%-15% monosomías, no aparece monosomía para el cromosoma 7); (ii) analizaron si los resultados de las CTCs aisladas en 17 pacientes concordaban con los obtenidos en el tumor primario de estos, y excluyendo 4 pacientes que presentaban CTCs disómicas, la concordancia fue del 76,9% (10/13). Estudios posteriores demuestran que

las CTCs y DTCs, en su mayoría, son aneusómicas y es más común la ganancia que la pérdida de cromosomas [Swennenhuis y cols., 2009; Klein y cols., 2002; Meng y cols., 2004b].

2. Amplificación de *ERBB2*, la cual se puede adquirir durante la progresión tumoral en el caso del cáncer de mama [Meng y cols., 2004a]. Müller y cols. (1996) describieron la amplificación de *ERBB2* en las DTCs (células CK+) aisladas de aspirados de médula ósea en 2 de los 8 pacientes (25%) con cáncer de mama que analizaron, demostrando así la naturaleza maligna de éstas células tumorales. Meng y cols. (2004a) detectaron en 9 de 24 pacientes con cáncer de mama, CTCs que presentaban amplificación del gen *ERBB2* mientras que sus tumores primarios no lo hacían, por lo que estas CTCs adquirieron la amplificación del gen durante la progresión tumoral. Además, 4 de estos 9 pacientes fueron tratados con herceptin, lo cual obtuvo una respuesta parcial en 2 pacientes y completa en uno de ellos.
3. Rara aparición de mutaciones en *TP53* en las DTCs [Offner y cols., 1999; Klein y cols., 2002]. Klein y cols. (2002) analizaron la aparición de mutaciones en *TP53* (exones 4-9) en las DTCs de 525 muestras (células CK+ en aspirados de médula ósea y sangre, y células EpCAM+ en nódulos linfáticos) de 474 pacientes con cáncer de mama (304), próstata (106) y gastrointestinal (115). Sus resultados mostraron que independientemente del tipo de tumor y del compartimento estudiado (médula ósea, sangre o nódulos linfáticos), existía una gran divergencia genética sobre todo en el número de desequilibrios cromosómicos, que el gen *TP53* raramente aparece mutado en las DTCs, y aunque algunas DTCs albergaban mutaciones en *TP53* existía una microheterogeneidad en el genotipo de este gen. Además realizaron una hibridación genómica

comparativa y comprobaron que las DTCs eran genéticamente muy inestables y heterogéneas, y que la heterogeneidad disminuía notablemente con la aparición de metástasis clínicamente detectables (DTCs de los pacientes M1 eran menos heterogéneas que las DTCs de los pacientes M0).

4. Mutaciones en el codón 12 de *K-ras* en DTCs. Solakoglu y cols. (2002) analizaron la aparición de esta mutación en las DTCs (células CK+) expandidas *in vitro*, que habían sido aisladas de los aspirados de médula ósea, de 7 pacientes con cáncer de colon. Sus resultados mostraron una gran heterogeneidad en las células analizadas (15-30 células por paciente): 2 pacientes presentaban esta mutación; 4 presentaban tanto la mutación como el alelo normal del gen; y 1 no presentaba la mutación.
5. Activación de mutaciones en *EGFR*, las cuales se pueden adquirir durante la progresión tumoral del cáncer de pulmón. Maheswaran y cols. (2008) detectaron en pacientes con cáncer de pulmón resistentes a la terapia con inhibidores tirosin-quinasa, que presentaban en su tumor primario mutaciones primarias de *EGFR* (deleción del exón 19 y mutación sin sentido L858R) y la mutación T790M con una frecuencia muy baja, CTCs con mutaciones en *EGFR*, que eran mutaciones primarias y la mutación T790M, e incluso, detectaron CTCs con mutaciones adicionales en *EGFR* que no aparecían en el tumor primario. Esto sugiere que existe una emergencia de la mutación T790M y de mutaciones adicionales durante la progresión tumoral, después de la quimioterapia, y pueden representar diferentes clones celulares seleccionados durante el tratamiento.

3.5.4. Otras características

3.5.4.1. Potencial proliferativo

Solakoglu y cols. (2002) demostraron como era posible realizar expansiones celulares *in vitro* de DTCs (células CK+) aisladas de 153 pacientes recién diagnosticados de cáncer (próstata, mama, colon y riñón). En este estudio se realizó un screening previo de la presencia de DTCs en médula ósea, tras esto se realizó el cultivo de células de médula ósea, de 21 a 102 días, y se detectaron células CK+ viables en el 81% de las cultivos (124 pacientes). Este resultado demuestra que la mayoría de los pacientes poseían DTCs viables en médula ósea en el momento del diagnóstico del tumor; y el potencial proliferativo de las DTCs aisladas en médula ósea. Además, la viabilidad de estas células tumorales resultó ser un factor pronóstico de la enfermedad más fiable que la mera detección de DTCs en médula ósea.

Tabla 4. Características genéticas de las CTCs y las DTCs.

Característica	Tumor	DTC o CTC	Nº de pacientes con CTC/DTC que presentan la característica (%)	Estudio
Amplificación de <i>ERBB2</i>				
<i>ERBB2</i>	Mama Próstata	DTC	14 pacientes (8 con cáncer de mama y 6 con cáncer de próstata) con DTCs. 2/8 (25%) DTCs con amplificación de <i>ERBB2</i> . 6/6 (100%) no amplificación del gen	Müller y cols., 1996
<i>ERBB2</i>	Mama	CTC	24 pacientes, tumor primario <i>ERBB2</i> -. 9/24 (37,5%) CTCs amplificación del gen	Meng y cols., 2004a
Mutaciones en <i>TP53</i>				
<i>TP53</i>	Pulmón/ Mama/ Próstata/ Colon	DTC	DTC alelo normal de p53	Offner y cols., 1999
<i>TP53</i>	Mama/ Próstata/ Gastrointes- tinal	DTC/CTC	19/115 (16,52%) DTCs mutación <i>TP53</i> y 2 (1,7%) DTCs delección homocigótica. 82% de DTCs no presentaron mutación.	Klein y cols., 2002
Mutaciones en <i>EGFR</i>				
<i>EGFR</i>	Pulmón	CTC	27 pacientes con CTC, 23 análisis mutaciones <i>EGFR</i> en sus CTC. 20/23 tumor primario mutaciones en <i>EGFR</i> ; todas las CTC portan las mutaciones, la mutación T790M aparece en mayor proporción que en tumor primario, y aparecen nuevas mutaciones. 3/23 sin mutaciones en tumor primario; CTC sin mutaciones.	Maheswaran y cols., (2008)

Introducción

Utilidad pronóstica de la detección de CTCs en pacientes con tumores sólidos de origen epitelial.

Característica	Tumor	DTC o CTC	Nº de pacientes con CTC/DTC que presentan la característica (%)	Estudio
Desequilibrios genómicos				
Ch17	Mama	DTC	9 pacientes con DTCs. 9/9 (100%) DTCs con aneusomías. Se analizaron 197 DTCs totales: 32,48% < 2 copias; 14,72% con 2 copias; y 52,79% > 2 copias del Ch17.	Müller y cols., 1996
Ch1, 3, 4, 7, 8, 11 y 17	Mama/ Próstata/ Colon/ Riñón	CTC	31 pacientes con CTCs. 25/31 (80,64%), CTCs con aneusomías.	Fehm y cols., 2002
Ch1, 8 y 17 Ch3 y 11	Mama	CTC	36 pacientes con dormancia. 13/36 (36,1%) CTCs+, con aneusomías en al menos uno de los cromosomas evaluados.	Meng y cols., 2004b
Ch1, 7, 8, 11 y 17	Próstata	CTC	Evaluación de 1.720 CTC de 118 muestras de 59 pacientes. Ch1: ≈8% de CTCs con <2 copias; ≈48% 2 copias; y ≈54% >2 copias. Ch8: 8% de CTCs con <2 copias; 38% 2 copias; y 54% >2 copias. Ch11: ≈8% de CTCs con <2 copias; ≈48% 2 copias; y ≈54% >2 copias. Ch17: ≈12% de CTCs con <2 copias; ≈58% 2 copias; y ≈30% >2 copias.	Swennenhuis y cols., 2009
Mutaciones en K-ras				
K-ras	Colon	DTC	2/7 (28,57%) mutación 4/7 (57,14%) mutación + alelo normal 1/7(14,28%) alelo normal	Solakoglu y cols., 2002

Ch1 = Cromosoma 1; Ch3 = Cromosoma 3; Ch4 = Cromosoma 4; Ch7 = Cromosoma 7; Ch8 = Cromosoma 8; Ch17 = Cromosoma 17; *EGFR* = Gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano; *ERBB2* = Gen del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano; *K-ras* = Gen *K-ras*; *TP53* = Gen *TP53*.

6. **Relevancia clínica de la detección de DTCs y CTCs**

La diseminación de células tumorales desde el tumor primario ocurre principalmente por dos vías, linfática y hematógena.

3.6.1. Diseminación linfática

Para estudiar la diseminación linfática es inevitable el estudio de los nódulos linfáticos del tumor primario, ya sea a través del estudio de ganglios linfáticos completos o del estudio del SLN, y por técnicas inmunológicas [Bilchik y cols., 2007; de Boer y cols., 2009; Balch y cols., 2010] o moleculares [Tsujiimoto y cols., 2007; Visser y cols., 2008; Koyanagi y cols., 2008]. La afectación de los ganglios linfáticos se considera un indicador de mal pronóstico en tumores como el cáncer de mama, melanoma y colon [de Boer y cols., 2010; Nicholl y cols., 2011; Bilchik y cols., 2001]. Pero existe un número significativo de pacientes sin afectación ganglionar que desarrollan metástasis en otros órganos, por lo que la fiabilidad de este marcador para predecir la diseminación tumoral no es completa y solo parcial [Braun y cols., 2001a].

Son numerosos los estudios que han demostrado la correlación que existe entre la detección de micrometástasis en nódulos linfáticos y una menor supervivencia o un peor pronóstico de la enfermedad en: cáncer de mama [Reed y cols., 2009; de Boer y cols., 2009], melanoma [Giese y cols., 2005; Balch y cols., 2010], cáncer colorrectal [Bilchik y cols., 2007; Koyanagi y cols., 2008] y cáncer de próstata [Kurahashi y cols., 2005]. Aunque otros autores señalan que el valor pronóstico recae en la detección de macrometástasis en nódulos linfáticos, y no de micrometástasis o ITCs [Gobardhan y cols., 2011]. En cuanto al valor de las ITCs, tanto como marcador que indica realizar la extirpación de los

ganglios linfáticos [Greene y cols., 2002] como marcador de un peor pronóstico de la enfermedad [Colleoni y cols., 2005; Querzoli y cols., 2006; Reed y cols., 2009; de Boer y cols., 2009; Gobardhan y cols., 2011], no está claro.

3.6.2. Diseminación hematológica

Para analizar la diseminación hematológica debemos analizar las DTCs aisladas en médula ósea y las CTCs aisladas en sangre periférica.

Se ha demostrado el papel fundamental que juegan las CTCs y las DTCs en la diseminación metastásica de los carcinomas [Pantel y Braenhoff, 2004; Paterlini-Brechot y Benali, 2007; Langley y Fidler, 2011; Ignatiadis y Reinholz, 2011], e incluso en la recurrencia local tras la extirpación del tumor primario debido a la “*autosiembra tumoral*” [Kim y cols., 2009; Langley y Fidler, 2011]. Además, la identificación de estas células puede ser un indicador importante para la toma de decisión sobre el tratamiento adyuvante que se va a administrar y/o de la continuación del mismo [Meng y cols., 2004a; Ignatiadis y Reinholz, 2011].

3.6.2.1. Detección de DTCs en médula ósea

La mayor parte de estudios de detección de DTCs en médula ósea utilizan técnicas inmunológicas [Pantel y cols., 2003], las técnicas moleculares presenta los problemas que se han descrito anteriormente en el apartado *Técnicas de detección de CTCs y DTCs: Técnicas moleculares*. Aunque algunos estudios comparan ambas metodologías y obtienen resultados similares [Slade y cols., 2005].

La detección de micrometástasis o DTCs en médula ósea proporciona información adicional al tumor primario sobre la enfermedad [Pantel y Braun, 2001], y ha demostrado su valor como marcador de mal pronóstico, tanto sobre la supervivencia como el tiempo libre de enfermedad, en diversos tumores como: cáncer de mama [Braun y cols., 2000; Naume y cols., 2004a], cáncer colon [Leinung y cols., 2000], cáncer de próstata [Weckermann y cols., 2001; Lilleby y cols., 2003], cáncer de ovario [Braun y cols., 2001b], carcinoma renal [Buchner y cols., 2006] y cáncer pancreático [van Heek y cols., 2001]. Además, la posibilidad de monitorizar o controlar la presencia de las DTCs en médula ósea podría servir como herramienta para evaluar la eficacia de la quimioterapia administrada [Becker y cols., 2006].

La fuerte correlación existente entre la presencia de micrometástasis en médula ósea y una menor supervivencia y tiempo libre de enfermedad (Tabla 5) [Pantel y Otte, 2001], hace que este marcador haya sido propuesto como un marcador pronóstico independiente de la enfermedad. Y en el caso del cáncer de mama se ha propuesto que debería incluirse en la guía de clínica práctica para uso de marcadores tumorales [Harris y cols., 2007].

Tabla 5. Pronóstico de la enfermedad tumoral por la detección de DTCs en médula ósea [Pantel y Otte, 2001].

Tipo de tumor	Marcadores	Porcentaje de detección	Valor pronóstico
Cáncer de mama	CK	175/554 (32%)	PFS, OS
	CK	199/552 (35%)	PFS, OS*
	EMA	89/350 (25%)	PFS, OS
	EMA, TAG12, CK	38/100 (38%)	PFS, OS*
	CK	18/49 (37%)	PFS*
	TAG12	325/727 (43%)	PFS, OS*
Cáncer de ovario	CK	32/108 (30%)	PFS
Cáncer colorrectal	CK18	28/88 (32%)	PFS*
Cáncer gástrico	CK18	34/97 (35%)	PFS
	CK18	47/78 (60%)	PFS
	CK18	95/180 (53%)	PFS*
Cáncer esofágico	CK	37/90 (41%)	PFS, OS
Cáncer de pulmón (NSCLC)	CK	17/43 (40%)	PFS
	CK18	83/139 (60%)	PFS*, OS
	CK18	15/39 (39%)	PFS

*Valor pronóstico como parámetro independiente, confirmado a través de análisis multivariable. CK = Citoqueratina; PFS = Tiempo libre de enfermedad; EMA = Antígeno epitelial de membrana; NSCLC = Carcinoma de pulmón de células no pequeñas; OS = Supervivencia global; TAG12 = Glicoproteína 12 asociada a tumor.

3.6.2.1. Detección de CTCs en sangre periférica

El valor pronóstico de la detección de CTCs en sangre periférica por técnicas moleculares es controvertido, debido a que son técnicas que obtienen resultados variables, incluidos falsos positivos y detecciones positivas de los marcadores en voluntarios sanos, y no reproducibles.

Sin embargo, la detección de CTCs en sangre periférica por técnicas inmunológicas indica que ésta podría ser un factor pronóstico de la enfermedad:

- En pacientes con cáncer de mama metastásico se ha comprobado que la detección de CTCs, antes del tratamiento, tiene valor pronóstico sobre la supervivencia y el tiempo libre de enfermedad [Gaforio y cols., 2003; Cristofanilli y cols., 2004; Cristofanilli y cols., 2005; Müller y cols., 2006; Giuliano y cols., 2011]. Además, esta detección ha demostrado tener un valor pronóstico superior al valor de la carga tumoral; el fenotipo de la enfermedad; y los métodos de imagen que se emplean actualmente [Gaforio y cols., 2003; Cristofanilli y cols., 2004; Hayes y cols., 2006; Cristofanilli y cols., 2007; Bidard y cols., 2008a; Giuliano y cols., 2011]. El valor pronóstico de la detección de estas células tumorales en pacientes no metastásicos parece poseer valor predictivo sobre la enfermedad [Gaforio y cols., 2003; Wülfing y cols., 2006; Bidard y cols., 2010] pero hace falta realizar más estudios que ratifiquen su valor.
- En pacientes con cáncer colorrectal metastásico se ha comprobado que la detección de CTCs, antes del tratamiento, tiene valor pronóstico sobre la supervivencia y el tiempo libre de enfermedad [Cohen y cols., 2008; Wong y cols., 2009]. Sin embargo, el valor pronóstico de la detección de estas células tumorales en pacientes no metastásicos no está claro y los estudios

presentan diferencias significativas en sus resultados [Wong y cols., 2009; Wind y cols., 2009; Thorsteisson y cols., 2011].

- En el caso de pacientes con cáncer metastásico de próstata, esta detección tiene valor pronóstico sobre la supervivencia [Danila y cols., 2007; Okegawa y cols., 2009; Goodman y cols., 2009].

La detección de CTCs en sangre periférica durante el tratamiento administrado, puede ser una herramienta útil de seguimiento de la enfermedad y de la evaluación de la eficacia de dicho tratamiento [Hayes y cols., 2006; Cohen y cols., 2008; Pierga y cols., 2008; Nolé y cols., 2008; Tewes y cols., 2009; Giuliano y cols., 2011; Goodman y cols., 2011; Pierga y cols., 2012].

Además, varias investigaciones señalan que la detección de CTCs en sangre periférica podría utilizarse como método de estratificación de los pacientes [Cristofanilli y cols., 2007; Dawood y cols., 2008], e incluso para diseñar terapias individualizadas [Meng y cols., 2004a; Fehm y cols., 2007; Cristofanilli y cols., 2005; Fehm y cols., 2007; Fehm y cols., 2010; Giuliano y cols., 2011; Cristofanilli y Mendelsohn, 2006].

El valor pronóstico que tiene la detección de CTCs en sangre periférica (Tabla 6), hace que haya sido propuesto como un marcador pronóstico independiente de la enfermedad. Y en el caso del cáncer de mama, se ha propuesto su inclusión en la guía de clínica práctica para uso de marcadores tumorales [Harris y cols., 2007].

Tabla 6. Pronóstico de la enfermedad tumoral por la detección de CTCs en sangre periférica.

Tipo de tumor y estudio	Marcadores aislamiento y detección	Estadio	% de detección	Valor pronóstico
Cáncer de mama				
Gaforio y cols., 2003	CK7/8-CK7/8	M0, M1	57/92 (62%)	(≥1 CTCs/10ml) PFS*, OS*
Cristofanilli y cols., 2004	EpCAM-CK8/18/19	M1	87/177 (49%)	(≥5 CTCs/7,5ml) PFS*, OS*
Cristofanilli y cols., 2005	EpCAM-CK8/18/19	M1	43/83 (52%)	(≥5 CTCs/7,5ml) PFS*, OS*
Bidard y cols., 2010	EpCAM-CK8/18/19	M0	26/115 (23%)	(≥1 CTCs/7,5ml) PFS*, OS*
Cáncer colorrectal				
Molnar y cols., 2001	CK7/8- panCKs	M0, M1	24/32 (75%)	(≥1 CTCs/20ml)
Cohen y cols., 2008	EpCAM-CK8/18/19	M1	111/430 (26%)	(≥3 CTCs/7,5ml) PFS*, OS*
Sastre y cols., 2008	EpCAM-CK8/18/19	M0, M1	34/94 (36%)	(≥2 CTCs/7,5ml)
Wong y cols., 2009	EpCAM-CK20	M0, M1	82/132 (62%)	(≥1 CTCs/10ml) PFS*, OS*
Wind y cols., 2009	EpCAM-CK8/18/19	M0	2/31 (7%)	(≥1 CTCs/7,5ml)
Thorsteisson y cols., 2011	EpCAM-CK8/18/19	M0, M1	1/20 (5%)	(≥2 CTCs/7,5ml)
Cáncer de próstata				
Danila y cols., 2007	EpCAM-CK8/18/19	M1	69/120 (57%)	(≥5 CTCs/7,5ml) OS*
Okegawa y cols., 2009	EpCAM-CK8/18/19	M1	32/6 (50%)	(≥5 CTCs/7,5ml) OS*

*Valor pronóstico como parámetro independiente, confirmado a través de análisis multivariable. CK = Citoqueratina; EpCAM = Molécula de adhesión celular epitelial; M0 = Pacientes que no presentan metástasis a distancia; M1 = Pacientes que presentan metástasis a distancia; PFS = Tiempo libre de enfermedad; OS = Supervivencia global.

La mayor parte de las investigaciones se han centrado en la detección de CTCs y DTCs en pacientes con cáncer de mama, y ha sido en este tipo de tumor donde ha sido posible demostrar que:

- Es posible la detección de CTCs en pacientes en dormancia o latencia tumoral. La dormancia o latencia tumoral es el periodo de tiempo, el cual

puede ser desde años a décadas, que transcurre desde que un paciente con cáncer se considera curado hasta que aparece la enfermedad metastásica. Es un periodo de restricción del crecimiento tumoral, en el cual existe una enfermedad residual presente pero se mantiene asintomática [Aguirre-Ghiso, 2007; Willis y cols., 2010]. Meng y cols. (2004b) demostraron la presencia de CTCs en sangre periférica de 36 pacientes con cáncer de mama que no presentaban evidencia clínica de la enfermedad tras 7-22 años de haber sido sometidos a mastectomía. Y concluyeron que, debido a que las CTCs tienen una vida media corta, debe existir un equilibrio entre replicación y muerte celular durante el tiempo de letargo tumoral, y este puede ser uno de los mecanismos que permite la latencia tumoral;

- La información que proporcionan CTCs y DTCs, con una concordancia en los mismos pacientes del 7,9% al 93% [Pierga y cols., 2004; Fehm y cols., 2009; Krishnamurthy y cols., 2010], es diferente según: (i) el compartimento donde se localizan estas células tumorales [Fehm y cols., 2009; Krishnamurthy y cols., 2010]. Fehm y cols. (2009) evaluaron la detección de CTCs en 431 pacientes con cáncer de mama en estadio M0, con el sistema AdnaTest (células EpCAM+, MUC1+ y HER2+), y la detección de DTCs en 414 de estos pacientes, por ICC (células CK+). Sus resultados mostraron una concordancia muy débil entre la presencia de CTCs y DTCs, lo que indica que su significado clínico debe ser diferente; además, las CTCs fueron aisladas, principalmente, en pacientes con tumores triple negativo (ER-, PgR- y HER2-), por lo que la biología del tumor primario parece dirigir la diseminación de las CTCs; (ii) el tipo de pacientes de estudio (metastásicos y no metastásicos), por ejemplo: la detección de DTCs parece que no tiene un interés clínico en pacientes con cáncer de mama metastásico, sin embargo, la detección de estas células tumorales en pacientes no metastásicos tiene valor pronóstico [Bidard y cols., 2008a;

Bidard y cols., 2008b]. Por otro lado, la detección de CTCs demuestra tener valor pronóstico y predictivo en pacientes metastásicos [Pierga y cols., 2004; Bidard y cols., 2008a], mientras que en pacientes en estadios tempranos, aunque parece predecir la recaída de la enfermedad durante el tratamiento [Pierga y cols., 2008], sería necesario realizar más estudios para ratificar su valor clínico [Bidard y cols., 2010].

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Hipótesis

Utilidad pronóstica de la detección de CTCs en pacientes con tumores sólidos de origen epitelial.

Las hipótesis de trabajo desde las que se partieron fueron:

- I. La detección de las células tumorales circulantes en sangre periférica de pacientes diagnosticados con tumores sólidos epiteliales, tiene valor predictivo en la progresión de la enfermedad y la supervivencia global de estos pacientes.
- II. El análisis individualizado, genético y fenotípico, de las células tumorales circulantes aisladas en sangre periférica de pacientes con tumores sólidos epiteliales, nos da información útil del proceso metastásico.

OBJETIVOS

Objetivos

Utilidad pronóstica de la detección de CTCs en pacientes con tumores sólidos de origen epitelial.

Los objetivos que se establecieron para esta tesis fueron:

- I. Poner a punto una metodología que nos permita de forma individual: detectar, cuantificar y caracterizar, genética y fenotípicamente, las células tumorales circulantes en sangre periférica de pacientes con tumores sólidos de origen epitelial.
- II. Demostrar la utilidad pronóstica de:
 - i) La cuantificación de las células tumorales circulantes en sangre periférica de pacientes diagnosticados con tumores sólidos epiteliales.
 - ii) La evaluación genética y fenotípica de estas células tumorales circulantes en el desarrollo del tumor.

**TRABAJO EXPERIMENTAL Y RESUMEN
GLOBAL DE LOS RESULTADOS**

Capítulo 1

Desarrollo de una técnica de aislamiento y cuantificación de células tumorales circulantes (CTCs) en sangre periférica

Detección de CTCs en sangre periférica de pacientes diagnosticadas con cáncer de mama

Análisis del valor pronóstico de este nuevo marcador

Trabajo publicado en 2003, con título “**Detection of breast cancer cells in the peripheral blood is positively correlated with estrogen-receptor status and predicts for poor prognosis**”, en la revista *International Journal of Cancer*.

- Índice de impacto de la revista = 4,926
- Categoría a la que pertenece: Oncología
- Cuartil que ocupa: primer cuartil
- Rango en la categoría (2010): 32/185.

DETECTION OF BREAST CANCER CELLS IN THE PERIPHERAL BLOOD IS POSITIVELY CORRELATED WITH ESTROGEN-RECEPTOR STATUS AND PREDICTS FOR POOR PROGNOSIS

José-Juan GAFORIO^{1*}, María-José SERRANO¹, Pedro SANCHEZ-ROVIRA², Antonio SIRVENT¹, Miguel DELGADO-RODRIGUEZ¹, María CAMPOS¹, Nicolás DE LA TORRE¹, Ignacio ALGARRA¹, Rosario DUEÑAS², and Ana LOZANO²

¹Department of Health Sciences, Faculty of Experimental Sciences, University of Jaén, Jaén, Spain

²Medical Oncology Department, University Hospital, Jaén, Spain

We investigated whether detection of cytokeratin-positive (CK+) cells in the peripheral blood (PB) of breast cancer patients before chemotherapy could be a prognostic factor. Blood from a total of 92 breast cancer patients was evaluated for the presence of CK+ cells. Blood samples were collected before chemotherapy. Patients entered in the study included: neoadjuvant ($n = 25$), adjuvant ($n = 42$) and metastatic ($n = 25$). Blood samples (10 ml) were centrifuged using a double density-gradient to recovering the mononuclear cell (MNC) and granulocyte cell (GC) fractions. Subsequently, positive immunomagnetic cell separation was carried out to isolating CK+ cells. The enriched cell fraction was cytocentrifuged and then immunocytochemically labeled using an anti-cytokeratin antibody. Our results indicated that breast tumor cells sediment with both MNC and GC fractions. We therefore recommend examination of both fractions in all enrichment protocols. CK+ cells in PB were identified in 57 of 92 (62%) patients when MNC and GC fractions were assessed (range = 1–61 cells, median = 8). No CK+ cells were detected in blood samples of 16 healthy donors. There were significant differences in the presence of CK+ cells according to estrogen receptor expression ($p = 0.049$), and lymph node status ($p = 0.033$), but not to the age, menopausal status, type of patient (neoadjuvant, adjuvant or metastatic), TNM stage, histological type, progesterone receptor expression, c-erbB2 expression, p53 expression or Ki67 expression. Regarding the relationship between tumor size (T) and the presence of CK+ cells, a borderline significant trend was observed ($p = 0.07$). The median follow-up of the patients was 21 months and statistical analysis (Kaplan-Meier analysis) showed that using the method we present, the detection of CK+ cells in PB before starting the chemotherapy in breast cancer patients was significantly correlated with both progression-free survival ($p = 0.058$) and overall survival ($p = 0.003$). In conclusion, the present study suggests that detection of CK+ cells in PB before chemotherapy might identify breast cancer patients with poor prognosis.

© 2003 Wiley-Liss, Inc.

Key words: breast cancer; cytokeratin; magnetic cell sorting; circulating tumor cells; estrogen receptor; prognosis

Breast cancers have been shown to shed tumor cells into the circulation at the earliest stages of primary tumor development. It is accepted that it is the early hematogenous dissemination of the tumor that decides the patient's fate. Fehm *et al.*¹ have reported that circulating epithelial cells in breast cancer patients are malignant. The potential of circulating tumor cells to form metastases *in vivo* has been reported by Pretlow *et al.*² They showed the capacity to induce metastases in nude mice from tumor cells taken directly from the peripheral blood (PB) of patients. Thus, the early detection of circulating tumor cells may have important therapeutic and prognostic implications. It could be an independent prognostic factor that could identify the patients who are most likely to benefit from adjuvant therapy. Immunological and molecular methods have been used for detecting circulating tumor cells,³ but it has not been possible to standardize a method internationally. This could explain the contradictory results obtained by different groups.

We investigated whether detection of cytokeratin-positive (CK+) cells in PB of breast cancer patients before chemotherapy

could be a prognostic factor. Cytokeratin is a valuable marker for breast tumor cell in PB. Blood from a total of 92 breast cancer patients was evaluated for the presence of CK+ cells. Blood samples were collected before chemotherapy just when the patients were included in this study. Patients entered in the study included: neoadjuvant ($n = 25$), adjuvant ($n = 42$) and metastatic ($n = 25$). Correlation of CK+ cells with patient characteristics and with well established prognostic parameters were carried out. We have used an immunomagnetic separation procedure for the detection of circulating tumor cells based on the magnetic cell sorting technique. As a first step, blood samples were centrifuged using a double density-gradient to recovering the mononuclear cell (MNC) and granulocyte cell (GC) fractions. Subsequently, immunomagnetic enrichment technique was carried out to isolating CK+ cells before immunocytochemistry using microbeads conjugated with a cytokeratin-specific antibody. Our present results indicate that the detection of CK+ cells in PB in breast cancer patients before starting the chemotherapy was (i) associated with short survival and (ii) positively correlated with estrogen receptor status.

MATERIAL AND METHODS

Tumor cell lines

The breast carcinoma cell lines MDA-MB-231, MCF-7 and T47D were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). All cells were grown as monolayers in RPMI 1640 medium, supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% heat-inactivated FBS and a 1% penicillin-streptomycin mixture at 37°C in a 5% CO₂ environment. Cells were grown to confluence and passaged with the use of EDTA. Cells in the exponential growth phase were used for all experiments.

Abbreviations: CK, cytokeratin; EDTA, ethylene-diaminetetra acetic acid; ER, estrogen receptor; FITC, fluorescein isothiocyanate; GC, granulocyte cell; MAb, monoclonal antibodies; MACS, magnetic cell sorting; MNC, mononuclear cell; OS, overall survival; PB, peripheral blood; PBS, phosphate-buffered saline; PFS, progression free survival; PR, progesterone receptor.

Grant sponsor: Ministerio de Sanidad y Consumo; Grant number: FIS 02/1879; Grant sponsor: COFIMAN S.L.

*Correspondence to: Department of Health Sciences, Faculty of Experimental Sciences (Edif. 5), University of Jaén, Campus Las Lagunillas s/n, 23071 Jaén, Spain. Fax: +34-953-012-141.
E-mail: jgaforio@ujaen.es

Received 4 March 2003; Revised 6 June 2003; 7 July 2003; Accepted 15 July 2003

DOI 10.1002/ijc.11479

Patients and histologic examination

The studied group was comprised of 92 breast cancer patients who had been treated consecutively at the Medical Oncology Department (University Hospital, Jaén, Spain) over the period from April 2000 to December 2002. All patients were followed up until death or until February 1, 2003. Follow-up of the patients was routinely carried out every 6 months and included recording of the development of local and distant tumor relapse and the survival state of the patients. The patients' ages ranged between 26–77 years (median = 55 years). Characteristics of breast cancer patients included in this study are shown in Table I. The type of patient entered in the study included: neoadjuvant ($n = 25$), adjuvant ($n = 42$) and metastatic ($n = 25$). The tumor types of patients were classified by pathologists according to the World Health Organization scheme for typing breast tumors. Immunostaining of primary tumor samples was assessed by Department of Pathology (University Hospital of Jaén) on routinely processed paraffin sections using the antigen-retrieval method. Sections were examined with monoclonal antibodies (MAbs) recognizing estrogen

receptor (ER) (clone: 6F11, Master Diagnostica, Granada, Spain); progesterone receptor (PR) (clone: hPRa2+hPRa3, Master Diagnostica); c-erbB2 (clone: CB11, Master Diagnostica); p53 (clone: DO7, Master Diagnostica) and; Ki-67 (clone: MIB-1, Dako, Glostrup, Denmark). Steroid hormone receptor status was determined in paraffin-embedded tissue (using immunoperoxidase staining with monoclonal antibodies) and an ER positivity cut-off level of >10% stained nuclei.

Blood samples

We analyzed the blood of 92 patients with breast cancer from the University Hospital of Jaén (Spain). With previous informed consent of patients, peripheral venous blood samples (10 ml) were collected in heparinized tubes and processed within 4 hr of collection. Blood samples from neoadjuvant patients were obtained before chemotherapy. Blood samples from adjuvant patients were obtained at least 4 weeks after the patient had undergone primary surgery just before chemotherapy. Metastatic patients (19 of 25) were out-patients returning for follow-up and they had not re-

TABLE I—RELATIONSHIP BETWEEN PATIENT CHARACTERISTICS AND BIOMARKERS WITH DETECTION OF CK-POSITIVE CELLS IN PERIPHERAL BLOOD

Patient characteristics and biomarkers	Patients with CK-positive cells <i>n</i> (%)	Patients with no CK-positive cells <i>n</i> (%)	<i>p</i> -value
Number of patients	57 (62.0)	35 (38.0)	
Age (years)			0.827
≤50	21 (36.6)	12 (36.4)	
>50	36 (61.0)	23 (39.0)	
Menopausal status			0.521
Premenopausal	22 (57.9)	16 (42.1)	
Postmenopausal	35 (64.8)	19 (35.2)	
Type of patient			0.679
Neoadjuvant	17 (68.0)	8 (32.0)	
Adjuvant	24 (57.1)	18 (42.9)	
Metastatic	16 (64.0)	9 (36.0)	
T (tumour size)			0.07
T1	9 (50.0)	9 (50.0)	
T2	27 (62.8)	16 (37.2)	
T3	5 (62.5)	3 (37.5)	
T4	13 (76.5)	4 (23.5)	
Tx	3 (50.0)	3 (50.0)	
N (lymph node status)			0.033 ¹
N0	5 (33.3)	10 (66.7)	
N+	47 (69.1)	21 (30.9)	
Nx	5 (55.6)	4 (44.4)	
M (distant metastasis)			1.000
M0	34 (61.8)	21 (38.2)	
M1	16 (64.0)	9 (36.0)	
Mx	7 (58.3)	5 (41.7)	
TNM stage			0.543
I	2 (33.3)	4 (66.7)	
II	25 (64.1)	14 (35.9)	
III	14 (63.6)	8 (36.4)	
IV	16 (64.0)	9 (36.0)	
Histological type			0.802
Ductal	38 (59.4)	26 (40.6)	
Lobular	9 (69.2)	4 (30.8)	
Other	10 (66.7)	5 (33.3)	
ER (estrogen receptor)			0.049 ¹
+	40 (69.0)	18 (31.0)	
−	11 (44.0)	14 (56.0)	
PR (progesterone receptor)			0.461
+	34 (63.0)	20 (37.0)	
−	13 (52.0)	12 (48.0)	
cerbB-2			1.000
+	40 (61.5)	25 (38.5)	
−	8 (61.5)	5 (38.5)	
p53			0.559
+	22 (66.7)	11 (33.3)	
−	27 (62.8)	16 (37.2)	
Ki67			0.897
+	29 (59.2)	20 (40.8)	
−	5 (62.5)	3 (37.5)	

¹Statistically significant.

ceived any treatment (chemotherapy, surgery, radiotherapy or hormone therapy) for at least 24 weeks before blood collection. Six of 25 of these patients were diagnosed as metastatic at the time to enter in the protocol of study, thus these patients had not received any treatment before blood collection. The study was reviewed and approved by the Ethics Committee of the Hospital.

As negative controls, 16 blood samples from healthy volunteers without evidence of an epithelial malignancy were examined. The positive controls were obtained using 10 ml of blood from healthy volunteers spiked with cells from three human breast cancer cell lines (MCF-7, MDA-MB-231 or T47D) and processed separately from patient samples, to avoid contamination.

Density gradient separation

According to the Sigma procedure, a double gradient was formed by layering 5 ml of HISTOPAQUE-1077 (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO) over an equal volume of HISTOPAQUE-1119 (Sigma). Blood samples were carefully layered onto the upper HISTOPAQUE-1077 medium. The tubes were then centrifuged at 700g for 30 min. The GC fraction was found at the 1077/1119 interphase whereas the MNC fraction was found at the plasma/1077 interphase. Both cell fractions were mixed and washed in 50 ml PBS.

Magnetic labeling

Cells were then magnetically labeled according to the manufacturer protocols (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Cytokeratin-expressing cells from peripheral blood of breast cancer patients were enriched and detected using the Carcinoma Cell Enrichment and Detection Kit, Immunocytochemistry (Miltenyi Biotec). Briefly, cells were permeabilized with MACS CellPerm Solution in a volume of 45 µl for 5 min at 20–25°C and fixed upon addition of 5 ml of MACS CellFix Solution for 30 min at 20–25°C. The cells were then washed twice in 1× MACS CellStain Solution and resuspended in 600 µl of the same solution. To block Fc receptors, 200 µl of FcR Blocking Reagent were added, and tumor cells were magnetically labeled by adding 200 µl of MACS Cytokeratin MicroBeads (colloidal super-paramagnetic MicroBeads conjugated to a monoclonal anti-cytokeratin 7/8 antibody; Clone: CAM5.2) and incubating the cells for 45 min at 20–25°C. After incubation, cells were stained with 100 µl of anti-cytokeratin conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC) for 10 min in the dark at 20–25°C. After washing, cells were resuspended in a final volume of 500 µl CellStain Solution and stained with 10 µl of anti-FITC conjugated to alkaline phosphatase for 10 min in the dark at 20–25°C.

Magnetic cell separation

For magnetic enrichment of epithelial tumor cells, the magnetically labeled cell suspension was applied to a prefilled positive separation column (MiniMACS separation columns, type MS+) in the magnetic field of a MiniMACS separator (Miltenyi Biotec). The cells were passed through the column and washed three times with 500 µl dilution buffer, so negative (non-magnetic) cell population was washed out of the column. Afterward, the column was removed from the gradient magnetic field and the retained cells were collected (magnetic-positive cell population) as elute using the plunger after a dilution buffer washing step with a total volume of 1 ml.

Sample preparation and detection of epithelial tumor cells by immunocytochemistry

The magnetically enriched cell fractions were spun down onto polylysine-coated glass slides (Sigma) in a cytocentrifuge (Hettich, Tuttlingen, Germany) at 1,500 rpm for 10 min. Slides were air-dried overnight at room temperature. The slides were washed in PBS, and cytokeratin-expressing cells were revealed by incubation with freshly prepared Fast Red TR/Naphthol AS-MX substrate solution for 15 minutes in humidity chamber at room temperature. Slides were washed once with PBS and stained with Mayer's

haematoxylin solution (Sigma) for 30 sec at room temperature. Slides were then washed once with double distilled water, and air-dried. Finally, slides were mounted with Kaiser's glycerol gelatin (Merck, Darmstadt, Germany) for the permanent record. The cytopsins were evaluated by light microscopy, and CK+ cells were counted by 2 researchers with experience in the determination of tumor cells. The cytosin slides were examined in a blinded fashion. All positive cells evaluated as CK+, showed a strong cytoplasmic staining pattern, and the cytomorphology was consistent with a malignant cell.

Analysis of recovery experiments by immunocytochemistry

Venous blood (10 ml) from healthy volunteers were spiked with varying numbers of tumor cells (3,000, 1,000, 500, 50 cells) from 3 human breast cancer cell lines (MCF-7, MDA-MB-231 or T47D). To detect epithelial tumor cells, each one of the fractions were separately processed as described above. After immunomagnetic enrichment of tumor cells, CK+ cells were detected by immunocytochemistry (as described above).

Analysis of recovery experiments by flow cytometry

Venous blood (5 ml) from healthy volunteers were spiked with varying numbers of tumor cells (3,000, 1,000 cells) from 2 human breast cancer cell lines (MCF-7 or MDA-MB-231). A double gradient was formed by layering 2.5 ml of HISTOPAQUE-1077 over an equal volume of HISTOPAQUE-1119. Spiked blood samples were carefully layered onto the upper HISTOPAQUE-1077 medium. The tubes were then centrifuged at 700g for 30 min. Each one of the fractions (MNC and GC) were separately processed, washed in 50 ml PBS and then stained for 20 minutes at 4°C with 10 µl of Quantum Red conjugated anti-human CD45 (clone: BRA-55, Sigma) and 10 µl of FITC-conjugated anti-human epithelial antigen Ber-EP4 MAbs (clone: Ber-EP4, Dako). After incubation, cells were harvested by centrifugation (at 100g and 4°C for 10 min), washed twice in cold PBS supplemented with 2% FCS and 0.1% sodium azide, and finally resuspended in 500 µl of a 2% paraformaldehyde solution. Samples were analyzed by flow cytometry on an EPICS Elite ESP flow cytometer (Coulter, Hialeah, Florida). Flow cytometry histograms were generated by logarithmic amplification of fluorescence emitted by single viable cells. Cells labeled with appropriated isotopes control were included as control.

Statistical analysis

The patient characteristics were related to the presence of CK+ cells in PB by using Fisher's exact test. When a variable was ordered a trend analysis was applied. Actuarial curves for progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) were calculated by the Kaplan-Meier method. PFS and OS were calculated from the date of the primary detection of CK+ cells in PB to the date of disease progression or death. Disease progression was defined as both metastatic recurrence of nonmetastatic patients and progression of metastatic patients. All statistical calculations were carried out using the STATA 7-SE (Stata Inc., College Station, Texas, USA) Analysis Program. The cut-off point for significance was taken as $p = 0.05$.

RESULTS

Improvement of the yield of circulating tumor cells enrichment using a double density-gradient centrifugation

As a first step, we evaluated whether breast tumor cells sediment preferentially with MNC or GC fraction. Peripheral blood from healthy volunteers were spiked with varying numbers of tumor cells (3,000, 1,000, 500, 50 cells) from 3 human breast cancer cell lines (MCF-7, MDA-MB-231 or T47D). The spiked blood were centrifuged using a double density-gradient (HISTOPAQUE-1119 and -1077) to recovering the MNC and GC fractions. Each one of the fractions were separately processed to isolating CK+ cells. After immunomagnetic enrichment of tumor cells, CK+ cells were detected by immunocytochemistry (Fig. 1a). The majority of tu-

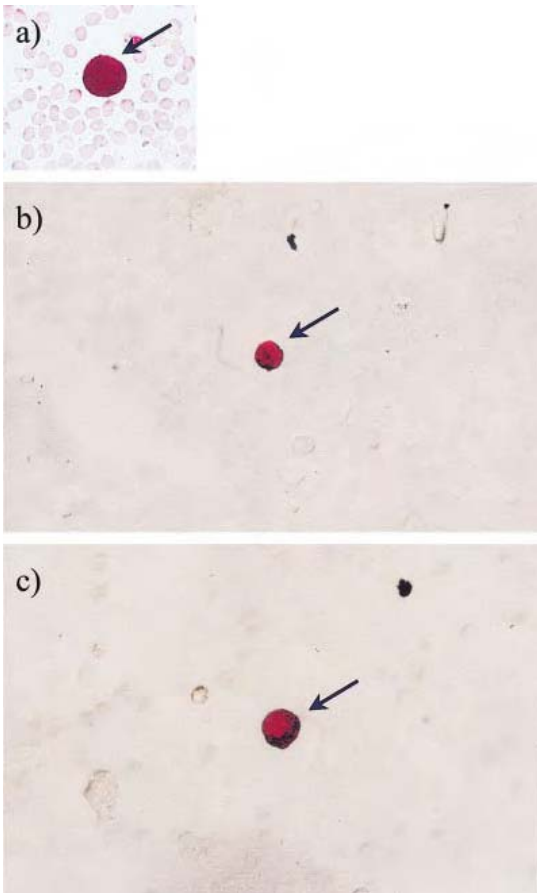


FIGURE 1 – CK+ cells (blue arrows) detected by immunocytochemistry. (a) Blood from a healthy volunteer spiked with MDA-MB-231 tumor cells. (b,c) Peripheral blood of 2 breast cancer patients. Invariably, cell fractions were processed for a positive immunomagnetic tumor cells separation and finally immunocytochemically labeled using the cytokeratin 7/8 antibody CAM5.2. CK+ cells show a strong cytoplasmic staining pattern, and the surrounding hematopoietic cells show no expression of cytokeratins. Total recovery rates using a double density-gradient and positive immunomagnetic enrichment of tumor cells in spiking experiments were in the range of 60–80%.

mor cells were observed to sediment with the MNC fraction (Fig. 2). Invariably, however, tumor cells were also detected in the GC fraction.

To confirm that tumor cells appear in GC fraction we carried out another experiment. PB from healthy volunteers were spiked with varying numbers of tumor cells (3,000, 1,000 cells) from 2 human breast cancer cell lines (MCF-7 or MDA-MB-231). The spiked blood were centrifuged using a double density-gradient (HISTOPAQUE-1119 and -1077) to recovering the MNC and GC fractions. Each one of the fractions (MNC and GC) were separately processed, and then labeled with anti-human CD45 and anti-human epithelial antigen Ber-EP4 MAbs. Finally, samples were analyzed by flow cytometry. The antibody Ber-EP4 reacts with two glycopeptides (MW 34000 and 39000) expressed in breast tumor cells, but not in hematopoietic cells. CD45 mAb reacts with the hematopoietic cells, but not with the breast tumor cells. Thus, tumor cells were detected as Ber-EP4 positive and

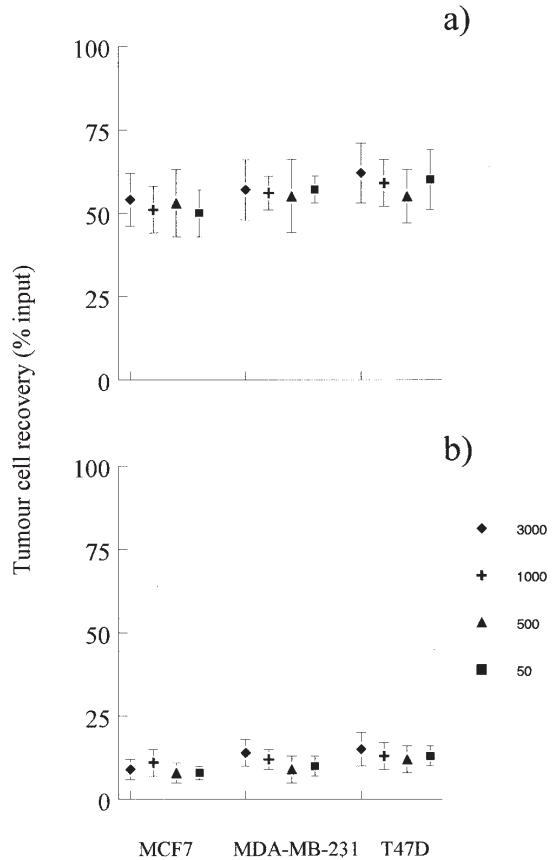


FIGURE 2 – Tumor cells recovery from (a) MNC and (b) GC leukocyte fractions after spiking blood from healthy volunteers with 3,000, 1,000, 500 and 50 tumor cells. Each one of the fractions were separately processed. After immunomagnetic enrichment, tumor cells were detected by immunocytochemistry. The results are the means of triplicate experiments. The mean and range of tumor cells recovered are shown.

TABLE II – FLOW CYTOMETRIC DETECTION OF Ber-EP4-POSITIVE AND CD45-NEGATIVE CELLS IN THE RECOVERY EXPERIMENT¹

	MCF7 cells spiked in 5 ml of PB (n)		MDA-MB-231 cells spiked in 5 ml of PB (n)	
	3000	1000	3000	1000
Recovery of tumour cells in MNC fraction (%)	47	49	53	55
Recovery of tumour cells in GC fraction (%)	6	5	7	6

¹Results are the means of triplicate experiments.

CD45 negative cells. The majority of tumor cells were observed to sediment with the MNC fraction however, tumor cells were also detected in the GC fraction (Table II).

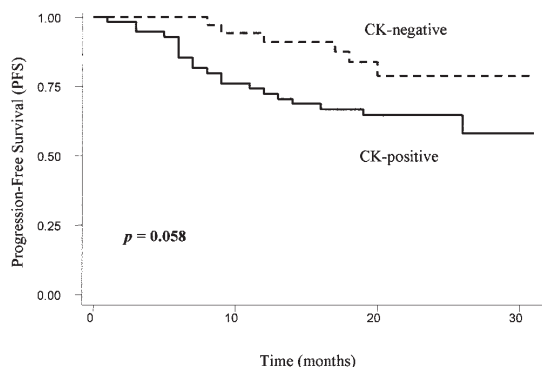


FIGURE 3 – Kaplan-Meier plot for progression-free survival (PFS) in 26 patients depending on the detection of CK-positive cells. There were 6 patients in the CK-negative group (dashed line) and 20 patients in the CK-positive group (solid line). PFS was calculated from the date of the primary detection of CK-positive cells in peripheral blood to the date of disease progression.

Efficacy and specificity of the method

Recovery rates using a double density-gradient (HIS-TOPAQUE-1119 and -1077) and positive immunomagnetic enrichment of tumor cells in our spiking experiments were in the range of 60–80% in calculations based on the total number of cells. Detection of CK+ cells by immunocytochemistry was carried out as described above. We could not detect CK-expressing cells in any of the samples from 16 healthy donors.

Correlation of CK+ cells in PB with clinic-pathological features

CK+ cells detected by immunocytochemistry in the PB of breast cancer patients show a strong cytoplasmic staining pattern, and the surrounding hematopoietic cells show no expression of cytokeratins (Fig. 1b,c). Correlation of CK+ cells in PB with patient characteristics are outlined in Table I. *p*-Values are based on Fisher's exact test for association for ordinal variables and χ^2 test for trend was applied. A total of 92 breast cancer patients were studied. Patient types entered in the study included: neoadjuvant ($n = 25$), adjuvant ($n = 42$) and metastatic ($n = 25$). The median age of the patients was 55 years (range = 26–77 years); 64% of all patients were older than 50 years. Fifty-four patients (59%) had a postmenopausal status. Tumors in Stage T2 were the most common (47%) followed by tumors in Stage T1 (20%). 27% of patients had tumor Stages T3 and T4. The nodal status was positive in 74% of patients. Ductal breast cancer was the most frequent (70%) histological type.

CK+ cells in PB were identified in 57 of 92 (62%) breast cancer patients with a range of 1–61 cells (median = 8). There were significant differences in the presence of CK+ cells according to estrogen receptor expression ($p = 0.049$), and lymph node status ($p = 0.033$), but not to age ($p = 0.827$), menopausal status ($p = 0.521$), type of patient ($p = 0.679$), TNM stage ($p = 0.543$), histological type ($p = 0.802$), progesterone receptor expression ($p = 0.461$), c-erbB2 expression ($p = 1.000$), p53 expression ($p = 0.559$), or Ki67 expression ($p = 0.897$). Regarding the relationship between tumor size and the presence of CK+ cells a borderline significant trend was observed ($p = 0.07$).

Prognostic analysis

Kaplan-Meier analysis of the progression free survival and overall survival depending on the detection of CK+ cells are presented in Figures 3 and 4, respectively. Follow-up data were taken from the time of the last clinic appointment or the date of

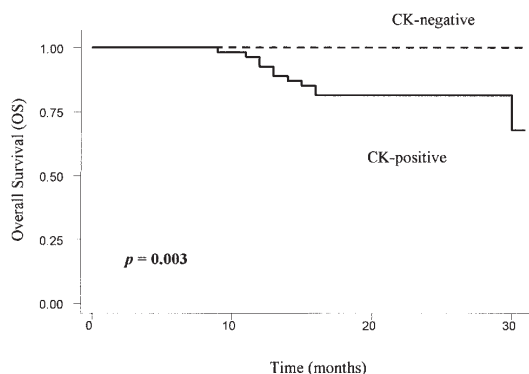


FIGURE 4 – Kaplan-Meier plot for overall survival (OS) in 90 patients depending on the detection of CK-positive cells. There were 34 patients in the CK-negative group (dashed line) and 56 patients in the CK-positive group (solid line). Only tumor-specific death was counted.

death (median follow-up = 21 months; range = 2–31 months). Complete follow-up data were available from 90 patients. Statistical analysis (Kaplan-Meier analysis) showed that the primary detection of CK+ cells in PB was positively correlated with disease progression ($p = 0.058$). A total of 26 patients developed disease progression during follow-up. Twenty of these patients had CK+ cells in PB. Most strikingly, the correlation with the survival data showed that, among 92 patients admitted to the study, 11 patients died and all of them had CK+ cells in PB. In contrast, all patients without CK+ cells are still alive. Likewise, the Kaplan-Meier survival analysis showed that the presence of CK+ cells in PB was associated with short survival ($p = 0.003$).

DISCUSSION

Some methodological aspects in our study have to be addressed. Our detection method applying immunomagnetic enrichment followed by immunocytochemistry had been standardized previously.⁷ Immunocytochemistry is a sensitive and specific technique that can be used to identify breast cancer cells in PB.^{4,8} Cytokeratins are stably expressed and are specific markers of epithelial tumor cells in PB.^{9,10} Current assays for detecting circulating breast tumor cells are limited primarily by the lack of tumor-specific markers, being cytokeratin one of the most used markers to this end. Cytokeratins are part of the cytoskeleton of epithelial cells and therefore represent a unique feature of epithelial cells; however, constitutive low-level (illegitimate) expression of CK have been reported in peripheral-blood mononuclear cells in healthy controls. This could be the origin of false positive results when circulating tumor cells are detected by RT-PCR.

To ensure high specificity of the assay, we have incorporated the following controls and precautions in our study: (i) the positive controls (tumor cell lines-spiked controls) were processed separately from patient samples, to avoid contamination; (ii) the first milliliters of blood collected from the patients were discarded to avoid contamination with squamous cells; (iii) we have used an immunomagnetic enrichment method followed by immunocytochemistry previously standardized⁷; (iv) Fc receptors from cells were blocked with FcR blocking reagent to avoid unspecific binding previously to the incubation of cells with the anti-Cytokeratin mAb; and (v) we have used the mAb CAM5.2 (anti-cytokeratin 7/8) for specific magnetic labeling of breast tumor cells. Different independent studies evaluating several MABs for detection of disseminated tumor cells have demonstrated that the mAb CAM5.2 produces a strong uniform staining of primary carcino-

mas derived from many organs, including breast.⁷ Although cytokeratin has been validated as a valuable marker for breast cancer in many clinical studies, it is not a tumor cell-specific marker and could result in weak cytoplasmic staining of some hematological cells. Thus, in our assay, only the cells with a strong uniform cytoplasmic staining were evaluated as CK+ cells. The specificity of the assay was confirmed in control healthy volunteers; CK-expressing cells were not detected in any of them. The assay was carried out as blinded study with PB samples from healthy donors and breast cancer patients. PB samples from volunteers and breast cancer patients were obtained at the Hospital and then processed at the Department of Health Sciences (University of Jaén) without previous inform.

The frequency of detection of CK+ cells in PB varies among studies.^{5,8} For a reliable comparison of results, international standardization of detection protocols would be desirable. It is accepted that the method for tumor cell isolation may be critical.⁹ Cellular loss is estimated to be up to 60% during the various steps that precede microscopic examination.⁴ As a first step, most enrichment protocols use Ficoll density gradient centrifugation to obtain MNC fraction.⁹ Our results showed that epithelial tumor cells sediment preferentially with the MNC but also with GC fractions when breast cancer cell lines were used to spike blood from healthy volunteers. Nevertheless, the results from these experimental model may not predict results with clinical specimens. In fact, tumor cells from cultured cell lines are very homogeneous, whereas circulating tumor cells vary widely in size, shape and weight. Therefore, it is reasonable to assume that an important number of tumor cells sediment with GC fraction in clinical samples. In agreement with this hypothesis, Partridge *et al.*¹¹ reported that tumor cells sediment with GC fraction when they analyzed blood samples obtained from patients with head and neck squamous cell carcinoma. Our data suggest that breast tumor cells may be missed if only MNC fractions are examined. We therefore recommend examination of MNC and GC fractions in all enrichment protocols.

In our present study, CK+ cells in PB were detected in 62% of breast cancer patients when MNC and GC fractions were assessed. The overall CK+ rate reported in the present study is higher those published in previous studies.^{12,13} Other studies, however, have reported higher or similar percentages of CK+ cells in PB than those showed in our present study. Racila *et al.*¹⁴ showed that CK+ cells in PB were present in 32 of 33 breast cancer patients using a combination of immunomagnetic enrichment method and flow cytometry. Engel *et al.*⁶ evaluated PB specimens from patients with breast and ovarian cancer and detected CK+ cells in 35 of 48 patients (72.9%) using a combination of magnetic activated cell sorting (MACS) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Molnar *et al.*¹⁵ found circulating tumor cells in 24 of 32 (75%) colorectal cancer patients. These authors use the same procedure (Carcinoma Cell Enrichment Kit; Miltenyi Biotec) that we have used in our study.

Martin *et al.*⁷ evaluated PB specimens from patients with carcinoma of the breast, prostate, colon, rectum and lung, and detected CK+ cells in 21 of 34 patients (61.8%) using the same immunomagnetic enrichment method that we use. It is important to note that the results reported by these authors are very similar to the results showed in the present study (62%). Thus the divergent results reported by the different authors could be due to the diverse methods used to detect CK+ cells.

We found CK+ cells not only in patients with advanced breast cancer tumors (13/17 cases [76.5%] in T4 tumors) but also in 9/18 cases (50%) with a small tumor (T1) (Table I). Our data suggest an association between the presence of CK+ cell in PB and lymph node status ($p = 0.033$) (Table I). Nevertheless, 5/15 node-negative (N0) patients (33.3%) had detectable CK+ cells in the PB. Thus, these findings suggest that the assay could identify early tumor cell dissemination into the peripheral bloodstream. Our data suggest that presence of tumor cells in PB could be an event more

frequent than expected. On the other hand, we were not able to show any significant correlation between the presence of CK+ cell in PB with the biomarkers, *cerbB-2*, *p53* or *Ki67* (Table I).

It is important to note that 19 of 25 metastatic patients were out-patients returning for follow-up and they had completed their treatment (chemotherapy, surgery, radiotherapy or hormonal therapy) as a minimum 24 weeks before blood collection. Six of 25 of these patients were diagnosed as metastatic at the time to enter in the protocol of study, thus these patients had not received any treatment before blood collection. Most of the published studies have found differences in the detection rates for circulating tumor cells between metastatic and nonmetastatic patients. The fact that a heterogeneous population of metastatic patients were included in the present study (76% of metastatic patients were treated previously and 24% of these one did not) could explain that we have not found significant differences between metastatic and nonmetastatic patients. The detection rates reported in the present study in nonmetastatic patients are higher than many authors have previously reported. Nevertheless, our results suggest that the presence of breast tumor cells in PB could be an event more frequent than expected in nonmetastatic patients. These results are in agreement with those reported by Solakoglu *et al.*¹⁶ that found CK+ cells in bone marrow in 78.9% of patients without metastasis (M_0).

The detection of tumor cells in bone marrow in primary breast cancer is a known prognostic factor for disease-free and overall survival^{1,17} but, to date, conclusive results have not been reported in PB. We showed that detection of CK+ cells in PB before chemotherapy significantly correlated with both progression-free survival and overall survival (Figures 3,4). Therefore, with a median follow-up period of 21 months, detection of CK+ cells in PB seems to be predictive of early progression.

Interestingly, there was a significant association ($p = 0.049$) between presence of CK+ cells in PB and ER status of primary tumor when we analyze data obtained from all patients (metastatic and nonmetastatic). Our results suggest that the expression of ER could confer to breast tumor cells some advantage properties, *i.e.*, facilitating tumor cell entry into bloodstream or preventing cell apoptosis. In this context, a recent study¹⁸ showed that many but not all endogenous estradiol metabolites elicit a biphasic pattern of proliferation in the receptor-positive breast cancer cell line, *i.e.*, at low concentrations a stimulatory effect and at high concentration an inhibitory effect on cell growth. It has also been shown that estrogen could prevent apoptosis through ER-mediated mechanisms.¹⁹

In breast cancer patients, therapeutic decisions should be made using well-accepted prognostic and predictive indicators. Estrogen receptor (ER) status is important for determining the treatment and the prognosis of breast cancer patients. There is a general consensus that patients with ER-positive breast tumors have longer overall survival than patients with ER-negative tumors, but this is restricted partly to specific subgroups.^{20–22} Watts *et al.*²³ suggested that overexpression of cyclinD1 in ER-positive tumors may lead to insensitivity of antiestrogens. Costa *et al.*²² reported that PR seemed to be comparable to ER status in predicting the prognosis of primary breast cancer patients. It is imperative, therefore, to identify newer prognostic and predictive markers that could support treatment decisions for patients with breast cancer. Our results suggest that because tumorigenic and metastatic potential of circulating tumor cells have been demonstrated,^{1,2} detection of CK+ cells in PB seems to be a good indicator of early systemic tumor cell dissemination and could lead to identify a subgroup of breast cancer patients (including patients with ER+ breast tumors) with poor prognosis.

We conclude that, although larger series and longer follow-up are needed to confirm our results, our present study suggests that detection of CK+ cells in PB before chemotherapy might identify breast cancer patients with poor prognosis.

REFERENCES

1. Fehm T, Sagalowsky A, Clifford E, Beitsch P, Saboorian H, Euhus D, Meng S, Morrison L, Trucker T, Lane N, Ghadimi BM, Heselmeyer-Haddad K, et al. Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant. *Clin Cancer Res* 2002;8:2073–84.
2. Pretlow T, Schwartz S, Giaconia JM, Wright AL, Grimm HA, Edgehouse NL, Murphy JR, Markowitz SD, Jamison JM, Summers JL, Hamlin CR, MacLennan GT, et al. Prostate cancer and other xenografts from cells in peripheral blood of patients. *Cancer Res* 2000;60:4033–6.
3. Pelkey TJ, Frierson HF, Bruns DE. Molecular and immunological detection of circulating tumor cells and micrometastases from solid tumors. *Clin Chem* 1996;42:1369–81.
4. Goeminne JC, Guillaume T, Symann M. Pitfalls in the detection of disseminated non-hematological tumor cells. *Ann Oncol* 2000;11:785–92.
5. Kasimir-Bauer S, Oberhoff C, Sliwinska K, Neumann R, Schindler AE, Seeber S. Evaluation of different methods for the detection of minimal residual disease in blood and bone marrow of patients with primary breast cancer: importance for clinical use? *Breast Cancer Res Treat* 2001;69:123–32.
6. Engel H, Kleespies C, Friedrich J, Breidenbach M, Kallenborn A, Schöndorf T, Kolhagen H, Mallmann P. Detection of circulating tumor cells in patients with breast or ovarian cancer by molecular cytogenetics. *Br J Cancer* 1999;81:1165–73.
7. Martin VM, Siewert C, Scharl A, Harms T, Heinze R, Öhl S, Radbruch A, Miltenyi S, Schmitz J. Immunomagnetic enrichment of disseminated epithelial tumor cells from peripheral blood by MACS. *Exp Hematol* 1998;26:252–64.
8. Beitsch PD, Clifford E. Detection of circulating cells in the blood of breast cancer patients. *Am J Surg* 2000;180:446–9.
9. Pantel K, Otte M. Occult micrometastasis: enrichment, identification and characterization of single disseminated tumor cells. *Semin Cancer Biol* 2001;11:327–37.
10. Diel IJ, Cote RJ. Bone marrow and lymph node assessment for minimal residual disease in patients with breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2000;26:53–65.
11. Partridge M, Phillips E, Francis R, Li SR. Immunomagnetic separation for enrichment and sensitive detection of disseminated tumor cells in patients with head and neck SCC. *J Pathol* 1999;189:368–77.
12. Witzig TE, Bossy B, Kimlinger T, Roche PC, Ingle JN, Grant C, Donohue J, Suman VJ, Harrington D, Torre-Bueno J, Bauer KD. Detection of circulating cytokeratin-positive cells in the blood of breast cancer patients using immunomagnetic enrichment and digital microscopy. *Clin Cancer Res* 2002;8:1085–91.
13. Kasimir-Bauer S, Oberhoff C, Schindler AE, Seeber S. A summary of two clinical studies on tumor cell dissemination in primary and metastatic breast cancer: methods, prognostic significance and implication for alternative treatment protocol. *Int J Oncol* 2002;20:1027–34.
14. Racila E, Euhus D, Weiss AJ, Rao C, McConnell J, Terstappen LW, Uhr JW. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:4589–94.
15. Molnar B, Ladnyi A, Tanko L, Sréter L, Tulassay Z. circulating tumor cell clusters in the peripheral blood of colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2001;7:4080–5.
16. Salakoglu O, Maierhofer C, Lahr G, Breit E, Scheunemann P, Heumos I, Pichlmeier U, Schlimok G, Oberneder R, Köllermann MW, Köllerman J, Speicher MR, et al. Heterogeneous proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors. *PNAS* 2002;99:2246–51.
17. Braun S, Pantel K, Müller P, Janni W, Hepp F, Kentenich CR, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmüller G, Schlimok G. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with Stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* 2000;342:525–33.
18. Lippert C, Seeger H, Mueck AO. The effect of endogenous estradiol metabolites on the proliferation of human breast cancer cells. *Life Science* 2003;72:877–83.
19. Song RXD, Santen RJ. Apoptotic action of estrogen. *Apoptosis* 2003;8:55–60.
20. Kenny FS, Hui R, Musgrove EA, Gee JM, Blamey RW, Nicholson RI, Sutherland RL, Robertson JF. Overexpression of Cyclin D1 messenger RNA predicts for poor prognosis in estrogen receptor positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5:2069–76.
21. Utsumi T, Yoshimura N, Maruta M, Takeuchi S, Ando J, Mizoguchi Y, Harada N. Correlation of cyclin D1 mRNA levels with clinicopathological parameters and clinical outcome in human breast carcinomas. *Int J Cancer* 2000;89:39–43.
22. Costa SD, Lange S, Klinga K, Merkle E, Kaufmann M. Factors influencing the prognostic role of oestrogen and progesterone receptor levels in breast cancer-results of the analysis of 670 patients with 11 years of follow-up. *Eur J Cancer* 2002;38:1329–34.
23. Watts CK, Brady A, Sarcevic B, de Fazio A, Musgrove EA, Sutherland RL. Antiestrogen inhibition of cell cycle progression in breast cancer cells is associated with inhibition of cyclin-dependent kinase activity and decreased retinoblastoma protein phosphorylation. *Mol Endocrinol* 1995;9:1804–13.

Capítulo 2

Desarrollo de una nueva metodología que permite de forma individual realizar el análisis simultáneo del fenotipo y genotipo de las células tumorales circulantes.

Trabajo publicado en 2008, con título **“Phenotypic and genetic characterization of circulating tumor cells by combining immunomagnetic selection and FICTION techniques”**, en la revista *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*.

- Índice de impacto de la revista = 2,381
- Categoría a la que pertenece: Bbiología Celular
- Cuartil que ocupa: tercer cuartil
- Rango en la categoría (2010): 116/178.

ARTICLE

Phenotypic and Genetic Characterization of Circulating Tumor Cells by Combining Immunomagnetic Selection and FICTION Techniques

María Campos, Celia Prior, Fernando Warleta, Isabel Zudaire, Jesús Ruíz-Mora, Raúl Catena, Alfonso Calvo, and José J. Gaforio

Immunology Division, Department of Health Sciences, Faculty of Experimental Sciences, University of Jaén, Jaén, Spain (MC,FW,JR-M,JJG); Division of Oncology, Center for Applied Medical Research (CIMA), Pamplona, Spain (CP,IZ,RC,AC); and Department of Genetics (IZ) and Department of Histology and Pathology (RC,AC), University of Navarra, Pamplona, Spain

SUMMARY The presence of circulating tumor cells (CTCs) in breast cancer patients has been proven to have clinical relevance. Cytogenetic characterization of these cells could have crucial relevance for targeted cancer therapies. We developed a method that combines an immunomagnetic selection of CTCs from peripheral blood with the fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics as a tool for investigation of neoplasm (FICTION) technique. Briefly, peripheral blood (10 ml) from healthy donors was spiked with a pre-determined number of human breast cancer cells. Nucleated cells were separated by double density gradient centrifugation of blood samples. Tumor cells (TCs) were immunomagnetically isolated with an anti-cytokeratin antibody and placed onto slides for FICTION analysis. For immunophenotyping and genetic characterization of TCs, a mixture of primary monoclonal anti-pancytokeratin antibodies was used, followed by fluorescent secondary antibodies, and finally hybridized with a TOP2A/HER-2/CEP17 multicolor probe. Our results show that TCs can be efficiently isolated from peripheral blood and characterized by FICTION. Because genetic amplification of *TOP2A* and *ErbB2* (*HER-2*) in breast cancer correlates with response to anthracyclines and herceptin therapies, respectively, this novel methodology could be useful for a better classification of patients according to the genetic alterations of CTCs and for the application of targeted therapies. (J Histochem Cytochem 56:667–675, 2008)

KEY WORDSbreast cancer
circulating tumor cells
cytokeratin expression
FICTION
ERBB2 (*HER-2/neu*) gene
immunomagnetic selection
TOP2A gene

BREAST CANCER is the most frequent type of cancer in women (Parkin et al. 2005). Because of its high incidence and good prognosis, breast cancer is the most prevalent cancer in the world today. Approximately 4.4 million women who were diagnosed with breast cancer within the last 5 years are still alive (Parkin et al. 2005). Despite the improvement in detection and treatment, ~30% of newly diagnosed women with breast cancer will die. In most cases, death results from the dissemination of cancer cells through lymphatic or blood vessels and the development of distant metastases.

The *ErbB2* oncogene (also known as *c-erbB2/HER-2/neu*) is the most frequently amplified oncogene in breast cancer (20–35% of invasive breast tumors) (Pauletti et al. 1996; Press et al. 1997; Ross and Fletcher 1999), which correlates with poor clinical outcome (Järvinen and Liu 2003). *ErbB2* is localized at 17q12-q21 and encodes a 185-kDa tyrosine kinase protein that belongs to the epidermal growth factor (EGF) receptor family. Although there is no known ligand for *ErbB2*, heterodimerization with other members of the EGF receptor family causes a strong mitotic response (Olayioye et al. 2000; Yarden and Slwkowski 2001). Patients with *ErbB2* gene amplification or protein overexpression are eligible for trastuzumab (Herceptin) therapy.

TOP2A, a gene that codes for the protein topoisomerase-II α , is another key gene for breast cancer. *TOP2A* is located at the *ErbB2* region and has been found altered in almost 90% of primary breast

Correspondence to: José J. Gaforio, PhD, MD, Immunology Division, Department of Health Sciences, Faculty of Experimental Sciences, Campus las Lagunillas, University of Jaén, 23071 Jaén, Spain. E-mail: jgaforio@ujaen.es

Received for publication February 22, 2008; accepted March 27, 2008 [DOI: 10.1369/jhc.2008.951111].

cancers with *ErbB2* amplification (Järvinen et al. 1999, 2000). However, although 40% of those cases have a coamplification of both genes, in another 40% of the tumors, *TOP2A* has been found deleted (Järvinen and Liu 2003). Breast cancer cells with high topoisomerase-II α expression show a better response to anthracyclines (such as doxorubicin, epirubicin, or idarubicin) (Järvinen and Liu 2003, 2006; Hannemann et al. 2006). Therefore, the determination of genomic amplification of either *ErbB2* or *TOP2A* in breast cancer patients is critical for administering an effective targeted therapy.

Breast cancer has been shown to shed tumor cells into the circulation, even at the earliest stages of primary tumor development (Gaforio et al. 2003). Pretlow et al. (2000) have shown that circulating tumor cells (CTCs) isolated from peripheral blood (PB) of patients with cancer are able to develop metastasis when xenotransplanted into nude mice. Thus, the early detection of CTCs may have important therapeutic and prognostic implications. The number of CTCs in PB from breast cancer patients has clinical relevance (Gaforio et al. 2003; Cristofanilli et al. 2005; Cristofanilli and Mendelsohn 2006; Müller et al. 2006; Camara et al. 2007), not just as an indicator of overall survival, but also as a disease progression marker and/or metastatic marker. However, little attention has been paid to the cytogenetic features of such cells.

In 1992, Weber-Matthiesen et al. (1992) developed a new technique for simultaneous immunophenotyping and interphase cytogenetics analyses using cell lines. The method was referred to as fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics as a tool for investigation of neoplasm (FICTION). This technique was shown to be very useful in the study of hematological neoplasms (Nylund et al. 1993; Haferlach et al. 1997; Temple et al. 2004; Young et al. 2006). In this study, we show the development of a novel method that combines immunomagnetic selection of tumor cells (TCs) with cytogenetic characterization by FICTION analysis. With this method, we were able to isolate TCs from a 10-ml blood sample, immunophenotype them (with anti-cytokeratin antibodies), and analyze *ErbB2*, *TOP2A*, and *CEP17* gene copy number.

Materials and Methods

Materials

Cell culture media MEM with Earle's salt and RPMI-1640 and fetal calf serum (FCS) were obtained from PAA Laboratories (Pasching, Austria). Penicillin-streptomycin, PBS, formaldehyde 37% solution (formalin), Igepal, Histopaque 1077, Histopaque 1119, poly-L-lysine-coated glass slides, and Fast Red TR/Naphthol AS-MX substrate were purchased from Sigma (St. Louis, MO). The Carcinoma Cell Enrichment and Detection Kit, the MACS MS Columns, anti-

cytokeratin 7/8 antibody (isotype: mouse IgG2a) conjugated to FITC, and anti-FITC antibody (Isotype: mouse IgG1) conjugated to alkaline phosphatase were obtained from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany). Mouse anti-human AE1-AE3 antibody was purchased from BioGenex (San Ramon, CA). This is a bclonal mouse antibody cocktail that recognizes cytokeratins 1/2/3/4/5/6/7/8 (clone: AE1; immunoglobulin class: IgG1) and cytokeratins 10/14/15/16/19 (clone: AE3; immunoglobulin class: IgG1). Secondary antibodies Alexa Fluor 350 rabbit anti-mouse IgG (H+L) and Alexa Fluor 350 goat anti-rabbit IgG (H+L) and the Slow Fade Light Antifade Kit were obtained from Invitrogen (Eugene, OR). The LSI TOP2A/HER-2/CEP17 multicolor probe was purchased from Abbott Molecular (Vysis; Des Plaines, IL). Sodium chloride-sodium citrate buffer (SSC) was obtained from MP Biomedicals Europe (Illkirch, France). Methanol, acetone, and ethanol absolute were purchased from Panreac Quimica (Barcelona, Spain). Acetic acid (glacial), Mayer's hematoxylin, and Kaiser's glycerol gelatin were obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

Cell Lines

The human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231, known to have no *ErbB2* amplification, were obtained from the American Type Cultured Collection (ATCC; Rockville, MD). SK-Br-3, a human breast cancer cell line with *ErbB2* amplification, was obtained from Eucellbank (Barcelona, Spain). MCF-7 and MDA-MB-231 cells were grown in MEM with Earle's salt, supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated FCS and 1% of a stock solution of penicillin-streptomycin. SK-Br-3 was grown in RPMI 1640, supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated FCS and 1% of a stock solution of penicillin-streptomycin. Cells in the exponential growth phase were used for all experiments.

Blood Sample Processing and Density Gradient Separation

PB samples (10 ml) from nine healthy volunteers were obtained in heparinized tubes (BD Vacutainer; Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) and spiked with 1000 MCF-7, MDA-MB-231, or SK-Br-3 breast cancer cells. As negative controls, we processed three different samples without breast cancer cells. All samples were obtained with previous informed consent of healthy donors. A double-density ficoll gradient was prepared by placing 5 ml Histopaque 1077 in a tube containing an equal volume of Histopaque 1119. Blood samples were carefully placed onto the upper layer of Histopaque 1077, and tubes were centrifuged at $700 \times g$ for 30 min at 20°C. The mononuclear cell fraction (plasma/1077 interphase) and granulocyte fraction (1077/1119 interphase) were isolated, and both fractions were

mixed and washed in 50 ml PBS by centrifugation at $200 \times g$ for 15 min, according to previous publications (Gaforio et al. 2003).

Cell Enrichment by Immunomagnetic Separation

Tumor cells were immunoseparated using the Carcinoma Cell Enrichment and Detection Kit, with some modifications. Briefly, after cell permeabilization, the cell pellet was resuspended in 40 ml dilution buffer plus 5 ml MACS CellPerm Solution and incubated for 5 min at room temperature. Cells were fixed by adding 5 ml CellFix Solution for 30 min at room temperature. Cells were washed twice, resuspended in 600 μ l MACS CellStain Solution, incubated with 200 μ l Fc-Blocking Reagent, and immunomagnetically labeled with 200 μ l MACS anti-cytokeratin microbeads (microbeads conjugated to a monoclonal anticytokeratin 7/8 antibody; clone: CAM5.2).

After a 45-min incubation at room temperature, cells were washed, resuspended in 1 ml CellStain Solution, and placed onto a MACS MS column. Unlabeled cells were washed off the column with $3 \times 500 \mu$ l dilution buffer. The column was removed from the magnetic field, and the retained cells (magnetic-positive cell population) were eluted with 1 ml dilution buffer. The magnetically enriched cell fractions were spun down onto poly-L-lysine-coated glass slides in a cytocentrifuge (Hettich; Tuttlingen, Germany) at 1500 rpm for 10 min. Slides were air-dried overnight at room temperature and stored at -20°C without fixation.

LSI TOP2A/HER-2/CEP17 Probes

The LSI TOP2A/HER-2/CEP17 multicolor probe includes a TOP2A probe labeled with SpectrumOrange, an ERBB2 (HER-2/neu) probe labeled with SpectrumGreen, and a chromosome enumeration probes CEP17, labeled with SpectrumAqua.

FICTION

Previously published protocols for FICTION were used (Weber-Matthiesen et al. 1992), with some modifications. After thawing, slides were fixed in an ice-cold mixture of methanol and acetone (1:1) for 5 min and air dried. Slides were hydrated in PBS for 5 min and incubated for 30 min with a blocking solution (10% rabbit serum in PBS) before primary antibody incubation. The slides were washed in PBS for 5 min and incubated with the biclonal mouse anti-AE1-AE3 antibody overnight at 4°C , diluted 1:200 in PBS containing 10% FCS. The revelation was conducted by applying two sequential layers of secondary antibodies (1:50 dilution in PBS for both of them, 30 min at room temperature): Alexa Fluor 350 rabbit anti-mouse IgG and goat anti-rabbit IgG. After fluorescent immunophenotyping, slides were coverslipped under PBS for evaluation under a Zeiss

Axioplan 2 epifluorescence microscope (Carl Zeiss; Jena, Germany), with appropriate filter sets. ISIS software (MetaSystems; Altlussheim, Germany) was used for evaluation throughout.

After assessment of positive (tumor) cells on the slides, samples were fixed with Carnoy's solution (3:1 methanol: acetic acid fixative), rinsed in distilled water for 1 min, fixed in 1% formaldehyde, and rinsed again in distilled water for 1 min. After dehydration in an ethanol series (70%, 80%, and 100%) and air dried, slides were codenatured with the LSI TOP2A/HER-2/CEP17 multicolor probe for 5 min at 85°C and hybridized overnight in a humidified chamber at 37°C . Posthybridization wash was carried out at 72°C in $2 \times \text{SSC}/0.3\%$ Igepal, pH 7, for 2 min, followed by another wash at room temperature. Finally, slides were mounted with the Slow Fade Light Antifade Kit. Microscopic evaluation was carried out with the microscope and software imaging system described above.

A minimum number of 50 morphologically intact and non-overlapping nuclei were scored in every sample to determine the number of hybridization signals for each ErbB2, TOP2A, and CEP17 probe. Both absolute copy numbers and the relative copy number ratio (ratio between the mean number of ErbB2 or TOP2A signals and the mean number of chromosome 17 centromere signals) were determined. A [ErbB2 or TOP2A]/CEP17 ratio ≥ 1.5 was considered gene amplification. Similarly, ratios ≤ 0.7 were considered gene deletions.

Analysis of Cell Recovery

To determine the number of cells recovered, we applied the double-density ficoll gradient and immunomagnetic separation describe previously, followed by immunocytochemistry (using anti-cytokeratin antibodies) for quantification of positive cells. Briefly, we used 10 ml of blood from healthy volunteers that was spiked with 1000 cells (MCF-7, MDA-MB-231, or SK-BR-3 cell lines). After double-density ficoll gradient, immunomagnetic labeling, and separation, cells were subjected to cytopspin and stored at -20°C without fixation. After thawing, slides were stained with 100 μ l of anti-cytokeratin 7/8 conjugated to FITC (isotype: mouse IgG2a) for 10 min at room temperature and further labeled with 10 μ l anti-FITC antibody conjugated to alkaline phosphatase (isotype: mouse IgG1) for 10 min at room temperature. Slides were washed in PBS for 5 min, and cytokeratin-expressing cells were detected by incubation with Fast Red TR/Naphthol AS-MX substrate solution for 15 min in a moist chamber. Slides were washed in PBS, counterstained with Mayer's hematoxylin, and mounted with Kaiser's glycerol gelatin. Cytokeratin-expressing cells (CK+) were counted separately by two expert researchers. All experiments were done in triplicate.

Results

Efficiency of the TCs Immunoselection Method

Cell recovery was in the range of 60–80% for the three cell lines studied (Table 1), which is similar to what was described in previous studies (Gaforio et al. 2003). All tumor cells (CK+) showed a strong cytoplasmic staining pattern, and the cell morphology was consistent with a malignant phenotype (Figures 1A–1C). According to previous publications, although tumor cells were specifically immunoselected, some white blood cells could be seen in the positive tumor fraction (Figures 1A–1C). Immunophenotyping was also conducted with mouse anti-cytokeratins antisera followed by two layers of fluorescent antibodies (Alexa Fluor 350 rabbit anti-mouse and Alexa Fluor 350 goat anti-rabbit). This procedure rendered an excellent labeling of tumor cells for the three lines analyzed (Figures 1D–1F).

FICTION Analysis of the Selected TCs

Breast cancer cells were unequivocally distinguished among the white blood cells by their blue color provided by the immunofluorescent labeling (Figures 2A–2C). The three tumor cell lines displayed a well-preserved morphology (Figures 2A–2C).

Hybridization signals for *ErbB2*, *TOP2A*, and *CEP17* were also clearly observed in both tumor cells and leukocytes (Figures 2A–2F). All leukocytes showed two signals for *ErbB2*, *TOP2A*, and *CEP17*, thus serving as internal controls. Quantitative results of the number of signals found in tumor cells are given in Table 2. The most common genetic pattern for the cell line MCF-7 was the presence of three copies of chromosome 17 (*CEP17*) but two copies of *ErbB2* (mean, 2.02 ± 0.24 copies/cell) and *TOP2A* (mean, 2.01 ± 0.26 copies/cell; Figure 2D; Table 2). In the case of MDA-MB-231 cells, two patterns were basically found. The predominant one (accounting for 91.33% of the cells) showed trisomy of *CEP17*. The other one was tetrasomic for *CEP17* (which was observed in 8.67% of the cells). In general, neither of these populations presented *ErbB2* or *TOP2A* amplifications or deletions (average ratio with respect to *CEP17* being 1.01 for both genes; Table 1). The cell line SK-Br-3 showed many copies of *ErbB2*, *TOP2A*, and *CEP17* (Figure 2F).

The average copy number for *ErbB2* was 25.87 ± 7.39 , whereas for *TOP2A*, it was 9.48 ± 2.55 . Gene amplification for *ErbB2* (3.81-fold relative to *CEP17*) was found in this cell line. In negative control samples, no hybridization signals or blue-positive cells were detected.

Discussion

Studies from our group and from others have shown that the number of CTCs in breast cancer patients correlates with clinical outcome (Gaforio et al. 2003; Cristofanilli et al. 2005; Müller et al. 2006). The presence of more than five CTCs in a 7.5-ml blood volume determines a bad prognosis and decreased overall survival, irrespective of the treatment received by the patients (Cristofanilli et al. 2004). These remarkable data could be even more clinically relevant if the precise genetic alterations of such cells were accurately determined. We showed here the feasibility of analyzing TCs by immunomagnetic separation and FICTION techniques to examine gene copy number of *ErbB2*, *TOP2A*, and *CEP17* in CK+ (i.e., tumor) cells.

Few studies have applied molecular techniques to identify genetic signatures of CTCs. The analysis by RT-PCR for mammaglobin and B305D-C in CTCs showed a sensitivity of 70% and a specificity of 81% for the diagnosis of invasive breast carcinoma (Reinholz et al. 2005). Several studies analyzing genetic defects in disseminated tumor cells isolated from bone marrow showed several chromosomal alterations (Klein et al. 1999; Schmidt-Kittler et al. 2003) and amplification of the *ErbB2* gene by fluorescence in situ hybridization (FISH) (Müller et al. 1996; Schardt et al. 2005). However, the molecular characterization of CTCs in PB would be preferable to more invasive procedures, such as bone marrow aspirations.

The FICTION technique was developed to assign tumor cells to a cytogenetically defined clone and, at the same time, to determine their specific cell lineage (Weber-Matthiesen et al. 1992, 1993). FICTION has been proven to be clinically meaningful in hematological neoplasms (Nylund et al. 1993; Haferlach et al. 1997; Temple et al. 2004; Young et al. 2006). In solid tumors, three studies have applied FICTION to correlate the presence of genetic alterations with the ex-

Table 1 Recovery rates of tumor cells from peripheral blood

Cell line	Recovery rates ^a			Total percentage of recovery
	Number of tumor cells recovered in blood sample 1	Number of tumor cells recovered in blood sample 2	Number of tumor cells recovered in blood sample 3	
SK-Br-3	780	760	751	76.37
MCF-7	681	733	742	71.87
MDA-MB-231	670	657	622	64.97

^aTo determine the number of cells recovered, 10 ml of blood from nine healthy donors was spiked with 1000 cells (MCF-7, MDA-MB-231, or SK-Br-3 cell lines). See Analysis of Cell Recovery in Materials and Methods.

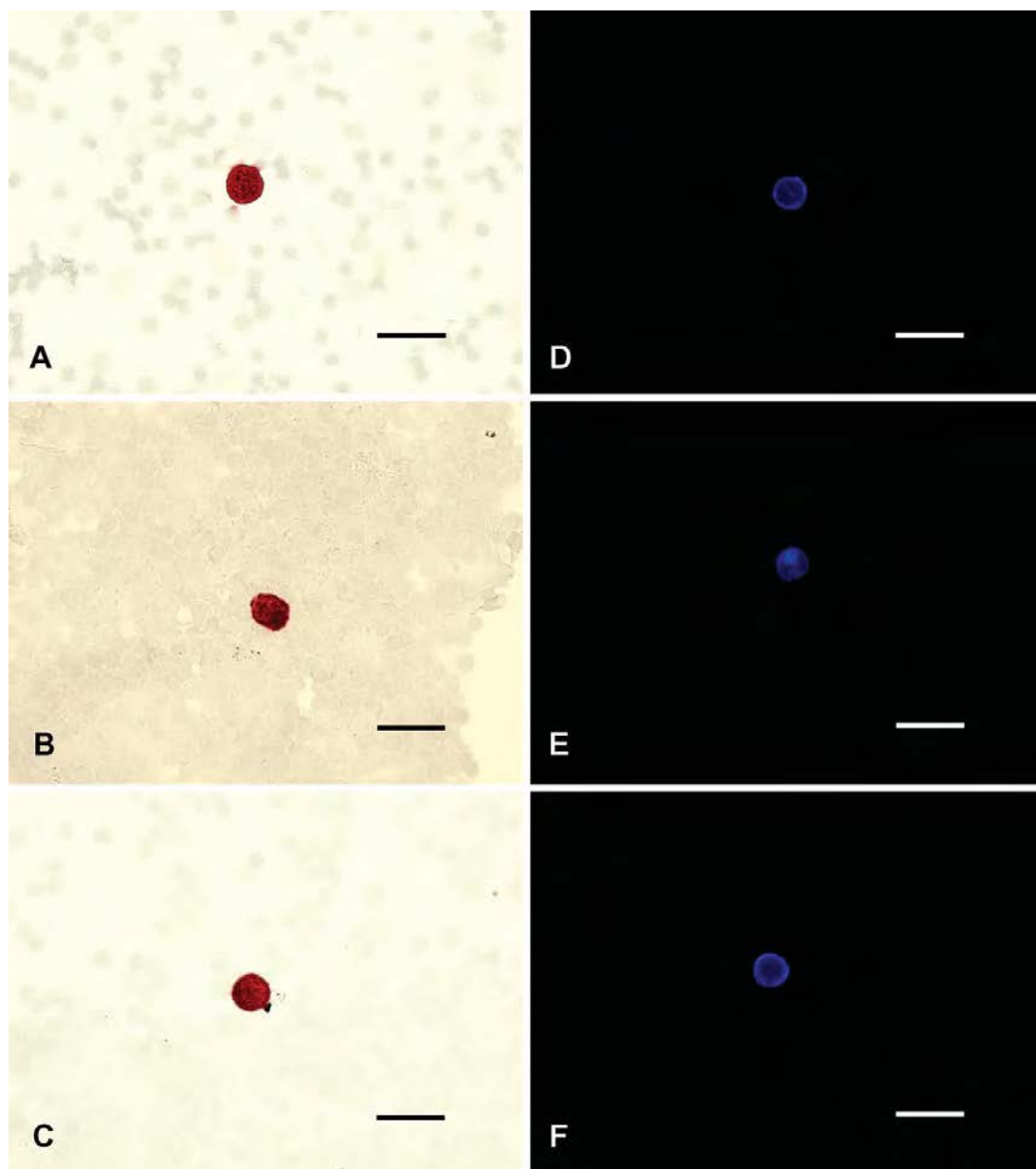


Figure 1 Peripheral blood from healthy volunteers spiked with different tumor cell lines. Mononuclear and granulocyte cell fractions were processed for positive immunomagnetic tumor cells separation and labeled using immunocytochemistry (A–C) or immunofluorescence (D–F). Tumor cells [MCF-7 (A,D), MDA-MB-231 (B,E), and SK-BR-3 (C,F)] show a solid cytoplasmic cyokeratin (CK) staining pattern, whereas the surrounding hematopoietic cells do not. Bar = 75 μ m.

pression of a particular protein (Terada et al. 2000; Zhang et al. 2000; Dettori et al. 2003). Zhang et al. (2000) used this technique in six breast carcinoma cell lines to study the relationship between estrogen re-

ceptor (ER) expression and deletion of the estrogen receptor gene (*ESR*). Terada et al. (2000) studied, using FICTION, 105 patients with gastric tumors, showing that the frequency of positive cells for proliferating cell

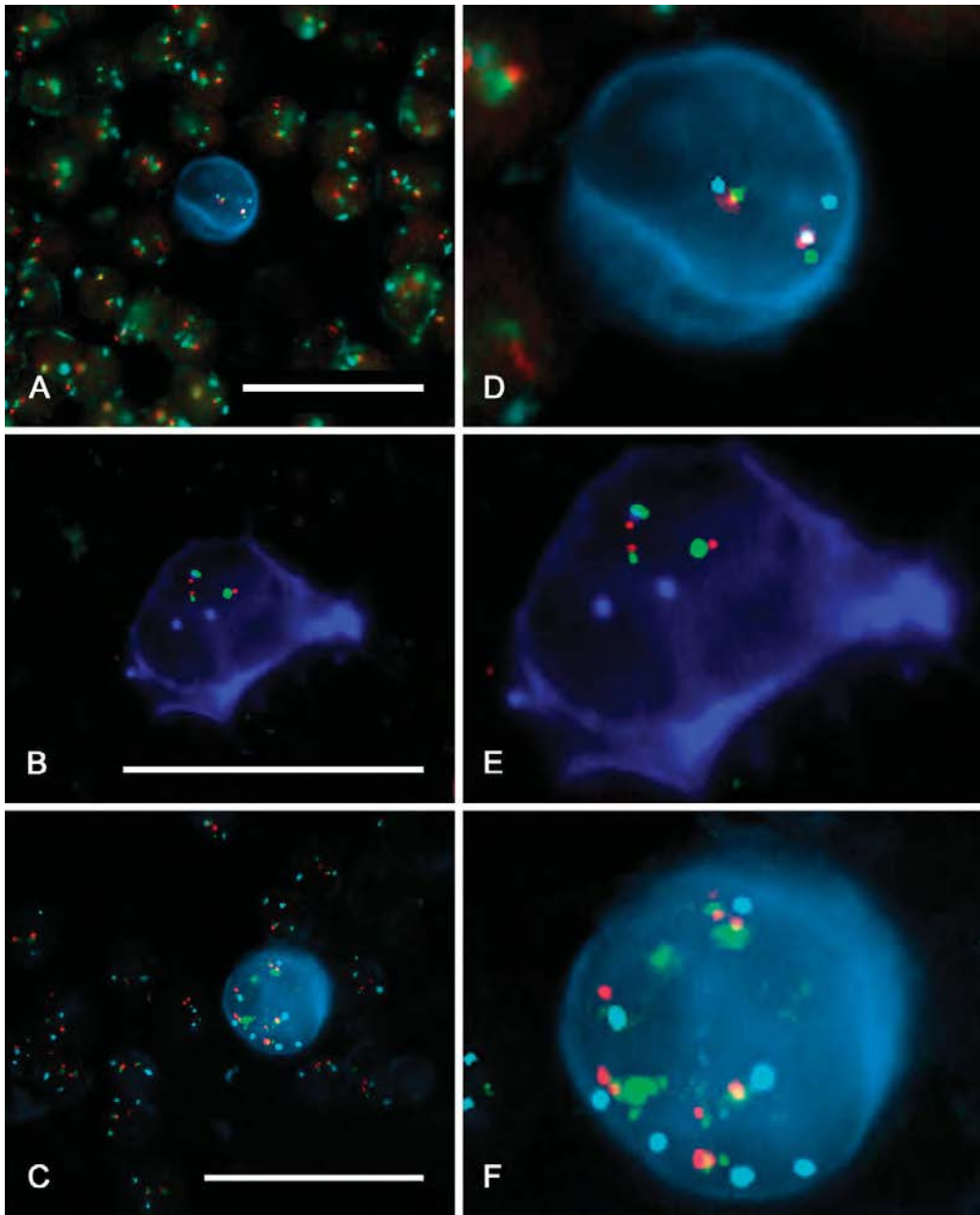


Figure 2 Peripheral blood from healthy volunteers spiked with different tumor cell lines, processed by immunomagnetic enrichment and fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics as a tool for investigation of neoplasm (FICTION) techniques. Leukocytes are negative for the CK labeling and were used as positive control for the fluorescence in situ hybridization technique. Tumor cells [MCF-7 (A,D), MDA-MB-231 (B,E), and SK-Br-3 (C,F)] are clearly identified and show hybridization signals for ERBB2 (HER-2/neu) (green), TOP2A (orange), and CEP17 [aqua (light blue)]. (D) MCF-7 cells show three copies of chromosome 17 and two copies of the *HER-2* and *TOP2A* (mean: two copies of both genes/cell). (E) The general pattern found for MDA-MB-231 cells is the presence of three signals for CEP17, *HER-2*, and *TOP2A*. (F) SK-Br-3 cells show a high level of *HER-2* amplification and a low level of *TOP2A* amplification. Observe that several signals are also seen for CEP17. Notice that not all signals from genes are in focus at the same time. Bar = 75 μ m.

Table 2 Absolute and relative copy numbers of *ERBB2* (*HER-2/neu*) and *TOP2A* genes in SK-Br-3, MCF-7, and MDA-MB-231 cells, after immunomagnetic separation from blood samples and FICTION analyses

Cell line	<i>ERBB2</i> (<i>HER-2/neu</i>) copy number		<i>TOP2A</i> copy number	
	Absolute (mean $\pm$ SD)	Relative to 17 centromere	Absolute (mean $\pm$ SD)	Relative to 17 centromere
Leukocytes ^a	2.00 $\pm$ 0.00	1.00	2.00 $\pm$ 0.00	1.00
SK-Br-3	25.87 $\pm$ 7.39	3.81 ^b	9.48 $\pm$ 2.55	1.40 ^b
MCF-7	2.02 $\pm$ 0.24	0.66 ^c	2.01 $\pm$ 0.26	0.66 ^c
MDA-MB-231	3.09 $\pm$ 0.28	1.01	3.09 $\pm$ 0.28	1.01

^aSamples internal control, 450 cells.^bGene amplification.^cGene deletion.

One hundred fifty cells were evaluated for each cell type (50 cells/sample). FICTION, fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics as a tool for investigation of neoplasia.

nuclear antigen (PCNA) and chromosome 17 numerical aberrations were indicators of metastatic potential. Dettori et al. (2003) evaluated, using FICTION, the immunorexpression of a mitochondrial membrane antigen with a simultaneous visualization of numerical chromosomal aberrations in 18 patients with thyroid tumors.

In this study, we showed for the first time that breast cancer cells isolated from PB can be analyzed by FICTION to simultaneously examine *ErbB2*/*TOP2A*/*CEP17* copy number and cytokeratins 1-8/10/14-16/19 in these cells. To ensure a high specificity of the assay in the analysis of tumor cells, we incorporated the following steps: (a) the first milliliters of blood collected from the samples were discarded to avoid contamination with squamous cells; (b) Fc receptors from cells were blocked to avoid nonspecific binding, previously to the incubation with the anti-cytokeratin mAb; and (c) application of double CK immunolabeling with an anti-CAM5.2 (cytokeratin 7/8) monoclonal antibody (for immunoselection) and with a bclonal anti-AE1/AE3 (anti-pancytokeratin) antibody (for further immunophenotyping).

The genetic amplification of both *ErbB2* and *TOP2A* in SK-Br-3 cells was previously published using FISH (Szöllösi et al. 1995; Järvinen et al. 1999,2000; Forozan et al. 2000), comparative genomic hybridization (Forozan et al. 2000; Lottner et al. 2005), and spectral karyotyping (Kytölä et al. 2000), and is coincident with our results. The deletion of *ErbB2* in MCF-7 cells (Szöllösi et al. 1995; Shadeo and Lam 2006) and the normal *ErbB2* copy number in MDA-MB-231 cells (Satya-Prakash et al. 1981; Grushko et al. 2002; Lottner et al. 2005) were also previously documented and are in keeping with our data. However, no data showing the *TOP2A* status in MCF-7 and MDA-MB-231 cells were previously reported.

Ideally, the technique we describe here could be useful for early detection of *ErbB2*/*TOP2A*-amplified disseminated breast cancer and to monitor, in a relatively easy way, the response to herceptin/anthracycline-based therapies. However, many questions arise from our study that should be addressed in future studies.

First of all, breast cancer patients should be tested to determine the clinical value of this technique. In addition, it is currently unknown whether *ErbB2*/*TOP2A* amplifications or deletions in CTCs will represent the general pattern of aberrations of the primary tumor. *ErbB2* is amplified in ~20–35% of invasive breast carcinomas, and *TOP2A* has been found altered in almost 90% of *ErbB2*-amplified tumors. However, several tumors with extra copies of *ErbB2* contain tumor cells with amplification and deletion of the *TOP2A* gene (Järvinen et al. 1999). It has been suggested that this finding may have therapeutical implications, because *TOP2A* deletions confer resistance to topoisomerase II inhibitors (Järvinen and Liu 2003). This could be an explanation for the gradual loss of efficacy of topoisomerase II inhibitors, which is common in breast cancer treatment. Meng et al. (2004) found that 9 of 24 patients whose primary tumors were *ErbB2* negative showed *ErbB2* amplification in their CTCs. However, other studies have shown that *ErbB2* status was similar between breast cancer metastases and the primary tumor (Tanner et al. 2001; Dirix et al. 2005). In this scenario, one can think that disseminated circulating cells may come from subclones of tumor cells and may not be a representative sample of the whole tumor.

Despite these caveats, which warrant further studies, the presence of *ErbB2*/*TOP2A*-amplified CTCs could serve as a surrogate marker to monitor targeted therapy. A rapid drop in the number of CTCs and cytokeratin-19 mRNA levels has been described in patients after herceptin treatment (Bozionellou et al. 2004). It is likely that the monitoring of the number of cells carrying the specific target against which drugs were designed (whether is herceptin or anthracyclines) would be suitable for testing the efficacy of such therapy. Although we describe here a FICTION method for the analysis of *ErbB2*/*TOP2A*/*CEP17* status in TCs from PB, many other breast cancer targets could be analyzed using a similar technology. For instance, a recent paper showed that node-negative breast cancer patients with 11q deletion might benefit from anthracycline-based chemotherapy (Climent et al. 2007).

In summary, we showed the feasibility of a new methodology that combines immunomagnetic selection and FICTION for ErbB2/TOP2A/CEP17, which could allow genetic characterization of CTCs from PB.

Acknowledgments

This study was supported by the "Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña" (to JJG) and partially funded by an ISCIII-RETIC RD06/0020 grant (to AC).

Literature Cited

- Bozionellou V, Mavroudis D, Perraki M, Papadopoulos S, Apostolaki S, Stathopoulos E, Stathopoulou A, et al. (2004) Trastuzumab administration can effectively target chemotherapy-resistant cyto-keratin-19 messenger RNA-positive tumor cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 10:8185–8194
- Camara O, Rengsberger M, Egbe A, Koch A, Gajda M, Hammer U, Jöke C, et al. (2007) The relevance of circulating epithelial tumor cells (CETC) for therapy monitoring during neoadjuvant (primary systemic) chemotherapy in breast cancer. *Ann Oncol* 18:1484–1492
- Climont J, Dimitrow P, Fridlyand J, Palacios J, Siebert R, Albertson DG, Gray JW, et al. (2007) Deletion of chromosome 11q predicts response to anthracycline-based chemotherapy in early breast cancer. *Cancer Res* 67:818–826
- Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, et al. (2004) Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 351:781–791
- Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, Doyle GV, et al. (2005) Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 23:1420–1430
- Cristofanilli M, Mendelsohn J (2006) Circulating tumor cells in breast cancer: advanced tools for "tailored" therapy? *Proc Natl Acad Sci USA* 103:17073–17074
- Dettori T, Frau DV, Lai ML, Mariotti S, Uccheddu A, Daniele GM, Tallini G, et al. (2003) Aneuploidy in oncocytic lesions of the thyroid gland: Diffuse accumulation of mitochondria within the cell is associated with trisomy 7 and progressive numerical chromosomal alterations. *Genes Chromosomes Cancer* 38:22–31
- Dirix L, Peter Van Dam P, Vermeulen P (2005) Genomics and circulating tumor cells: promising tools for choosing and monitoring adjuvant therapy in patients with early breast cancer? *Curr Opin Oncol* 17:551–558
- Forozan F, Mahlamäki EH, Monni O, Chen Y, Veldman R, Jiang Y, Gooden GC, et al. (2000) Comparative genomic hybridization analysis of 38 breast cancer cell lines: a basis for interpreting complementary DNA microarray data. *Cancer Res* 60:4519–4525
- Gaforio JJ, Serrano MJ, Sánchez-Rovira P, Sirvent A, Delgado-Rodríguez M, Campos M, de la Torre N, et al. (2003) Detection of breast cancer cells in the peripheral blood is positively correlated with estrogen-receptor status and predicts for poor prognosis. *Int J Cancer* 107:984–990
- Grushko TA, Blackwood MA, Schumm PL, Hagos FG, Adeyanju MO, Feldman MD, Sanders MO, et al. (2002) Molecular-cytogenetic analysis of HER-2/neu gene in BRCA1-associated breast cancer. *Cancer Res* 62:1481–1488
- Haeflrich T, Winkemann M, Nickenig C, Meeder M, Ramm-Petersen L, Schoch R, Nickelsen M, et al. (1997) Which compartments are involved in Philadelphia-chromosome positive chronic myeloid leukaemia? An answer at the single cell level by combining May-Grünwald-Giemsa staining and fluorescence in situ hybridization techniques. *Br J Haematol* 97:99–106
- Hannemann J, Kristel P, van Tinteren H, Bontenbal M, van Hoesel QGCM, Smit WM, Nooij MA, et al. (2006) Molecular subtypes of breast cancer and amplification of topoisomerase II α : predictive role in dose intensive adjuvant chemotherapy. *Br J Cancer* 95:1334–1341
- Järvinen TA, Liu ET (2003) HER-2/neu and topoisomerase II α in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 78:299–311
- Järvinen TA, Liu ET (2006) Simultaneous amplification of HER-2 (ERBB2) and topoisomerase II alpha (TOP2A) genes—molecular basis for combination chemotherapy in cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 6:579–602
- Järvinen TA, Tanner M, Bärnlund M, Borg A, Isola J (1999) Characterization of topoisomerase II α gene amplification and deletion in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 26:142–150
- Järvinen TA, Tanner M, Rantanen V, Bärnlund M, Borg A, Grenman S, Isola J (2000) Amplification and deletion of Topoisomerase II α associate with ErbB-2 amplification and affect sensitivity to topoisomerase II α inhibitor Doxorubicin in breast cancer. *Am J Pathol* 156:839–847
- Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA, Pantel K, Speicher MR, Riethmüller G (1999) Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:4494–4499
- Kytölä S, Rummukainen J, Nordgren A, Karhu R, Farnebo F, Isola J, Larsson C (2000) Chromosomal alterations in 15 breast cancer cell lines by comparative genomic hybridization and spectral karyotyping. *Genes Chromosomes Cancer* 28:308–317
- Lottner C, Schwarz S, Diermeier S, Hartmann A, Knuechel R, Hofstaedter F, Brockhoff G (2005) Simultaneous detection of HER2/neu gene amplification and protein overexpression in paraffin-embedded breast cancer. *J Pathol* 205:577–584
- Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Haley B, Perkins S, Beitsch P, et al. (2004) Her-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:9393–9398
- Müller P, Weckermann D, Riethmüller G, Schlimok G (1996) Detection of genetic alterations in micrometastatic cells in bone marrow of cancer patients by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 88:8–16
- Müller V, Hayes DF, Pantel K (2006) Recent translational research: circulating tumor cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 8:110–113
- Nylund SJ, Verbeek W, Larramendy ML, Ruutu T, Heinonen K, Hallman H, Knuutila S (1993) Cell lineage involvement in four patients with myelodysplastic syndrome and t(1;7) or trisomy 8 studied by simultaneous immunophenotyping and fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 70:120–124
- Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE (2000) The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 19:3159–3165
- Parkin MD, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55:74–108
- Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ (1996) Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene* 13:63–72
- Press MF, Bernstein L, Thomas PA, Meisner LF, Zhou JY, Ma Y, Hung G, et al. (1997) HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J Clin Oncol* 15:2894–2904
- Prellow TG, Schwartz S, Giaconia JM, Wright AL, Grimm HA, Edgehouse NL, Murphy JR, et al. (2000) Prostate cancer and other xenografts from cells in peripheral blood of patients. *Cancer Res* 60:4033–4036
- Reinholz M, Nibbe A, Jonart LM, Kitzmann K, Suman VJ, Ingle JN, Houghton R, et al. (2005) Evaluation of a panel of tumor markers for molecular detection of circulating cancer cells in women with suspected breast cancer. *Clin Cancer Res* 11:3722–3732
- Ross JS, Fletcher JA (1999) HER-2/neu (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 112:S53–S67
- Satya-Prakash KL, Pathak S, Hsu TC, Olive M, Cailleau R (1981) Cytogenetic analysis on eight human breast tumor cell lines: high frequencies of 1 q, 11q and HeLa-like marker. *Cancer Genet Cytogenet* 3:61–73

- Schardt JA, Meyer M, Hartmann CH, Schubert F, Schmidt-Kittler O, Fuhrmann C, Polzer B, et al. (2005) Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer. *Cancer Cell* 8:227–239
- Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, Ahr A, Blankenstein TJF, Kaufmann M, et al. (2003) From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:7737–7742
- Shadeo A, Lam WL (2006) Comprehensive copy number profiles of breast cancer cell model genomes. *Breast Cancer Res* 8:R9
- Szöllösi J, Balázs M, Feuerstein BG, Benz CC, Waldman FM (1995) ERBB-2 (HER2/neu) gene copy number, p185^{HER2} overexpression, and intratumor heterogeneity in human breast cancer. *Cancer Res* 55:5400–5407
- Tanner M, Järvinen P, Isola J (2001) Amplification of HER-2/neu and topoisomerase IIa in primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res* 61:5345–5348
- Temple GK, Sales M, Kernohan N, Scott F, Meiklejohn D, Pratt N (2004) Application of combined immunofluorescence and fluorescence in situ hybridization on paraffin-embedded sections to characterize T-cell lymphoma with EBV-infected B-cell blasts. *Genes Chromosomes Cancer* 41:405–409
- Terada R, Yasutake T, Nakamura S, Hisamatsu T, Nakagoe T, Ayabe H, Tagawa Y (2000) Evaluation of metastatic potential of gastric tumors by staining for proliferating cell nuclear antigen and chromosome 17 numerical aberrations. *Ann Surg Oncol* 8:525–532
- Weber-Matthiesen K, Müller-Hermelink A, Deerberg J, Scherthan H, Schlegelberger B, Grote W (1993) Discrimination of distinct subpopulations within a tumor with combined double immunophenotyping and interphase cytogenetics. *J Histochem Cytochem* 41:1641–1644
- Weber-Matthiesen K, Winkemann M, Müller-Hermelink A, Schlegelberger B, Grote W (1992) Simultaneous fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics: a contribution to the characterization of tumor cells. *J Histochem Cytochem* 40:171–175
- Yarden Y, Sliwkowski MX (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Mol Cell Biol* 21:127–137
- Young KH, Chan WC, Fu K, Iqbal J, Sanger WG, Ratashak A, Greiner TC, et al. (2006) Mantle cell lymphoma with plasma cell differentiation. *Am J Surg Pathol* 30:954–961
- Zhang Y, Siebert R, Matthiesen P, Harder S, Theile M, Scherneck S, Schlegelberger B (2000) Feasibility of simultaneous fluorescence immunophenotyping and fluorescence in situ hybridization study for the detection of estrogen receptor expression and deletions of the estrogen receptor gene in breast carcinoma cell lines. *Virchows Arch* 436:271–275

Capítulo 3

Detección de células tumorales circulantes (CTCs) en sangre periférica de pacientes con cáncer de colon no metastásico

Análisis del valor pronóstico de este nuevo marcador

Verificación de la utilidad de la nueva metodología desarrollada y posibilidad de evaluar otros marcadores tumorales en las CTCs aisladas

Trabajo enviado para publicación, con título: **“Simultaneous phenotypic and genetic characterization of single circulating tumor cells from colon cancer patients”**, a la revista *BMC Cancer*.

- Índice de impacto de la revista = 3,15
- Categoría a la que pertenece: Oncología
- Cuartil que ocupa: segundo cuartil
- Rango en la categoría (2010): 66/185.

Simultaneous phenotypic and genetic characterization of single circulating tumor cells from colon cancer patients.

María Campos¹, Rafael Luque², Juan Jiménez³, Rafael Martínez⁴, Fernando Warleta¹, Cristina Sánchez-Quesada¹, Miguel Delgado-Rodríguez^{5,6}, Alfonso Calvo⁷ and José J Gaforio^{1*}

Address: ¹Immunology Division, Department of Health Sciences, Faculty of Experimental Sciences, University of Jaén, Campus Las Lagunillas s/n, 23071 Jaén, Spain, ²Department of Pathology, University Hospital of Jaén, Ejército Español Avenue nº 10, 23007 Jaén, Spain, ³Department of Surgery, University Hospital of Jaén, Ejército Español Avenue nº 10, 23007 Jaén, Spain, ⁴Department of Internal Medicine, University Hospital of Jaén, Ejército Español Avenue nº 10, 23007 Jaén, Spain, ⁵Division of Preventive Medicine and Public Health, Department of Health Sciences, Faculty of Experimental Sciences, University of Jaén, Campus Las Lagunillas s/n, 23071 Jaén, Spain, ⁶Biomedical Network Research Center for Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Ministry of Science and Innovation and ⁷Division of Oncology, Center for Applied Medical Research (CIMA) and Department of Histology and Pathology, University of Navarra, Pio XII, nº 55, 31008 Pamplona, Spain.

Email: María Campos - mcampos@ujaen.es; Rafael Luque - rjluquebarona@hotmail.com; Juan Jiménez - jimenezanula@hotmail.com; Rafael Martínez - rmartinezg_es@yahoo.es; Fernando Warleta - fwarleta@ujaen.es; Cristina Sánchez-Quesada - csquesad@ujaen.es; Miguel Delgado-Rodríguez - mdelgado@ujaen.es; Alfonso Calvo - acalvo@unav.es; José J Gaforio* - jgaforio@ujaen.es

*Corresponding author

Abstract

Background: Since circulating tumor cells (CTCs) have metastatic potential, their genetic and phenotypic characteristics could provide crucial information to establish the most effective therapy. We assessed the clinical utility of a methodology that allows the simultaneous analysis of CTCs phenotype and genotype in colon cancer patients and, in addition, whether this methodology could provide complementary information to the one obtained by the primary tumor biopsy.

Methods: Thirty-three non-metastatic (stages 0-III) colon cancer patients and 9 healthy donor samples were evaluated. All peripheral blood samples (10 ml) were analyzed by cytokeratin immunomagnetic enrichment. Eight samples were analyzed by immunocytochemistry and 25 samples were analyzed by FISH technique for simultaneous cytokeratin expression and chromosome 17 and ERBB2 gene status. A further study was carried out in one patient who showed CTCs heterogeneity in chromosomal abnormalities. We analyzed HER2 protein expression on CTCs and FISH and HER2 protein expression in primary tumor of this patient.

Results: Our results show that 9.09% of patients had cytokeratin-positive CTCs (CK+/CTCs) in peripheral blood. One of the patients showed heterogeneity in chromosomal abnormalities and two different CK expression patterns on CTCs: one CK+/CTCs and one CK-/CTCs. Furthermore, 63.33% of these CTCs overexpressed HER2 protein while the primary tumor of this patient was diploid and did not express HER2 protein.

Conclusions: We describe a methodology that allows the simultaneous analysis of genetic and phenotypic of CTCs in colon cancer patients, which may provide essential information to select patients who might benefit from specific therapy.

Background

Colon cancer is one of the most common types of tumors in developed countries [1]. Despite the improvement of survival rates achieved with the use of new chemotherapy agents, approximately 20% of stage II patients will die from recurrent disease [2], which shows the need of more effective therapies.

Different genetic alterations that have been described in colorectal cancer may represent novel candidates for tailored therapy, such as: i) alterations in protooncogene C-MYC (located on chromosome 8) that encodes a transcription factor that is one of the most potent and frequently deregulated oncoproteins in human cancers [3]; ii) alterations in ERBB2 gene (located at chromosome 17), member of the EGFR family, is a common target for breast cancer, but recent studies have found overexpression or amplifications in other solid tumors, such as lung, gastric and colorectal

cancers [4–6]. This offers the possibility of testing ERBB2-targeted drugs, including trastuzumab and lapatinib, in these subpopulations of patients [7–11]. Overexpression or amplification of ERBB2 has been reported in 3%–14% of primary tumors from colorectal cancer patients [4, 12–14], some authors have suggested that the addition of trastuzumab to chemotherapy might increase the clinical response in these colon cancer patients [7–12, 14].

The detection of circulating tumor cells (CTCs) appears to be an important prognostic marker for different tumor types such as breast cancer where it serves as a progression marker and indicator of overall survival [15–18]. In addition, the detection of CTCs identifies therapy resistant breast cancer patients [19–21]. The prognostic significance of CTCs in colorectal cancer is not clear yet, recent reports suggest an association with overall survival and disease progression [22–24]. However, little attention has been paid to the cytogenetic features of such cells.

In this study we analyzed CTCs of 33 non-metastatic colon cancer patients with the goal of evaluating ERBB2 status in such CTCs. Our methodology allows us to analyze simultaneously the ERBB2 phenotype and genotype of single cytokeratin positive (CK+)/CTCs isolated from peripheral blood (PB) by immunomagnetic separation and FICTION [25]. We found that 3 out of 33 patients had detectable CK+/CTCs (9.09%) and 1 of them had CK+/CTCs with strong HER2 expression. CK+/CTCs in this patient were triploid for chromosome 17 and did not show ERBB2 amplification, while the primary tumor showed disomy for this chromosome and ERBB2 gene, and were negative for HER2 protein expression. Therefore we were able to identify CTCs in PB with different genetic and phenotypic characteristics to the ones found in primary tumor biopsy. Since CTCs are linked to tumor recurrence and metastasis, CTCs' genotype and phenotype analysis could also complete the real status of the disease with metastatic and primary tumor analysis.

Materials and methods

Cell lines and controls

The human colon cancer cell lines Caco-2, HT-29, and human breast cell lines MCF-7 MDA-MB-231 were obtained from the American Type Cultured Collection (ATCC; Rockville, MD). The human breast cancer cell line SK-Br-3 (with ERBB2 amplification and overexpression) was obtained from Eucellbank (Barcelona, Spain). MCF-7 and MDA-MB-231 cells were grown in MEM with Earle's salt (PAA Laboratories, Pasching, Austria), supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (PAA Laboratories, Pasching, Austria) and 1% of a stock solution of penicillin-streptomycin (Sigma, St. Louis, MO). Caco-2, HT-29 and SK-Br-3 cells were grown in RPMI 1640 (PAA Laboratories, Pasching, Austria), plus 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum and 1% of a stock solution of penicillin-streptomycin. Cells in the exponential growth phase were used for the experiments. These cancer cell lines were used as positive control. Briefly, we spiked 1000 of each tumor cell lines in 10 ml of peripheral blood (PB) from 6 healthy donors (one sample of blood per each tumor cell line except for SK-Br-3 control that was duplicated), under an approved ethical protocol and signed informed consent. Previously, we validated the absence of CTCs in PB from healthy donors as negative controls. Besides these healthy donor samples, we also evaluated three PB samples of patients with diverticulosis disease (benign inflammatory disease) as negative controls. Positive controls, negative controls and patient's samples were carried out separately to avoid cross contamination and were processed following our previously published FICTION protocol [25].

Study population and clinicopathologic examination

Informed consent was obtained from all participants following an explanation of the nature of the study, as approved by the research ethics board of our hospital. All patients were considered sporadic cases on the basis that no clinical antecedents of familial adenomatous polyposis were reported, and those who met the clinical criteria for hereditary nonpolyposis colon cancer (Amsterdam criteria) were excluded. Between June 2004 and November 2005, blood samples (10 mL) were taken from 33 non-metastatic colon cancer patients (stages 0–III) by venipuncture, the day before surgery. All patients were followed up until death or until

August 11, 2007. Follow-up of the patients was carried out every 6 months and included recording of the development of local and distant tumor relapse and the survival state of the patients.

The following variables were obtained from the medical records of the 33 patients: Age, gender, tumor location, pathologic stage, histological differentiation and type, lymph node metastases, tumor invasion, and evidence of polyps (defined by the presence of polyps in the surgical sample). Pathologic stage was assessed using tumor-node-metastases (TNM) classification (Table 1).

Table 1: Correlation among CK+/CTCs and clinical/morphological variables

Clinical or pathological variables	Number of CK+/CTCs/10 ml		p value
	CK+ patients	CK - patients (%)	
Gender			
Male	2 (6.06%)	20 (60.60%)	0.718
Female	1 (3.03%)	10 (30.30%)	
Tumor location			
Ascending colon	2 (6.06%)	12 (36.36%)	0.477
Transverse colon	0 (0.00%)	1 (3.03%)	
Descending colon	0 (0.00%)	12 (36.36%)	
Sigmoid colon	1 (3.03%)	4 (12.12%)	
Transverse-sigmoid colon	0 (0.00%)	1 (3.03%)	
Grade of differentiation			
Well	2 (6.06%)	10 (30.30%)	0.289
Moderate and moderate-	0 (0.00%)	13 (39.39%)	
Poor	1 (3.03%)	5 (15.15%)	
TNM			
0	0 (0.00%)	2 (6.06%)	1.000
I	0 (0.00%)	3 (9.09%)	
II	1 (3.03%)	10 (30.30%)	
III	2 (6.06%)	15 (45.45%)	
Histological type			
Adenocarcinoma	3 (9.09%)	26 (78.78%)	1.000
Mucinous adenocarcinoma	0 (0.00%)	2 (6.06%)	
Intramucosal	0 (0.00%)	2 (6.06%)	
Tumor configuration			
Excrescent	0 (0.00%)	6 (18.18%)	0.501
Excrescent-infiltrative	0 (0.00%)	1 (3.03%)	
Infiltrative	1 (3.03%)	7 (21.21%)	
Polypoid	0 (0.00%)	5 (15.15%)	
Ulcerative	1 (3.03%)	1 (3.03%)	
Ulcer vegetative	1 (3.03%)	9 (27.27%)	
Vegetative	0 (0.00%)	1 (3.03%)	
Tumor invasion			
Lymphatic			
+	2 (6.06%)	15 (45.45%)	0.523
-	1 (3.03%)	15 (45.45%)	
Venous			
+	0 (0.00%)	3 (9.09%)	0.744
-	3 (9.09%)	27 (81.81%)	
Perineural (n=10)			
+	1 (3.03%)	8 (24.24%)	0.629
-	2 (6.06%)	2 (6.67%)	

Blood samples, density gradient separation and CK+/CTCs enrichment by immunomagnetic separation

Peripheral venous blood samples (10 mL) were collected from colon cancer patients before surgery. PB samples were collected in heparinized tubes (BD Vacutainer, Becton Dickinson; Heidelberg, Germany) and were processed within 4 hr after collection. Eight PB samples were processed according to the methodology previously described by our group [15] and 25 PB samples were processed following our FICTION protocol [25].

Briefly, a double-density ficoll gradient was prepared per PB sample (Histopaque 1119 and Histopaque 1077 (Sigma, St. Louis, MO)). After centrifugation, the mononuclear cell fraction and the granulocyte fraction were isolated. Then tumor cells were immunoseparated using the Carcinoma Cell Enrichment and Detection Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), with some modifications. After nucleated cells were isolated, permeabilized and fixed, the samples were incubated with Fc-Blocking Reagent and immunomagnetically labeled with MACS anti-cytokeratin microbeads (microbeads conjugated to a monoclonal anti-cytokeratin 7/8 antibody; clone: CAM 5.2). After this, samples were placed onto a MACS Column (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and the retained cells (magnetic-positive cell population; cytokeratin-positive (CK+) cells) were eluted. The magnetically enriched cell fractions were spun down onto poly-L-lysine-coated glass slides (Sigma, St. Louis, MO) in a cytocentrifuge (Hettich; Tuttlingen, Germany). Then slides were air-dried overnight at room temperature and stored at -20°C without fixation.

Detection of CK+/CTCs by immunocytochemistry

Eight PB samples were processed by immunocytochemistry. After thawing, slides were stained with anti-cytokeratin 7/8 conjugated to FITC (isotype: mouse IgG2a, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and further labeled with anti-FITC antibody conjugated to alkaline phosphatase (isotype: mouse IgG1, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Then samples were incubated with Fast Red TR/Naphthol AS-MX substrate solution (Miltenyi Biotec,

Bergisch Gladbach, Germany), counterstained with Mayer's hematoxylin, and mounted with Kaiser's glycerol gelatin (Merck, Darmstadt, Germany) following our immunocytochemistry protocol [15]. CK+/CTCs were counted separately by two expert researchers.

Detection of CK+/CTCs by FICTION (Fluorescence immunophenotyping and Interphase Cytogenetics as a Tool for Investigation of Neoplasm)

Twenty five PB samples were processed by FICTION [25]. Briefly, after thawing and fixation, these samples were incubated with a blocking solution (10% rabbit serum (Sigma, St. Louis, MO)) followed by primary antibody incubation with the biclonal mouse anti-AE1-AE3 antibody (BioGenex, San Ramon, CA). The development was conducted by applying 2 sequential layers of secondary antibodies: Alexa Fluor 350 rabbit anti-mouse IgG and goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, Eugene, OR). After fluorescent immunophenotyping, slides were evaluated under Leica TCS-DL confocal laser scanning system with argon and two helium neon lasers on a Leica D M IRB inverted microscope, with appropriate filter set. Blue fluorescent images were acquired with Leica DFC 300FX digital camera and processed with Leica IM50 image manager. Confocal images were acquired and processed using Leica confocal LCS software (Leica Microsystems; Wetzlar, Germany).

After assessment of positive tumor cells on the slides, samples were fixed and dehydrated in series of ethanol (Panreac Quimica, Barcelona, Spain). Afterwards, samples were codenatured (85°C for 5 min) and hybridized (overnight at 37°C) with the LSI HER2/CEP17 multi-color probe, (ERBB2 (HER2/neu) probe labeled with SpectrumGreen and a chromosome enumeration probe CEP17 labeled with Spectrum Aqua) (Abbott Molecular, Vysis; Des Plaines, IL). Posthybridization wash was performed at 72°C in 2xSodium chloride citrate buffer (SCC) (MP Biomedicals Europe, Illkirch, France)/0.3% Igepal (Sigma, St. Louis, MO) for 2 min, followed by another wash at room temperature [25]. Microscopic evaluation was carried out with the Leica microscope described above by two expert researchers.

Analysis of hybridization

All CK+/CTCs were scored to determine the number of hybridization signals for each ERBB2 and CEP17 probe. The absolute copy numbers and the relative copy number ratio (ratio between the absolute number of ERBB2 signals in each CK+/CTC and the absolute number of their own chromosome 17 centromere signals) were determined. For FISH evaluation a [ERBB2]/CEP17 ratio value ≥ 1.5 was considered to be an increase copy number of the gene. Similarly, ratio value ≤ 0.7 was considered to be a decrease copy number of the gene, and ratios between 1.3 and 1.5 were considered as equivocal values, and were interpreted with caution.

Statistical analysis

The patient characteristics were related to the presence of CK+/CTCs in PB by using Fisher's exact test. When a variable was ordered a trend analysis was applied. Actuarial curves for progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) were calculated by the Kaplan-Meier method. PFS and OS were calculated from the date of the primary detection of CK+ cells in PB to the date of disease progression or death. Disease progression was defined as a recurrence of the patients.

Study of patient with identification number (IN) 28

Due to the genetic characteristics of the CK+/CTCs found in IN 28 patient, we conducted a further study of this patient by assessing several tumor markers, genetic characteristic of the primary tumor and the expression of HER2 protein in CK+/CTCs of this patient.

Immunohistochemistry of primary tumor

Immunostaining of primary tumor sample was assessed by Department of Pathology (University Hospital of Jaén) on routinely processed paraffin sections using the citrate buffer (pH 6) (Master Diagnostica, Granada, Spain) as an antigen-retrieval method. Sections were examined with monoclonal antibodies (mAbs) recognizing p53 (Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK); cyclin D1 (Dako, Glostrup, Denmark); HER2 (Dako, Glostrup, Denmark); Ki-67 (Concept a Biosystems, Barcelona, Spain); CD31 (Novocastra,

Newcastle upon Tyne, UK); and CD34 (Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK). Immunohistochemical staining was performed with a sensitive polymer-based system (Dako EnVision system, Glostrup, Denmark) with diaminobenzidine (DAB) solution as a chromogen (Dako, Glostrup, Denmark). All incubations were carried out at room temperature. The sample was counterstained with Mayer's haematoxylin (Merck, Darmstadt, Germany) and mounted using standard procedures. Positive and negative (substituting the primary antibody by distilled water) controls were included in the kit. All recommended prognostic factors by the American College of Pathologists were recorded.

The assessment of immunohistochemistry was conducted using an Olympus BH-2 microscope (Olympus; Hertfordshire, United Kingdom) attached to a Nikon Coolpix 5400 camera for acquisition of digital images. All markers were quantitated using random fields that were recorded as digital images under high power view (x400) and counting a mean of 1000 cells per marker with the aid of the ImageJ software for image analysis (ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2007).

FISH of primary tumor

The ERBB2 evaluation by FISH was performed on two sections (3 μ m) from paraffin-embedded tissue sample. Briefly, after paraffin was removed the sections were rehydrated in ethanol series and treated with hydrochloric acid (Panreac Quimica, Barcelona, Spain), followed by a treatment with 8% Sodium thiocyanate (Panreac Quimica, Barcelona, Spain) and digested with 0.025% pepsin (Sigma, St. Louis, MO) in hydrochloric acid. Samples were then rinsed with 2xSSC, dehydrated in ethanol series and air dried at room temperature.

Next, dual-color probe Poseidon™ Repeat Free™ ERBB2, HER2/Neu (17q12) & SE17 Control probe (red color for ERBB2, and green for SE17) (Kreatech Diagnostics, Amsterdam, The Netherlands) were added to slides and codenaturation (75°C for 10 min), hybridization (overnight at 37°C) and posthybridization wash (72°C in 1xSSC for 2 min, followed by 1xSSC at room temperature)

were performed following the Kretech Diagnostic's recommended protocol. Slides were mounted with DAPI I counterstain (Abbott Molecular, Vysis; Des Plaines, IL).

Evaluation of the hybridization was done with a Zeiss Axioplan 2 epi fluorescence microscope (Carl Zeiss; Jena, Germany), with the appropriate filters set. ISIS software (MetaSystems; Altshausheim, Germany) was used to capture the images. 100 tumor nuclei were examined and alterations of the number of signals were evaluated following standard procedures.

Immunostaining of CK+/CTCs with anti-HER2 mAb (HerceptTest, Dako)

After FICTION evaluation, IN 28 sample was dismantled, rehydrated and the anti-HER2 antibody was applied as described in the section Immunohistochemistry of primary tumor. Positive controls, in which FICTION had been evaluated, were included in the immunostaining of CK+/CTCs with anti-HER2, in order to have a control of the immunocytochemistry. These controls followed the same process as described for the IN28 sample, except for one of the SK-Br-3 controls that was used as a negative control (substituting the primary antibody with distilled water to assure that crossed reactions or false positive results did not occur).

Analysis of HER2 expression

Tumor cell lines and CTCs from IN 28 sample were scored according to manufacturer's guidelines. Score 0 defined as no staining of tumor cells, score 1+, as faint membrane staining of the cells; score 2+, as weak to moderate membrane staining; and a score of 3+, as strong staining of the entire membrane with perinuclear reinforcement. Samples were considered negative when a score 0 or 1+ staining were found in > 10% of tumor cells, while they were considered positive when score 2+ or 3+ was observed in > 10% of these cells. Microscopic evaluation was carried out with the Leica microscope described above.

Results

Detection of CK+/CTCs in colon cancer patients

Blood samples from 33 consecutive patients with colon cancer were taken to measure CK+/CTCs levels, and no statistical association was found between presence of CK+/CTCs and any of the variables studied (Table 1). The negative controls, PB samples from three patients with diverticulosis disease and 6 healthy volunteers were negative for CK+ cells' detection.

CK+/CTCs were detected in 3 out of 33 PB samples (9.09%). The mean number of CK+/CTCs isolated in these 3 patients was 9.67 (range 1-26 CK+ cells), relationship between the presence of CK+/CTCs and OS or/and PFS was not found (median follow-up = 13 months; range = 0.5-29.9).

Regarding the three CK+/CTCs patients, one of them was analyzed by immunocytochemistry and showed one CK+/CTC with a strong cytoplasmic staining pattern, whereas the surrounding hematopoietic cells showed no CKs expression (data not shown). The genetic characteristic of this CK+/CTC could not be studied due to technical problems. The other two samples were analyzed by FICTION and results are shown in the section *FICTION analysis on the immunoselected CK+/CTCs*.

Characterization of tumor cell lines by FICTION and HER2 expression

We first established the characterization of the FICTION technique, using tumor cell lines spiked in blood samples from healthy volunteers.

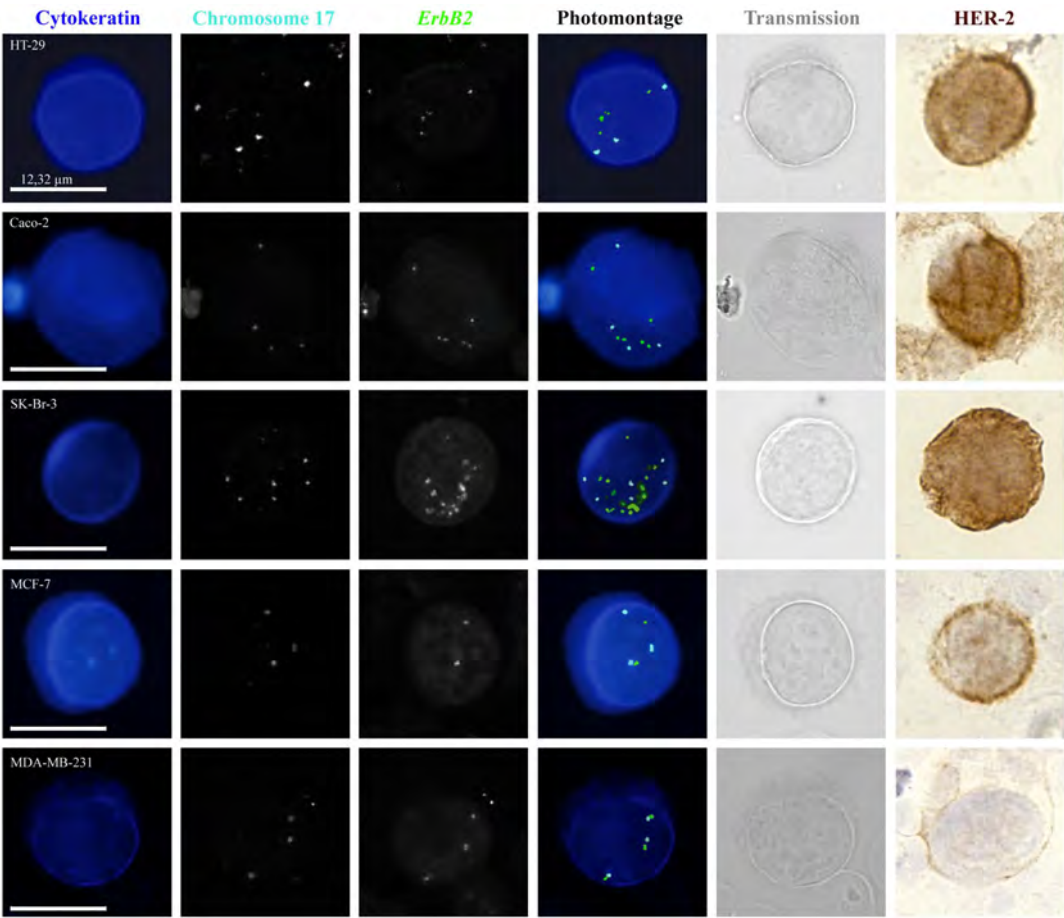
Carcinoma cell lines in positive controls were unequivocally distinguished among the white blood cells by their CK blue-labelling (Fig. 1). Hybridization signals for ERBB2 and CEP17 were also clearly observed in both tumor and white blood cells (Fig. 1). All leukocytes showed two signals for the ERBB2 gene and centromere 17, thus serving as internal controls for the hybridization.

The five positive controls (SK-Br-3, Caco-2, HT-29, MCF-7 and MDA-MB-231) and SK-Br-3 negative control (in which we have substituted the primary antibody by distilled

water), were analyzed for the immunostaining with anti-HER2 protein. Different expression patterns were found on each positive control (Fig. 1). SK-Br-3, Caco-2 and HT-29 tumor cells showed a strong staining (3+ score). MCF-7

tumor cells displayed a moderate staining (annotated as 2+) and MDA-MB-231 cells were negative for HER2 protein expression.

Figure 1. Fluorescent images (x100 objective) of PB from healthy volunteers spiked with different tumor cell lines [HT-29, Caco-2, SK-Br-3, MCF-7 and MDA-MB-231] processed by immunomagnetic enrichment and FICTION techniques (scale bar: 12.32 μm). Column “Cytokeratin” displays the CK labelling of tumor cells which are clearly identified as blue fluorescent, evaluation by fluorescence microscopy. Columns “Chromosome 17” and “ErbB2” show the hybridization signals for CEP17 and ERBB2 (HER2/neu) respectively (overlay of different planes), evaluated by confocal microscopy. Column “Photomontage” displays the overlay of Cytokeratin (blue), Chromosome 17 (aqua or light blue) and ERBB2 (green). Column “Transmission” shows the morphology of tumor cells, analyzed with confocal microscopy. The expression of HER2 protein is shown in the last column “HER-2”. These cells are different from the ones photographed in the other columns.



FICTION analysis on the immunoselected CK+/CTCs

Criteria for CK+/CTCs identification consisted of nucleated cells with a malignant phenotype (Fig. 2 “Transmission column” shows a representative example of morphology of isolated CK+/CTCs), staining positive for cytokeratin (CK+ cells) in blue fluorescence. Results were expressed as number of CK+/CTCs per 10 mL PB. In addition, to ensure

the efficiency of hybridization, a minimum of 50 morphologically intact and non-overlapping nuclei of normal cells (contaminated leukocytes) were scored per sample and used as internal control.

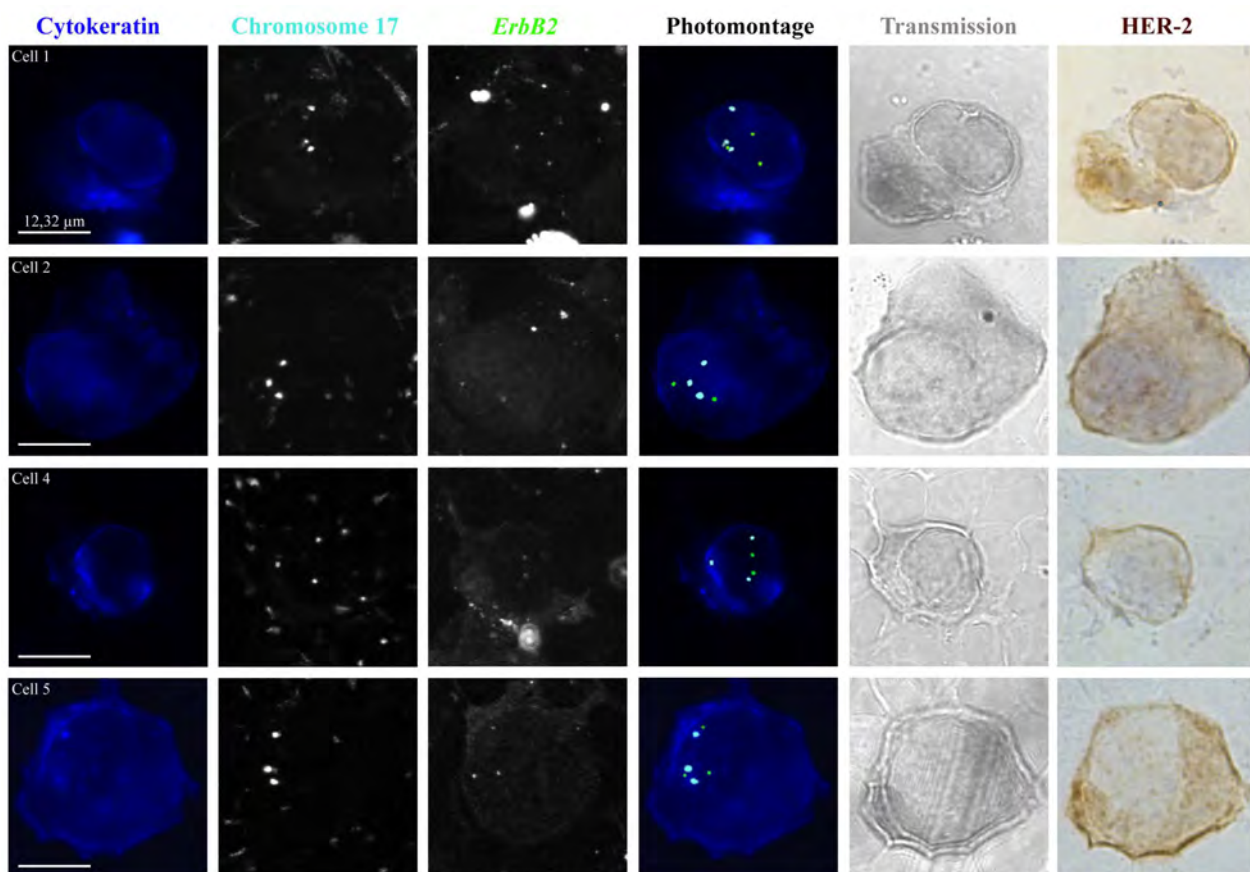
IN 21 Patient: A total of 2 intact cells were detected as CK+/CTCs in this patient. These CK+/CTCs were evaluated for the hybridization of ERBB2 gene signals. Both

CK+/CTCs presented disomy for this chromosome and showed 2 copies for ERBB2 gene (data not shown).

IN 28 Patient: A total of 26 intact CK +/CTCs with a malignant phenotype were found in this patient. Among the 26 CK+/CTCs studied, 23 CK+/CTCs showed polysomy (trisomy) for chromosome 17 (88.46%) and 3 CK+/CTCs

presented disomy for this chromosome (11.54%) (Table 2). The CEP17 average number of copies for these CK+/CTCs was 2.88 copies per cell. 20 CK+/CTCs (out of these 26 CK+/CTCs) were evaluated in terms of a absolute copy number of ERBB2 signals. Four CK+/CTCs (4/20) presented 3 copies for this gene (20.00%) and 16 (16/20) showed 2 copies for ERBB2 gene (80.00%).

Figure 2. Fluorescent images (x100 objective) of CK+/CTCs isolated from PB from IN 28 patient (scale bar: 12.32 μ m). Column "Cytokeratin" display the CK labelling of these cells which are clearly identified by their blue fluorescence. Samples were analyzed by fluorescence microscopy. Columns "Chromosome 17" and "ErbB2" show the hybridization signals for CEP17 and ERBB2 (HER2/neu) respectively (overlay of different planes, confocal microscopy). Column "Photomontage" displays the overlay of Cytokeratin (blue), Chromosome 17 (aqua or light blue) and ERBB2 (green). Column "Transmission" shows the morphology of CK+ cells (confocal microscopy). The expression of HER2 protein is shown in the last column "HER-2". All CK+/CTCs are the same that those photographed in the other columns.



In summary, amplification of ERBB2 gene was not detected. The ERBB2 gene status for these CK+/CTCs was 2.20 copies per cell. Figure 2, "ERBB2 and Chromosome

17 columns" shows a representative example of ERBB2 gene and chromosome 17 status of isolated CK+/CTCs.

Table 2. Chromosomal 17 aneusomy according to HER2 protein expression scoring on CK+/CTCs from IN 28 patient.

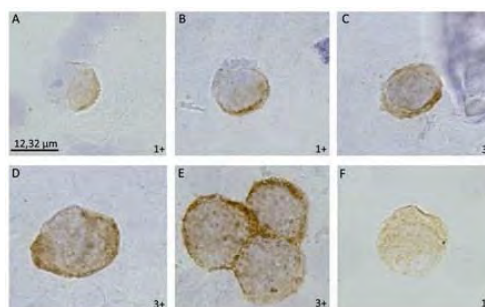
Chromosomal aneusomy	N° of CK+/CTCs	% of CK+/CTCs		HER2 protein expression score					Total CK+/CTCs
				0	1+	2+	3+	2+/3+	
<i>Trisomy</i>	23	88.46%	N° of CK+/CTCs	0	8	5	6	11	19
			% of CK+/CTCs	0%	42.11%	26.32%	31.58%	57.89%	
<i>Disomy</i>	3	11.54%	N° of CK+/CTCs	0	0	2	0	2	2
			% of CK+/CTCs	0%	0%	100%	0%	100%	
Total CK+/CTCs	26		N° of CK+/CTCs	0	8	7	6	13	21
			% of CK+/CTCs	0%	38.09%	33.33%	28.57%	61.90%	

HER2 protein expression on CTCs

Evaluation of HER2 protein expression was only possible in 21 of the 26 CK+/CTCs. HER2 overexpression was detected in 13 of 21 CK+/CTCs (61.90%); 6 CK+/CTCs showed a 3+ staining and 7 CK+/CTCs presented a 2+ staining. Eight CK+/CTCs (38.10%) displayed a faint membrane staining and were scored as negative-expression. Finally, 5 out of these 26 CK+/CTCs were not evaluable. Figure 2 “HER2 column” shows a representative example of HER2 expression on the isolated CK+/CTCs.

In addition, we found 9 tumor cells that were CK negative (CK-)/CTCs, but histopathological examination revealed that they were tumor cells. In these 9 CK-/CTCs, HER2 overexpression was detected in 6 of them, with a 3+ staining; and 3 tumor cells, showed faint membrane staining (scored as negative for HER2 expression) (Fig. 3). In summary, 19 (13 CK+/CTCs and 6 CK-/CTCs) CTCs had HER2 overexpression (63.33%) and 11 (8 CK+/CTCs and 3 CK-/CTCs) CTCs were negative for HER2 (36.67%).

Figure 3. HER2 expression on CK-/CTCs (x100 objective) from IN 28 patient. The score of HER2 protein expression is shown in the lower right corner of the images (scale bar: 12.32 µm).



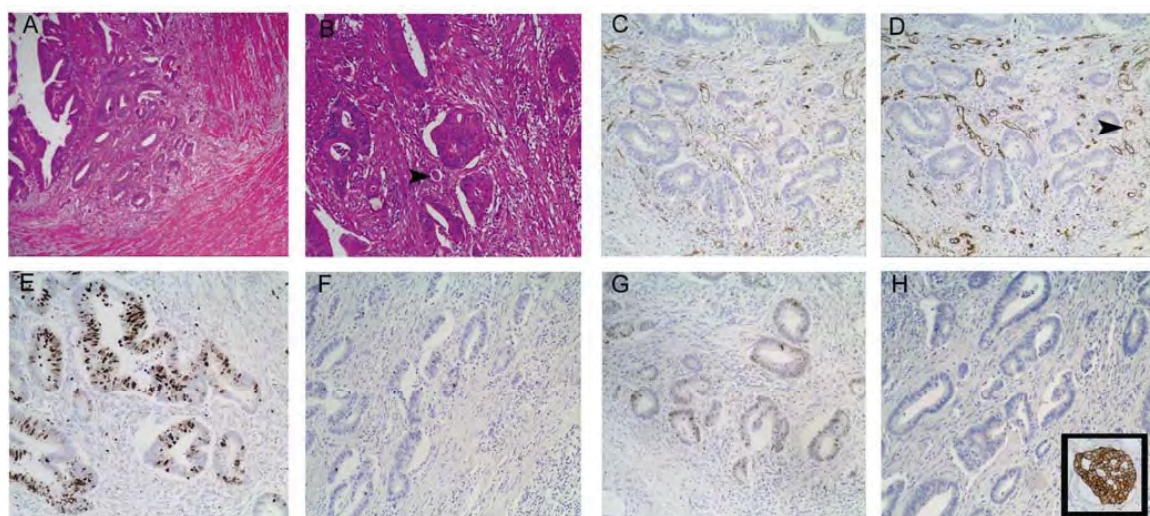
Immunohistochemistry and FISH of the primary tumor tissue for IN 28 patient

Focusing on IN 28 patient (stage II) we decided to make a deeper study of the primary tumor. Histological examination revealed an infiltrative adenocarcinoma (Fig. 4) without positive nodes or distant metastases (he was followed up until April 15, 2008). Mayer's haematoxylin & eosin-stained slides showed high grade of tumor's aggressiveness (Fig. 4A; B). The tumor stained strongly for Ki-67 (up to 90% of stained cells) (Fig. 4E), cyclin D1

(about 50%) (Fig. 4G), with nearly nil expression of p53 (Fig. 4F) and no expression of HER2 (Fig. 4H). Immunohistochemical demonstration of CD31 and CD34

showed well developed microvasculature as well as the presence of tumour cells within small vessels (Fig. 4C; D respectively).

Figure 4. Histopathological features of the tumor from IN 28 patient (stage II). (A) Neoplastic glands with infiltrative pattern of growth affecting the muscular propria layer of the bowel. Haematoxylin-eosin, x10 objective. (B) Detail from the neoplastic glands, atypical but well conformed, although fused glands are present. Note the presence of lymphovascular (small vessel) invasion (arrowhead). Haematoxylin-eosin, x40 objective. (C-G) Immunohistochemical expression of the markers in the tumor, showing high microvessel density as seen by CD31(C) and CD34 (D) immunostaining. The arrowhead corresponds to small vessel invasion. High proliferative index (Ki-67) (E), low p53 expression (F), high expression of cyclin D1 (G) and Herceptest (H) negative test define the molecular characterization of this tumor (insert into the lower right quadrant of figure: Positive control from intraductal breast carcinoma). All figures: Envision ® method, x20 objective.



FISH analysis of different two sections, demonstrated no ERBB2 amplification and disomic pattern for chromosome 17 (data not shown). The negative expression of HER2 is in line with the FISH result found in the primary tumor, but neither of them matched with the CK+/CTCs' results of this patient.

Discussion

In this study, we analyzed genetic alterations of chromosome 17 and ERBB2 gene by FISH in CK+/CTCs of 25 PB samples from a total of 33 non-metastatic colon cancer patients (stages 0-III). Some studies in breast cancer have demonstrated that HER2 expression can be acquired in CTCs from HER2 negative tumor during tumor progression [26, 27, 28], and that detection of these CTCs with overexpression of HER2 could be associated with a worst prognosis [29]. Therefore, we decided to study

the genetic status of this gene in our series of patients. We have also chosen the analysis of ERBB2/HER2 protein because there is a monoclonal antibody against this protein that is nowadays being used in breast cancer treatment [30, 31]. Furthermore, this treatment could be used in other types of tumors with ERBB2 amplifications or HER2 protein overexpression [9, 32] and in patients with ERBB2-amplified or HER2+ CTCs [26].

It should be noted that only few studies have been focused on the genetic characteristics of CTCs in cancer patients. Only two reports have applied cytogenetic techniques in search of chromosome aneuploidies in CTCs from PB in metastatic [33] and non-metastatic colon cancer patients [34]. One of them indicates that CTCs were heterogeneous for chromosomal abnormalities and the gain of chromosomes was more frequent than the genetic loss [33]. These results are in agreement with findings in other tumors

types, such as breast [33] or prostate cancer [33, 35]. Only few studies have applied FISH technique to evaluate specific genes status in CTCs such as the concordance of ERBB2 amplification in CTCs and primary tumors in breast cancer patients [26, 36]; or the amplification of androgen receptor (AR) and MYC genes in CTCs from prostate cancer patients [35].

In this article, we have demonstrated the utility of a method that combines an immunomagnetic selection of CTCs from peripheral blood of colon cancer patients with FICTION technique. FICTION technique was developed by Weber-Matthiesen et al. (1992) to assign tumor cells a cytogenetically defined clone and to determine their specific cell lineage at one time. FICTION technique allows genetic and phenotypic CTC characterization without cell membrane destruction and subsequent cell's relocation, which typically is done in FISH, which the subsequent time consuming and loss of valuable tumor cells [35]. Furthermore, we demonstrate the feasibility to study second marker expression by immunocytochemistry on the same CTC.

The most interesting finding in this work was, apart from demonstrating the validity of the technique to analyze simultaneously CK+/CTCs' phenotype and genotype, the discovery of a gain in chromosome 17 and HER2 overexpression in a patient with HER2 negative primary tumor. FISH analysis of the primary tumour demonstrated disomy for chromosome 17 and ERBB2 gene. A total of 26 CK+/CTCs were isolated from the PB of this colon cancer patient. These tumor cells were an heterogeneous cell population with basically two patterns. The predominant one (~88.00%) showed trisomy of chromosome 17 and the second pattern was characterized by disomy for this chromosome (~11.00%). Both populations of these CK+/CTCs presented 2 copies of ERBB2 gene (~80%) but neither of them had ERBB2 amplifications. In contrast, when we analyzed the expression of HER2 protein, 61.90% of the CK+/CTCs showed overexpression (63.33% if we also counted CK-/CTCs). This patient we re scored a s HER2+ CTCs (more than 10% of CTCs were HER2+), some studies showed that evaluation of only 10 CTCs could indicate the patient's HER2 status [26, 38, 39].

Our finding of the existence of a heterogeneous CTCs population in the same PB sample, and the tumor cells CKs expression variability are in keeping with the results shown in metastatic colon [33], prostate and breast cancer patients [40]. The fact that CTCs in this patient overexpressed HER2, whereas the primary tumor did not, can be explained by the possibility that these CTCs may come from an unusual subclone of tumor cells that are not readily detectable by primary tumor biopsy. Alternatively, CTCs could express HER2 *de novo*, since this may confer a survival advantage to metastatize. Obviously, we cannot conclude that colon cancer patients with HER2 overexpression in CTCs should be treated with trastuzumab (Herceptin) therapy. However, it is worth noticing that breast cancer patients with ERBB2-amplified CTCs were treated with trastuzumab and showed a partial or complete remission [26]. Other few studies hypothesize that HER2 CTC status determination could be a tumoral marker for the use of HER2-targeted therapies [27, 28]. Future studies would be needed to determine the convenience of targeting ERBB2/HER2 in colon cancer.

We have only detected 3 CK+/CTCs in a total of 33 (9.09%) non-metastatic colon cancer patients. In addition, CK+/CTCs detection did not correlate with primary tumor characteristics or with PFS or OS. This percentage of CK+/CTCs-positive patients is lower than those published in previous studies [23, 24, 41]. However, other studies have reported similar percentages of CTCs in PB to those showed in our study [34, 42]. The main difference between these two sets of studies is the study population, which may explain the disparity found between these results.

In metastatic colorectal cancer patients [23, 43, 44], where the sample collection was taken postoperatively and before a chemotherapy treatment was initiated, a number of CTCs higher than 2 or 3 correlated with shorter OS and/or PFS [41, 43] and the only presence of this tumor cells identified chemotherapy resistant patients [44].

In non-metastatic colon cancer patients, analysis of CTCs in peripheral blood before surgery or chemotherapy treatment rendered a similar percentage to the one found here. Wind et al. (2009) tested the detection of CTCs in PB and portal

blood in different sets of samples in 31 non-metastatic colon cancer patients at different time points: before tumor's mobilization, after tumor's mobilization and post-surgery. This report showed a CTCs detection rate of 4%-7% in peripheral blood vs. 26%-54% in portal blood, depending on when blood samples was obtained, and described no correlation between tumor cells detection and clinicopathologic characteristics or disease progression. Thorsteinsson et al. (2011) found that 5% of samples (1/20 non-metastatic colon cancer patients) before surgery were positive for CTCs whereas samples taken after surgery were negative. This study reported no correlation between CTCs detection and the tumor characteristics, PFS or OS. Therefore, our results suggest that basal levels of CTCs (or CK+/CTCs) in non-metastatic colon cancer patients may have no prognostic value, although further studies with larger series of patients should be carried out to address this issue.

Cohen et al. (2006) theorized that colorectal cancer biology could play an important role in CTCs' recovery, since this type of cancer disseminated more frequently via portal blood than other epithelial tumor which disseminated via peripheral blood such as breast and prostate cancer. Thus, these authors suggested that metastatic colorectal cancer patients might be less likely to have CTCs in peripheral blood than metastatic breast or prostate cancer patients. Consequently, in non-metastatic patients it would be more noted. For example, Wind et al. (2009) detected a higher percentage of non-metastatic colon cancer patients with CTCs in portal than in peripheral blood (54%; 31%; 45% in portal blood vs. 7%; 4%; 4% in peripheral blood, these samples were taken before tumor's mobilization, after tumor's mobilization or post-surgery, respectively).

In the patient where we found gain of chromosome and HER2 overexpression in CTCs, we may speculate that this would confer metastatic advantage. In breast cancer, it has been previously reported that HER2 overexpression can be acquired during tumor progression: CTCs may express HER2 although their primary tumor was considered as HER2 negative [26-28]. The detection of these CTCs with HER2 overexpression could be associated with a worst prognosis [29]. Although the use of HER2-targeting drugs

(such as trastuzumab) is not yet approved for colon cancer, clinical trials are underway to test its efficacy in the selected small population of HER2+ patients.

Due to CTCs are one of the sources of the metastatic disease's origin [46, 47] and that genetic changes accompany tumor progression may occur before the recurrence is detected [26, 38]. We hypothesize that CTCs' genotype and phenotype analyses could complete the real status of the disease. Therefore, CTCs' evaluation should be considered in the clinical practice.

Conclusions

The conclusions from our study are as follows: (i) individualized CTCs analysis using the technique described in the present article may provide additional information to conventional pathological diagnosis; (ii) chromosome 17 triploidy and HER2 overexpression can appear in CTCs of early stages colon cancer patients.

Authors' contributions

MC, RL, JJ, RM, FW, CS-Q, MD and JJG (all authors) participated in the design of the study. MC performed the immunohistochemical and FICTON techniques and evaluated the results, photography acquisition and interpretation, and wrote the manuscript. RL performed primary tumor evaluation and interpretation of the results. JJ and RM contributed to patients' admission and their follow-up. MD-R contributed to statistical evaluation of the results. FW, CS-Q, AC and JJG revised the manuscript. JJG devised and directed the study. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

Authors declare that there are no financial interests in relation to the work described.

Acknowledgments

This study was supported by the "Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña" (to JJ Gaforio).

References

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. **Global cancer statistics.** *CA Cancer J Clin* 2011, **61**:69-90.

2. Le Voyer TE, Sigurdson ER, Hanlon AL, Mayer RJ, Macdonald JS, Catalano PJ, Haller DG. **Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: a secondary survey of intergroup trial INT-0089.** *J Clin Oncol* 2003, **21**:2912-2919.
3. Facchini LM, Penn LZ. **The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights.** *FASEB J* 1998, **12**:633-651.
4. Nathanson DR, Culliford IV AT, Shia J, Chen B, D'alessio M, Zeng Z-S, Nash GM, Gerald W, Barany F, Paty PB. **HER 2/neu expression and gene amplification in colon cancer.** *Int J Cancer* 2003, **105**:796-802.
5. Takenaka M, Hanagiri T, Shinohara S, Kuwata T, Chikaishi Y, Oka S, Shigematsu Y, Nagata Y, Shimokawa H, Nakagawa M, Uramoto H, So T, Tanaka F. **The Prognostic Significance of HER2 Overexpression in Non-small Cell Lung Cancer.** *Anticancer Res* 2011, **31**:4631-4636.
6. Tsapralis D, Panayiotides I, Peros G, Liakakos T, Karamitopoulou E. **Human epidermal growth factor receptor-2 gene amplification in gastric cancer using tissue microarray technology.** *World J Gastroenterol* 2012, **18**:150-155.
7. Kuwada SK, Scaife CL, Kuang J, Li X, Wong RF, Florell SR, Coffey RJ Jr, Gray P. **Effects of trastuzumab on epidermal growth factor receptor-dependent and -independent human colon cancer cells.** *Int J Cancer* 2004, **109**:291-301.
8. Kelly RJ, Carter C, Giaccone G. **Personalizing therapy in an epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer using PF-00299804 and trastuzumab.** *J Clin Oncol* 2010, **28**:e507-510.
9. Javle M, Hsueh CT. **Recent advances in gastrointestinal oncology--updates and insights from the 2009 annual meeting of the American society of clinical oncology.** *J Hematol Oncol* 2010, **3**:11.
10. Choi JH, Han HS, Lee HC, Lee OJ, Kim JT, Lim SN, Lee KH, Kim ST. **Positive response to trastuzumab in a case of HER2-overexpressing metastatic gastric cancer that presented as severe thrombocytopenia.** *Onkologie* 2011, **34**:621-624.
11. Morishita A, Gong J, Nomura T, Yoshida H, Izuishi K, Suzuki Y, Kushida Y, Haba R, D'armiento J, Masaki T. **The use of protein array to identify targetable receptor tyrosine kinases for treatment of human colon cancer.** *Int J Oncol* 2010, **37**:829-835.
12. Al-Kuraya K, Novotny H, Bavi P, Siraj AK, Uddin S, Ezzat A, Sanea NA, Al-Dayel F, Al-Mana H, Sheikh SS, Mirlacher M, Tapia C, Simon R, Sauter G, Terracciano L, Tornillo L. **HER2, TOP2A, CCND1, EGFR and C-MYC oncogene amplification in colorectal cancer.** *J Clin Pathol* 2007, **60**:768-772.
13. Dursun A, Poyraz A, Sür O, Sezer C, Akyol G. **Expression of Bcl-2 and c-ErbB-2 in colorectal neoplasia.** *Pathol Oncol Res* 2001, **7**:24-27.
14. Kavanagh DO, Chambers G, O'Grady L, et al. **Is overexpression of HER-2 a predictor of prognosis in colorectal cancer?** *BMC Cancer* 2009, **9**:1.
15. Gaforio JJ, Serrano MJ, Sánchez-Rovira P, Antonio Sirvent A, Delgado-Rodríguez M, Campos M, de la Torre N, Algarra I, Dueñas R, Lozano A. **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**:984-990.
16. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LWMM, Hayes DF. **Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer.** *N Engl J Med* 2004, **351**:781-791.
17. Cristofanilli M, Mendelsohn J. **Circulating tumor cells in breast cancer: Advanced tools for "tailored" therapy?** *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, **103**:17073-17074.
18. Müller V, Hayes DF, Pantel K. **Recent translational research: circulating tumor cells in breast cancer patients.** *Breast Cancer Res* 2006, **8**:110.
19. Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, Doyle GV, Matera J, Allard WJ, Miller MC, Fritsche HA, Hortobagyi GN, Terstappen LW. **Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer.** *J Clin Oncol* 2005, **23**:1420-1430.
20. Camara O, Rengsberger M, Egbe A, Koch A, Gajda M, Hammer U, Jörke C, Rabenstein C, Untch M, Pachmann K. **The relevance of circulating epithelial tumor cells (CETC) for therapy monitoring during neoadjuvant (primary systemic) chemotherapy in breast cancer.** *Ann Oncol* 2007, **18**:1484-1492.
21. Pierga JY, Bidard FC, Mathiot C, Brain E, Delaloge S, Giachetti S, de Cremoux P, Salmon R, Vicent-Salomon A, Marty M. **Circulating tumor cell detection predicts early metastatic relapse after neoadjuvant chemotherapy in large operable and locally advanced breast cancer in a phase II randomized trial.** *Clin Cancer Res* 2008, **14**:7004-7010.
22. Koch M, Kienle P, Kastrati D, Antolovic D, Schmidt J, Herfarth C, von Knebel Doeberitz M, Weitz J. **Prognostic impact of hematogenous tumor cell dissemination in patients with stage II colorectal cancer.** *Int J Cancer* 2006, **118**:3072-3077.
23. Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, Picus J, Morse M, Mitchell E, Miller MC, Doyle GV, Tissing H, Terstappen LW, Meropol NJ. **Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer.** *J Clin Oncol* 2008, **26**:3213-3221.
24. Sastre J, Maestro ML, Puente J, Veganzones S, Alfonso R, Rafael S, García-Saenz JA, Vidaurreta M, Martín M, Arroyo M, Sanz-Casla MT, Díaz-Rubio E. **Circulating tumor cells in colorectal cancer: correlation with clinical and pathological variables.** *Ann Oncol* 2008, **19**:935-938.
25. Campos M, Prior C, Warleta F, Zudaire I, Ruiz-Mora J, Catena R, Calvo A, Gaforio JJ. **Phenotypic and Genetic Characterization of Circulating Tumor Cells by Combining Immunomagnetic Selection and FICTION Techniques.** *J Histochem Cytochem* 2008, **56**:667-675.
26. Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Haley B, Perkins S, Beitsch P, Khan A, Euhus D, Osborne C, Frenkel E, Hoover S, Leitch M, Clifford E, Vitetta E, Morrison L, Herlyn D, Terstappen LW, Fleming T, Fehm T, Tucker T, Lane N, Wang J, Uhr J. **HER2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**:9393-9398.
27. Fehm T, Becker S, Duerr-Stoerzer S, Sotlar K, Mueller V, Wallwiener D, Lane N, Solomayer E, Uhr J. **Determination of HER2 status using both serum HER2 levels and circulating tumor cells in patients with recurrent breast cancer whose primary tumor was HER2 negative or of unknown HER2 status.** *Breast Cancer Res* 2007, **9**:R74.
28. Fehm T, Müller V, Aktas B, Janni W, Schneeweiss A, Stickeler E, Latrich C, Löhberg CR, Solomayer E, Rack B, Riethdorf S, Klein C, Schindlbeck C, Brocker K, Kasimir-Bauer S, Wallwiener D, Pantel K. **HER2 status of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: a prospective, multicenter trial.** *Breast Cancer Res Treat* 2010, **124**:403-412.
29. Wülfing P, Borchard J, Buerger H, Heidl S, Zänker KS, Kiesel L, Brandt B. **HER2-positive circulating tumor cells indicate poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients.** *Clin Cancer Res* 2006, **12**:1715-1720.
30. Slamon D, Leyland-Jones B, Haks S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. **Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2.** *N Engl J Med* 2001, **344**:783-792.
31. Madarnas Y, Trudeau M, Franek JA, McCreedy D, Pritchard KI, Messersmith H. **Adjuvant/neoadjuvant trastuzumab therapy in women with HER2/neu-overexpressing breast cancer: A systematic review.** *Cancer Treat Rev* 2008, **34**:539-557.
32. Langer CJ, Stephenson P, Thor A, Vangel M, Johnson DH. **Trastuzumab in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer: is there a role? Focus on Eastern Cooperative Oncology Group study 2598.** *J Clin Oncol* 2004, **22**:1180-1187.

33. Fehm T, Sagalowsky A, Clifford E, Beitsch P, Saboorian H, Euhus D, Meng S, Morrison L, Tucker T, Lane N, Ghadimi, Heselmeyer-Haddad K, Ried T, Rao C, Uhr J. **Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant.** *Clin Cancer Res* 2002, **8**:2073-2084.
34. Wind J, Tuynman JB, Tibbe AGJ, Swennenhuis JF, Richel DJ, van Berge Henegouwen MI, Bemelman WA. **Circulating tumour cells during laparoscopic and open surgery for primary colonic cancer in portal and peripheral blood.** *Eur J Surg Oncol* 2009, **35**:942-950.
35. Swennenhuis JF, Tibbe AGJ, Levink R, Sipkema RCJ, Terstappen LWMM. **Characterization of circulating tumor cells by fluorescence in situ hybridization.** *Cytometry A* 2009, **75**:520-527.
36. Salido M, Tusquets I, Corominas JM, Suarez M, Espinet B, Corzo C, Bellet M, Fabregat X, Serrano S, Solé F. **Polysomy of chromosome 17 in breast cancer tumors showing an overexpression of ERBB2: a study of 175 cases using fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry.** *Breast Cancer Res* 2005, **7**:R267-R273.
37. Weber-Matthiesen K, Winkemann M, Müller-Hermelink A, Schlegelberg B, Grote W. **Simultaneous fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics: A contribution to the characterization of tumor cells.** *J Histochem Cytochem* 1992, **40**:171-5.
38. Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Saboorian H, Haley B, Frenkel E, Euhus D, Leitch M, Osborne C, Clifford E, Perkins S, Beitsch P, Khan A, Morrison L, Herlyn D, Terstappen LWMM, Lane N, Wang J, Uhr J. **uPAR and HER-2 gene status in individual breast cancer cells from blood and tissues.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, **103**:17361-17365.
39. Cao S, Li Y, Li J, Li CF, Zhang W, Yang ZQ, Meng SD. **Quantitative determination of HER2 expression by confocal microscopy assay in CTCs of breast cancer.** *Oncol Rep* 2010, **23**:423-428.
40. Mikolajczyk SD, Millar LS, Tsinberg P, Coutts SM, Zomorodi M, Pham T, Bischoff FZ, Pircher TJ. **Detection of EpCAM-negative and cytokeratin-negative circulating tumor cells in peripheral blood.** *J Oncol* 2011, **2011**:252361.
41. Maestro LM, Sastre J, Rafael SB, Vegazones SB, Vidaurreta M, Martín M, Olivier C, de la Orden VB, Garcia-Saenz JA, Alfonso R, Arroyo M, Diaz-Rubio E. **Circulating tumor cells in solid tumor in metastatic and localizes stages.** *Anticancer Res* 2009, **29**:4839-4844.
42. Thorsteinsson M, Söletormos G, Jess P. **Low number of detectable circulating tumor cells in non-metastatic colon cancer.** *Anticancer Res* 2011, **31**:613-618.
43. Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, Picus J, Morse MA, Mitchell E, Miller MC, Doyle GV, Tissing H, Terstappen LW, Meropol NJ. **Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer.** *Ann Oncol* 2009, **20**:1223-1229.
44. Molnar B, Ladanyi A, Tanko L, Sréter L, Tulassay Z. **Circulating tumor cell clusters in the peripheral blood of colorectal cancer patients.** *Clin Cancer Res* 2001, **7**:4080-4085.
45. Cohen SJ, Alpaugh RK, Gross S, O'Hara SM, Smirnov DA, Terstappen LW, Allard WJ, Bilbee M, Cheng JD, Hoffman JP, Lewis NL, Pellegrino A, Rogatko A, Sigurdson E, Wang H, Watson JC, Weiner LM, Meropol NJ. **Isolation and characterization of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer.** *Clin Colorectal Cancer* 2006, **6**:125-132.
46. Pantel K, Brakenhoff RH. **Dissecting the metastatic cascade.** *Nat Rev Cancer* 2004, **4**:448-456.
47. Paterlini-Brechot P, Benali NL. **Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions.** *Cancer Lett* 2007, **253**:180-204.

Trabajo experimental y resumen global de los resultados

Utilidad pronóstica de la detección de CTCs en pacientes con tumores sólidos de origen epitelial.

Capítulo 4

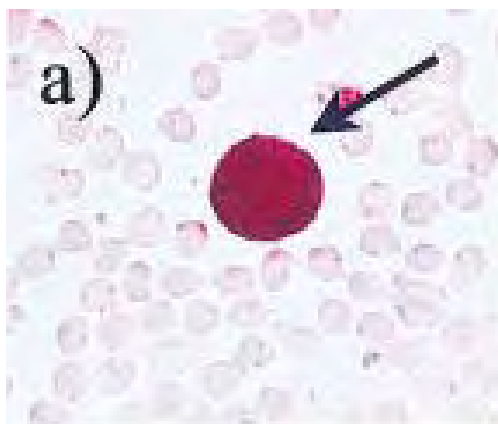
Resumen global de los resultados

Resultados del trabajo experimental del capítulo 1

1.1. Mejora del rendimiento del enriquecimiento de células tumorales circulantes empleando una centrifugación en doble gradiente de densidad

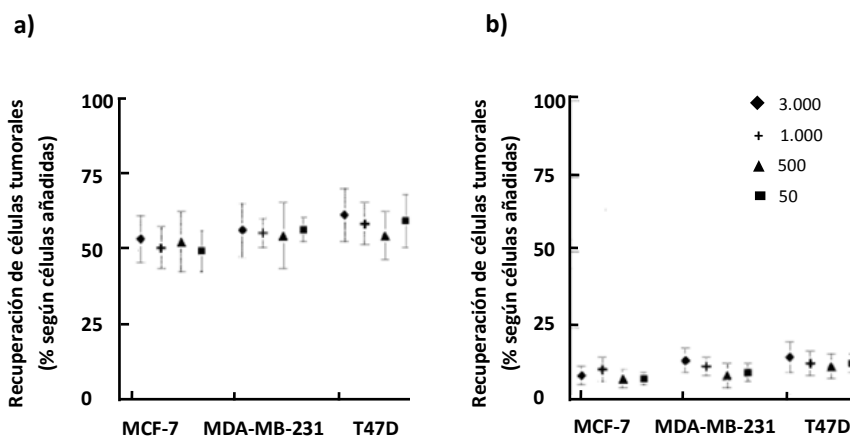
El primer paso para desarrollar la técnica de enriquecimiento celular fue comprobar en qué fracción de células nucleadas, fracción mononuclear (MNC) o fracción granulocítica (GC), de la sangre periférica sedimentaban, preferentemente, las células tumorales de cáncer de mama. Para esto se realizaron varios controles positivos que fueron procesados de la siguiente forma: sangre periférica de voluntarios sanos que fue mezclada con un número variable (3.000; 1.000; 500; y 50 células) de células tumorales de 3 líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7, MDA-MB-231 o T47D); las muestras de sangre mezcladas con las células tumorales fueron centrifugadas utilizando un doble gradiente de densidad (HISTOPAQUE-1119 y -1077, Sigma-Aldrich) para obtener, de esta forma, las fracciones MNC y GC; posteriormente, cada fracción celular fue recogida y procesada de forma individual para el enriquecimiento inmunomagnético de las células tumorales y su detección por inmunocitoquímica (ICC) (Figura 1a). Una vez terminado este procesamiento, se observó que aunque la mayor parte de células tumorales sedimentaban en la fracción MNC (Figura 2), existían células tumorales que sedimentan en la fracción GC.

FIGURA 1. Células CK+ (flecha negra) detectadas por inmunocitoquímica.



(a) Sangre de un voluntario sano mezclada con células tumorales MDA-MB-231. El rango de recuperación celular, empleando el doble gradiente de densidad y el enriquecimiento inmunomagnético, fue del 60% al 80%. Estos cálculos fueron realizados en base al número total de células tumorales añadidas a las muestras sanguíneas de voluntarios sanos.

FIGURA 2. Recuperación de células tumorales de (a) fracción MNC y (b) fracción GC, tras mezclar muestras sanguíneas de voluntarios sanos con 3.000, 1.000, 500 y 50 células. Cada fracción celular fue procesada de forma separada. Tras el enriquecimiento inmunomagnético, las células tumorales fueron detectadas por inmunocitoquímica. Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados que se muestran son las medias de los triplicados y el rango de células tumorales recuperadas.



Para confirmar que existían células tumorales que aparecían en la fracción GC, se realizó un ensayo que consistía en el análisis por citometría de flujo de las fracciones de células nucleadas por separado. Para esto se mezcló sangre periférica de voluntarios sanos con un número

variable de células tumorales (3.000 y 1.000 células) de dos líneas celulares humanas de cáncer de mama (MCF-7 o MDA-MB-231). Estas muestras fueron centrifugadas usando el doble gradiente de densidad (HISTOPAQUE- 1119 y -1077) y se recogieron las fracciones MNC y GC. A partir de aquí, cada fracción celular fue procesada de forma separada, y se realizó el marcaje con anticuerpos monoclonales (mAbs) anti-CD45-Quantum Red (clon: BRA-55, Sigma), el cual reacciona frente a células hematopoyéticas, pero no con células tumorales; y anti-Ber-EP4-FITC (clon: Ber-EP4, Dako), este mAb reacciona frente a dos glicopéptidos (peso molecular de 34 y 39 KDa) que son expresados por las células tumorales de mama, pero no en las células hematopoyéticas. Tras esta marcación las muestras fueron analizadas por citometría de flujo, donde las células tumorales fueron detectadas como células Ber-EP4 positivas y CD45 negativas. Al igual que antes, se observó que aunque la mayor parte de las células tumorales sedimentaban en la fracción MNC aparecía una fracción de éstas que sedimentan en la fracción GC (Tabla II).

1.2. Eficacia y especificidad del método

Cuando se aplica el doble gradiente de densidad (HISTOPAQUE- 1119 y -1077) y el enriquecimiento inmunomagnético positivo de células tumorales, se obtiene una recuperación celular del 60% al 80%, estos cálculos fueron realizados en base al número total de células tumorales añadidas a las muestras sanguíneas de voluntarios sanos. La detección de células CK+ se realizó por ICC, procedimiento que está descrito en materiales y métodos. En los controles negativos, sangre periférica de voluntarios sanos, no se detectaron células CK+ en ninguno de ellos.

TABLA II. Detección por citometría de flujo de células Ber-EP4-positivas y CD45-negativas en los experimentos de recuperación celular ¹.

	Células MCF7 mezcladas en 5 ml de sangre periférica (n)		Células MDA-MB-231 mezcladas en 5 ml de sangre periférica (n)	
	3000	1000	3000	1000
Recuperación de células tumorales en la fracción MNC (%)	47	49	53	55
Recuperación de células tumorales en la fracción GC (%)	6	5	7	6

¹ Los resultados que se muestran son las medias de experimentos realizados por triplicado

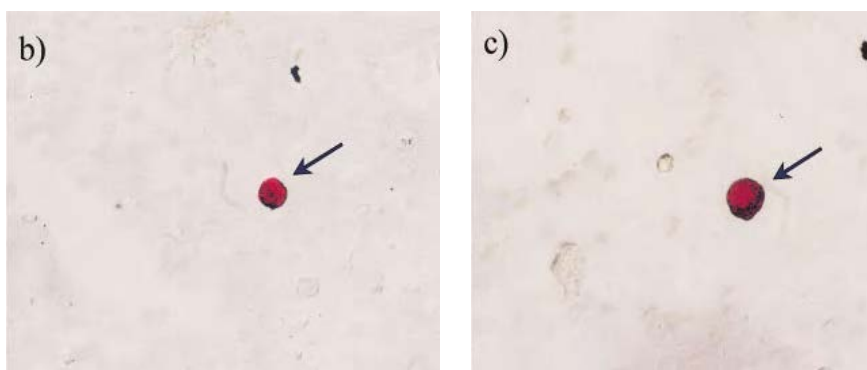
1.3. Correlación de células CK+ en sangre periférica con las características clinicopatológicas

Las células CK+ de las muestras sanguíneas de los pacientes con cáncer de mama, fueron detectadas por ICC, y mostraron un patrón de marcación citoplasmático fuerte. Estas células estaban rodeadas por células hematopoyéticas que no presentaban expresión de CKs (Figura 1b, c). En la Tabla I aparece la correlación entre la presencia de células CK+ en sangre periférica y las características de los pacientes. Los estadísticos que se aplicaron fueron: para la asociación ordinal de variables, el test exacto de Fisher (valores *p*); y para el análisis de tendencia de las variables, el estadístico de Pearson o la prueba de la Chi cuadrado.

La población de estudio fue de 92 pacientes con cáncer de mama, neoadyuvantes (25); adyuvantes (42); y metastásicos (25). Las características de la población eran: edad media de la población de 55 años (rango = 26-77 años), donde el 64% de los pacientes eran mayores de 50 años; 54 pacientes (59%) postmenopáusicas; el estadio tumorales

más común fue el T2 (47%), seguido de los tumores T1 (20%) y los estadios T3 y T4 representaron el 27% de la población; el 74% de los pacientes presentó nódulos linfáticos positivos; y el cáncer ductal (70%) fue el tipo histológico más frecuente.

FIGURA 1. Células CK+ (flechas negras) detectadas por inmunocitoquímica. (b, c) Sangre periférica de dos pacientes con cáncer de mama. Las fracciones celulares fueron sometidas a un proceso de enriquecimiento y selección inmunomagnética, tras el cual fueron marcadas con el mAb CKs 7/8 CAM5.2. Las células CK+ presentaron un patrón de marcación citoplasmático fuerte, y aparecen rodeadas por células hematopoyéticas que no expresan CKs.



Las células CK+ fueron identificadas en 57 de los 92 (62%) pacientes con cáncer de mama, con un rango de 1-61 células (media = 8). Aparecieron diferencias significativas en la presencia de células CK+ de acuerdo a la expresión del receptor de estrógenos (ER) ($p=0,049$) y los nódulos linfáticos ($p=0,033$), pero no con las demás características estudiadas. Aunque, sí que se observó una tendencia significativa que estaba en el límite, entre la presencia de células CK+ y el tamaño tumoral ($p=0,07$).

Trabajo experimental y resumen global de los resultados

Utilidad pronóstica de la detección de CTCs en pacientes con tumores sólidos de origen epitelial.

TABLA I. Relación entre las características y biomarcadores de los pacientes con la detección de células CK-positivas en sangre periférica. ¹Significado estadístico.

Características y biomarcadores de los pacientes	Pacientes CK+ n (%)	Pacientes CK- n (%)	Valor-p
Nº de pacientes	57 (62,0)	35 (38,0)	
Edad (años)			0,827
≤50	21 (63,6)	12 (36,4)	
>50	36 (61,0)	23 (39,0)	
Estado menopáusico			0,521
Premenopáusica	22 (57,9)	16 (42,1)	
Postmenopáusica	35 (64,8)	19 (35,2)	
Tipo de paciente			0,679
Neoadyuvante	17 (68,0)	8 (32,0)	
Adyuvante	24 (57,1)	18 (42,9)	
Metastásico	16 (64,0)	9 (36,0)	
T (Tamaño tumor)			0,07
T1	9 (50,0)	9 (50,0)	
T2	27 (62,8)	16 (37,2)	
T3	5 (62,5)	3 (37,5)	
T4	13 (76,5)	4 (23,5)	
Tx	3 (50,0)	3 (50,0)	
N (Estado nódulos linfáticos)			0,033 ¹
N0	5 (33,3)	10 (66,7)	
N+	47 (69,1)	21 (30,9)	
Nx	5 (55,6)	4 (44,4)	
M (Metástasis a distancia)			1,000
M0	34 (61,8)	21 (38,2)	
M1	16 (64,0)	9 (36,0)	
Mx	7 (58,3)	5 (41,7)	
Estadificación TNM			0,543
I	2 (33,3)	4 (66,7)	
II	25 (64,1)	14 (35,9)	
III	14 (63,6)	8 (36,4)	
IV	16 (64,0)	9 (36,0)	
Tipo histológico			0,802
Ductal	38 (59,4)	26 (40,6)	
Lobular	9 (69,2)	4 (30,8)	
Otros	10 (66,7)	5 (33,3)	
ER (Receptor de estrógenos)			0,049 ¹
+	40 (69,0)	18 (31,0)	
-	11 (44,0)	14 (56,0)	
PgR (Receptor de progesterona)			0,461
+	34 (63,0)	20 (37,0)	
-	13 (52,0)	12 (48,0)	
cerbB-2			1,000
+	40 (61,5)	25 (38,5)	
-	8 (61,5)	5 (38,5)	
p53			0,559
+	22 (66,7)	11 (33,3)	
-	27 (62,8)	16 (37,2)	
Ki67			0,897
+	29 (59,2)	20 (40,8)	
-	5 (62,5)	3 (37,5)	

1.4. Análisis pronóstico

Las figuras 3 y 4 muestran los análisis de Kaplan-Meier de la supervivencia libre de progresión (o tiempo libre de progresión) y la supervivencia global dependiendo de la detección de células CK+, respectivamente. Los datos de seguimiento fueron tomados desde el momento de la última cita clínica o la fecha de la muerte (tiempo medio de seguimiento = 21 meses; rango = 2-31 meses).

Los datos completos de seguimiento se obtuvieron de 90 pacientes. Los análisis estadísticos (análisis Kaplan-Meier) mostraron que la detección de células CK+ en sangre periférica estaba correlacionada positivamente con la progresión de la enfermedad ($p=0,058$). Veintiséis pacientes desarrollaron progresión de la enfermedad en el periodo de seguimiento, 20 de estos pacientes presentaban células CK+ en sus muestras sanguíneas. Además, y sorprendentemente, los datos de correlación entre la presencia de células CK+ y la supervivencia muestran que, de los 90 pacientes a los que se les realizó el seguimiento completo, 11 de ellos murieron y todos presentaban células CK+ en sangre periférica. De forma contraria, todos los pacientes sin células CK+ continuaban con vida en el momento de la evaluación. De esta forma, el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier mostró que la presencia de células CK+ en sangre periférica estaba asociada a una supervivencia de la población más corta ($p=0,003$).

Figura 3. Curva Kaplan-Meier para el tiempo libre de enfermedad (PFS) en 26 pacientes según la detección de células CK+. En el grupo CK-negativo hay 6 pacientes (línea roja) y en el grupo CK+ hay 20 (línea azul). El PFS fue calculado desde la fecha de la detección de células CK+ en sangre periférica hasta la fecha de progresión clínica o patológica.

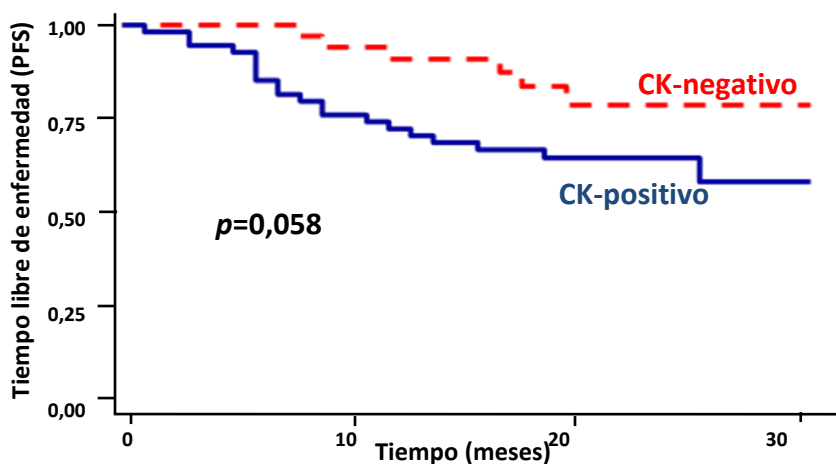
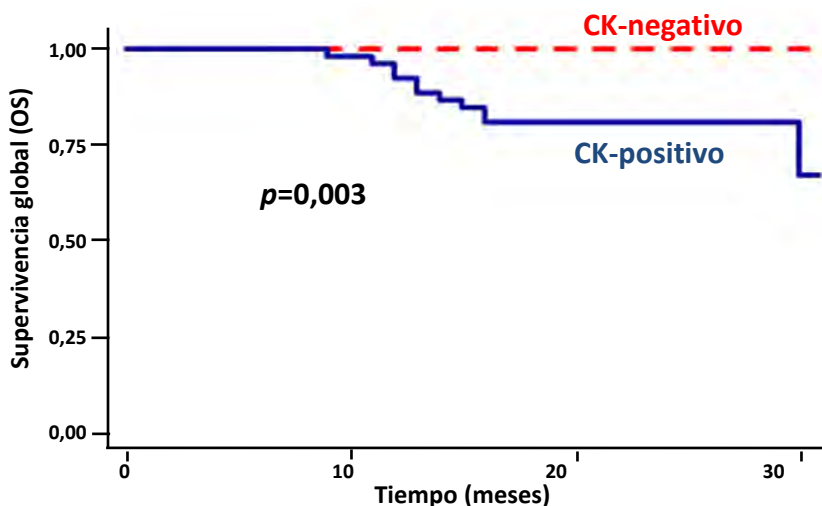


Figura 4. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia global (OS) en 90 pacientes según la detección de células CK+. En el grupo CK-negativo hay 34 pacientes (línea roja) y en el grupo CK+ hay 56 (línea azul). La OS se refiere a la supervivencia con o sin recurrencia de la enfermedad.



Resultados del trabajo experimental del capítulo 2

2.1. Eficiencia del método de inmunoselección de células tumorales (TCs)

La recuperación celular, para las tres líneas celulares estudiadas, estuvo en torno al 60%-80% (Tabla 1), este rango es muy similar al descrito en los resultados del trabajo se publicó en 2003 [Gaforio y cols., 2003]. El patrón de marcación citoplasmático, de todas las células tumorales [células citoqueratina positivas (células CK+)], fue fuerte; además, las células tumorales presentaron una morfología celular que era coherente con una morfología de fenotipo maligno (Figura 1A, C). Aunque las células tumorales eran inmunoseleccionadas específicamente, en la fracción positiva aparecieron algunas células hematopoyéticas (Figura 1A, C), hecho descrito en trabajos anteriores. La inmunofenotipación de las células tumorales fue llevada a cabo con un anticuerpo de ratón anti-CKs humanas, seguido por una marcación en cascada de dos anticuerpos fluorescentes (Alexa Fluor 350 ratón anti-humano y Alexa Fluor 350 cabra anti-ratón). Este procedimiento presentó una marcación excelente en las células tumorales de las tres líneas analizadas (Figura 1D, F).

2.2. Análisis FICTION (*"Fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics as a tool for investigation of neoplasm"*) de las TC seleccionadas

Las células de cáncer de mama fueron inequívocamente distinguibles de las células hematopoyéticas por la fluorescencia azul que mostraron, esto fue debido a la marcación que se empleó (Figura 2A, C); además, la morfología de las tres líneas celulares apareció bien conservada (Figura 2A, C).

La hibridación de la sonda génica, para *ERBB2*, *TOP2A* y el centrómero 17 (CEP17), fue claramente observada en la células tumorales y los leucocitos (Figura 2A, F) de las muestras. Los leucocitos presentaron dos señales para ambos genes y el centrómero, y sirvieron de control interno para la hibridación. En la Tabla 2 podemos observar los resultados cuantitativos de las señales encontradas en las células tumorales. En las células MCF-7, el patrón génico más común encontrado fue la presencia de tres copias del CEP17 y dos copias del gen *ERBB2* (media de $2,02 \pm 0,24$ copias por célula) y dos copias del gen *TOP2A* (media de $2,01 \pm 0,26$ copias por célula; Figura 2D; Tabla 2). En el caso de las células MDA-MB-231, se observó que existían dos patrones de marcación génica: un patrón predominante (91,33% de las células MDA-MB-231) que era trisómico para el cromosoma 17; y otro patrón que presentaba una tetrasomía para este cromosoma (8,67% de las células tumorales). En general, ninguna de estas poblaciones celulares presentó amplificaciones o deleciones de los genes, *ERBB2* o *TOP2A* (la relación media de los genes con respecto al CEP17 fue de 1,01 para ambos; Tabla 1). La línea celular SK-Br-3 presentó muchas señales para *ERBB2*, *TOP2A* y CEP17 (Figura 2F). El número medio de copias para el gen *ERBB2* fue de $25,87 \pm 7,39$, mientras que para el gen

TOP2A fue de $9,48 \pm 2,55$ copias. Esta línea celular presentaba amplificación del gen *ERBB2* (3,81 veces en relación al CEP17). En los controles negativos que se realizaron, no apareció señal azul (células CK+) ni señales de hibridación génica.

Figura 1. Líneas celulares tumorales mezcladas con sangre periférica de voluntarios sanos. Las fracciones de células mononucleares y granulocíticas son procesadas por un enriquecimiento inmunomagnético y detectadas utilizando inmunocitoquímica (A-C) o inmunofluorescencia (D-F). Las células tumorales [MCF-7 (A, D), MDA-MB-231 (B, E), y SK-BR-3 (C, F)], muestran un patrón de marcaje citoplasmático sólido, y aparecen rodeadas de células hematopoyéticas que no están marcadas (barra de escala = 75 μ m).

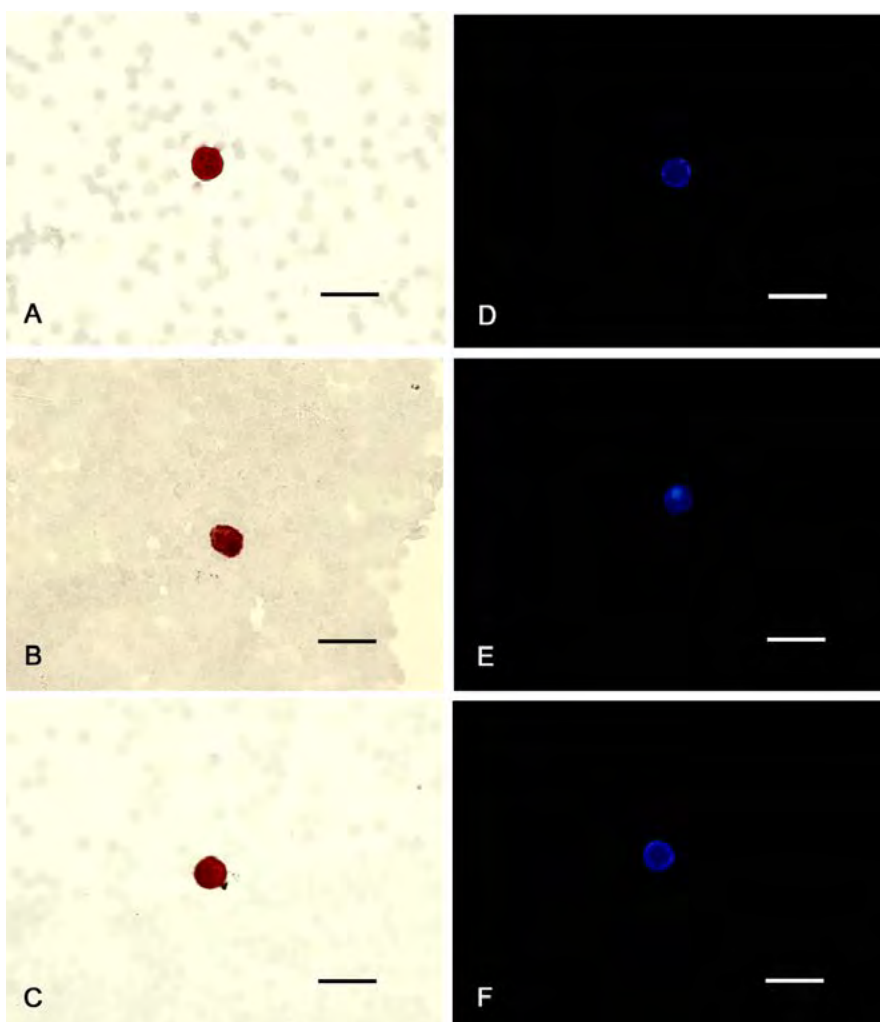


Figura 2. Sangre periférica de voluntarios sanos mezclada con diferentes líneas celulares tumorales. Las muestras son procesadas por un enriquecimiento inmunomagnético seguido de la técnica FICTION. Los leucocitos que aparecen en las muestras son negativos para la marcación con CK y sirven de control interno para la hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Las células tumorales [MCF-7 (A,D), MDA-MB-231 (B,E), y SK-Br-3 (C,F)] son claramente identificables y muestran señales de hibridación para *ERBB2* (*HER2/neu*) (verde), *TOP2A* (naranja), and CEP17 [aqua (azul claro)]. (D) Las células MCF-7 presentan tres copias del cromosoma 17 y dos copias de los genes *ERBB2* y *TOP2A* (media: 2 copias de ambos genes por célula). (E) El patrón más común de las células MDA-MB-231 presenta tres señales para CEP17, *ERBB2* y *TOP2A*. (F) Las células SK-Br-3 poseen un alto nivel de amplificación de *ERBB2* y un bajo nivel de amplificación para *TOP2A*. Se observan varias señales de hibridación para el CEP17. No todas las señales de los genes se encuentran en foco al mismo tiempo (barra de escala = 75 μ m).

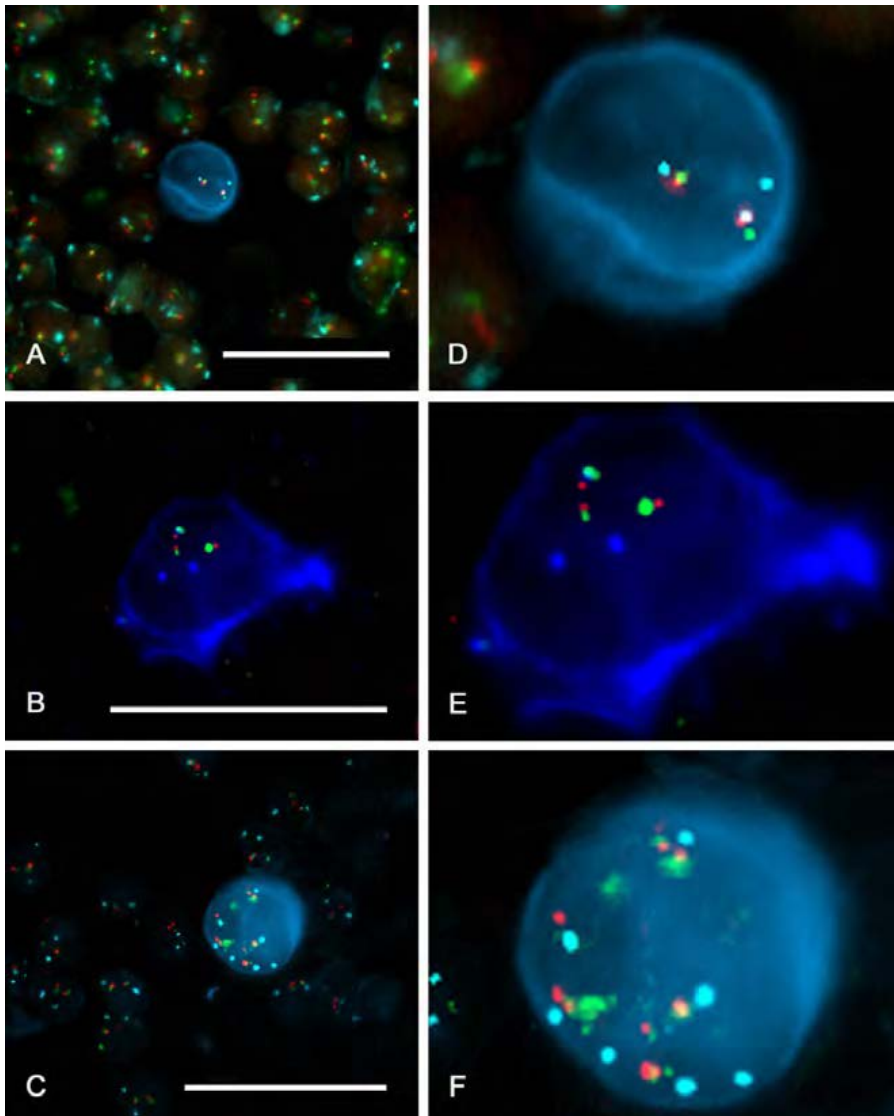


TABLA 1. Rangos de recuperación de células tumorales en sangre periférica.

Línea celular	Rangos de recuperación ^a			
	Nº de CT recuperadas en la M1	Nº de CT recuperadas en la M2	Nº de CT recuperadas en la M3	% total de recuperación
SK-Br-3	780	760	751	76,37
MCF-7	681	733	742	71,87
MDA-MB-231	670	657	622	64,97

^aPara determinar el número de células tumorales recuperadas, se mezclaron 1.000 células de líneas de cáncer de mama [MCF-7, MDA-MB-231 o SK-Br-3] con 10 ml de sangre periférica de 9 voluntarios sanos. *Capítulo 2: Materiales y Métodos, Análisis de recuperación celular.* CT = Células tumorales; M = Muestra.

Tabla 2. Número absoluto y relativo de copias de los genes *ERBB2* (*HER2/neu*) y *TOP2A*, en las células SK-Br-3, MCF-7, y MDA-MB-231, tras la separación inmunomagnética de sangre y el análisis FICTION.

Línea celular	Número copias de <i>ERBB2</i> (<i>HER2/neu</i>)		Número copias de <i>TOP2A</i>	
	Absoluto (media ± SD)	Relativo al CEP 17	Absoluto (media ± SD)	Relativo al CEP 17
LEUCOCITOS^a	2,00 ± 0,00	1,00	2,00 ± 0,00	1,00
SK-Br-3	25,87 ± 7,39	3,81 ^b	9,48 ± 2,55	1,40 ^b
MCF-7	2,02 ± 0,24	0,66 ^c	2,01 ± 0,26	0,66 ^c
MDA-MB-231	3,09 ± 0,28	1,01	3,09 ± 0,28	1,01

^aControl interno de las muestras, 450 células.

^bAmplificación génica.

^cDeleción génica.

Por cada tipo celular se han evaluado ciento cincuenta células tumorales (50 células tumorales por muestra).

CEP = Centrómero; SD = Desviación media.

Resultados del trabajo experimental del capítulo 3

3.1. Detección de células tumorales circulantes con expresión de citoqueratinas (CK+/CTCs) en pacientes con cáncer de colon

Se evaluó la presencia de CK+/CTCs en 33 muestras sanguíneas de pacientes con cáncer de colon no metastásico consecutivos. Los controles negativos empleados fueron las extracciones sanguíneas de 3 pacientes con diverticulosis y de seis voluntarios sanos. En ninguno de estos controles negativos se detectó presencia de CK+/CTCs.

Los resultados de la Tabla 1, muestran como estadísticamente no se encontró asociación entre la presencia de CK+/CTCs y las variables estudiadas en la población de pacientes con cáncer de colon no metastásico.

En 3 pacientes de los 33 analizados, se detectaron CK+/CTCs (9,09% de la población), con un número medio de CK+/CTCs aisladas, en estos 3 pacientes, de 9,67 células tumorales (rango de 1-26 células CK+). No se encontró asociación entre la presencia de CK+/CTCs y la supervivencia global de la población (OS) y/o el tiempo libre de enfermedad (PFS) (media de seguimiento = 13 meses; rango = 0,5-29,9 meses).

Tabla 1. Correlación entre la presencia de CK+/CTCs y las variables clínicopatológicas de los pacientes.

Variables clínicopatológicas	Número de CK+/CTCs/10ml		Valor p
	Pacientes CK+ (%)	Pacientes CK - (%)	
Género			
Hombre	2 (6,06%)	20 (60,60%)	0,718
Mujer	1 (3,03%)	10 (30,30%)	
Localización del tumor			
Colon ascendente	2 (6,06%)	12 (36,36%)	0,477
Colon transverso	0 (0,00%)	1 (3,03%)	
Colon descendente	0 (0,00%)	12 (36,36%)	
Colon sigmoide	1 (3,03%)	4 (12,12%)	
Colon transverso-sigmoide	0 (0,00%)	1 (3,03%)	
Grado de diferenciación			
Bien	2 (6,06%)	10 (30,30%)	0,289
Moderado y moderado-pobre	0 (0,00%)	13 (39,39%)	
Pobre	1 (3,03%)	5 (15,15%)	
TNM			
0	0 (0,00%)	2 (6,06%)	1,000
I	0 (0,00%)	3 (9,09%)	
II	1 (3,03%)	10 (30,30%)	
III	2 (6,06%)	15 (45,45%)	
Tipo histológico			
Adenocarcinoma	3 (9,09%)	26 (78,78%)	1,000
Adenocarcinoma mucinoso	0 (0,00%)	2 (6,06%)	
Adenocarcinoma intramucoso	0 (0,00%)	2 (6,06%)	
Configuración tumoral			
Excrecente	0 (0,00%)	6 (18,18%)	0,501
Excrecente-infiltrativo	0 (0,00%)	1 (3,03%)	
Infiltrativo	1 (3,03%)	7 (21,21%)	
Poliploide	0 (0,00%)	5 (15,15%)	
Ulcerativo	1 (3,03%)	1 (3,03%)	
Ulcer vegetativo	1 (3,03%)	9 (27,27%)	
Vegetativo	0 (0,00%)	1 (3,03%)	
Invasión tumoral			
Linfática			0,523
+	2 (6,06%)	15 (45,45%)	
-	1 (3,03%)	15 (45,45%)	
Venosa			0,744
+	0 (0,00%)	3 (9,09%)	
-	3 (9,09%)	27 (81,81%)	
Perineural			0,629
+	1 (3,03%)	8 (24,24%)	
-	2 (6,06%)	22 (66,67%)	

En cuanto a los tres pacientes con CK+/CTCs en sus muestras, en uno de ellos la detección de CK+/CTCs fue realizada por inmunocitoquímica y presentó una única CK+/CTC con una marcación citoplasmática fuerte, rodeada por células hematopoyéticas que no presentaban expresión de CKs (resultado que no se muestra). Las características genéticas de esta CK+/CTC no pudieron ser estudiadas por problemas técnicos. Las otras dos muestras fueron analizadas por FICTION, y los resultados se muestran en la sección de *Análisis FICTION en las CK+/CTCs inmunoseleccionadas*.

3.2. Caracterización de las líneas celulares tumorales por FICTION y expresión de HER2

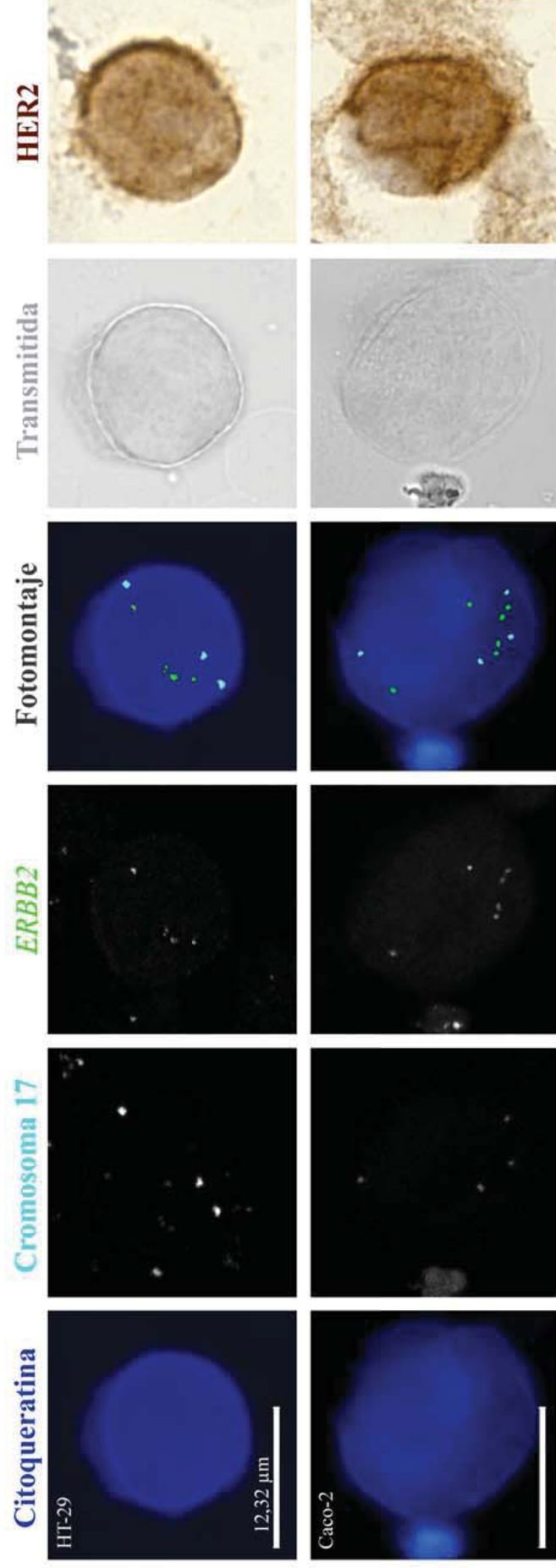
Lo primero que se realizó fue la caracterización, por la técnica FICTION, de las células de líneas tumorales (SK-Br-3, Caco-2, HT-29, MCF-7 y MDA-MB-231) mezcladas con sangre periférica de voluntarios sanos (controles positivos).

En los controles positivos, las células tumorales fueron inequívocamente distinguibles de las células hematopoyéticas, debido a la marcación fluorescente azul (CK+) que presentaban (Figura 1). En estas muestras, también, eran claramente observables las señales de hibridación del gen *ERBB2* y del CEP17, para ambos tipos celulares (células tumorales y leucocitos) (Figura 1). Todos los leucocitos presentaron dos señales del gen y del centrómero, lo que sirvió de control interno de la hibridación.

Para la evaluación de la inmunomarcación con anti-HER2 se analizaron: los cinco controles positivos (SK-Br-3, Caco-2, HT-29, MCF-7 y MDA-MB-231) y el control negativo de SK-Br-3 (en el cual se sustituyó el

anticuerpo primario por agua destilada), todos estos controles habían sido procesados previamente siguiendo el protocolo de FICTION. Los resultados mostraron un patrón de expresión diferente en cada control positivo (Figura 1). Las líneas SK-Br-3, Caco-2 y HT-29, mostraron una marcación fuerte (evaluada como 3+). Las células tumorales MCF-7 presentaron una marcación moderada (evaluada como 2+) y la línea MDA-MB-231 fue negativa para la expresión de HER2.

Figura 1. Imágenes en fluorescencia (objetivo 100X) de diferentes líneas celulares tumorales (HT-29, Caco-2, SK-Br-3, MCF-7 and MDA-MB-231) mezcladas con sangre periférica de voluntarios sanos, muestras procesadas por enriquecimiento inmunomagnético y FICTION (barra de escala: 12,32 μ m). La columna "Citoqueratina" muestra la marcación con CK de las células tumorales, las cuales se identifican claramente por su fluorescencia azul, evaluación realizada por microscopía de fluorescencia. Las columnas "Cromosoma 17" y "ERBB2" muestran las señales de hibridación para el CEP17 y el ERBB2 (HER2/neu) respectivamente (sobreposición de diferentes planos), evaluación realizada por microscopía confocal. La columna "Fotomontaje" muestra la sobreposición de las columnas "Citoqueratina" (azul), "Cromosoma 17" (aqua o azul claro) y "ERBB2" (verde). La columna "Transmitida" muestra la morfología de las células, analizado por microscopía confocal. La expresión de la proteína HER2 aparece en la última columna "HER2", estas células son diferentes a las fotografiadas en las otras columnas.



Citoqueratina

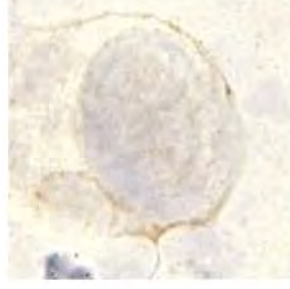
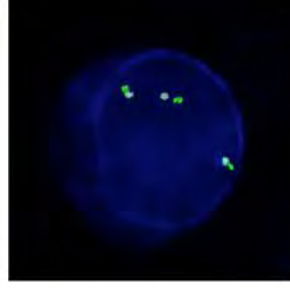
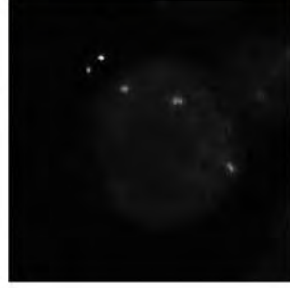
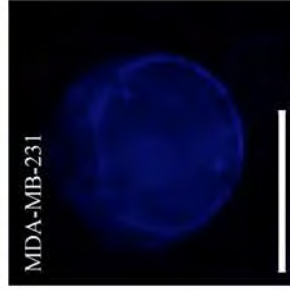
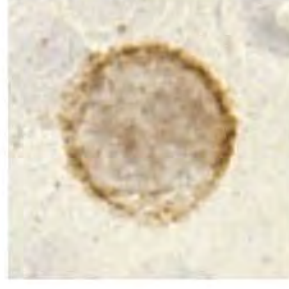
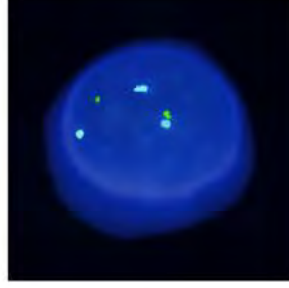
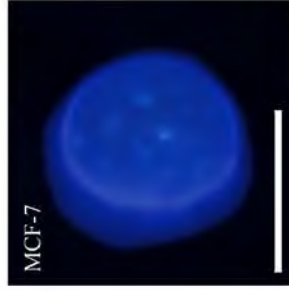
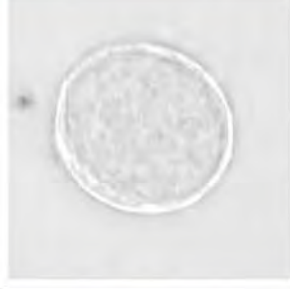
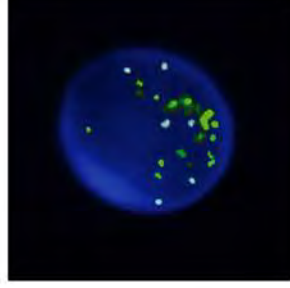
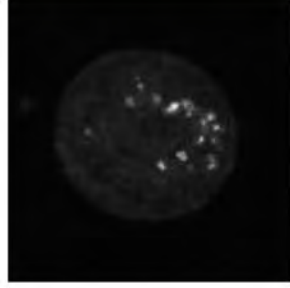
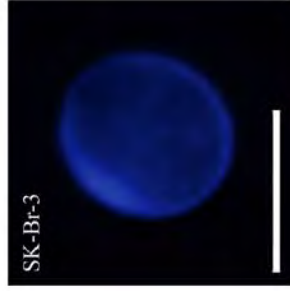
Cromosoma 17

ERBB2

Fotomontaje

Transmisión

HER2



3.3. Análisis FICTION en las CK+/CTCs inmunoseleccionadas

Los criterios de identificación de CK+/CTCs consistieron en que fueran: células nucleadas, positivas para la marcación de CKs (células CK+) con fluorescencia azul. Los resultados fueron expresados en número de CK+/CTCs por 10 ml de sangre periférica. Para comprobar la eficiencia de la hibridación génica se evaluaron unas 50 células normales (leucocitos contaminantes), como mínimo, por muestra. Estos leucocitos eran células morfológicamente intactas y cuyos núcleos no estaban sobrepuestos, y se utilizaron como control interno de la hibridación.

Paciente con número de identificación (IN) 21: En este paciente se localizaron 2 células intactas detectadas como CK+/CTC. La evaluación genética de estas células tumorales demostró que eran disómicas para el cromosoma 17 y que presentaban dos copias del gen *ERBB2* (resultado que no se muestra).

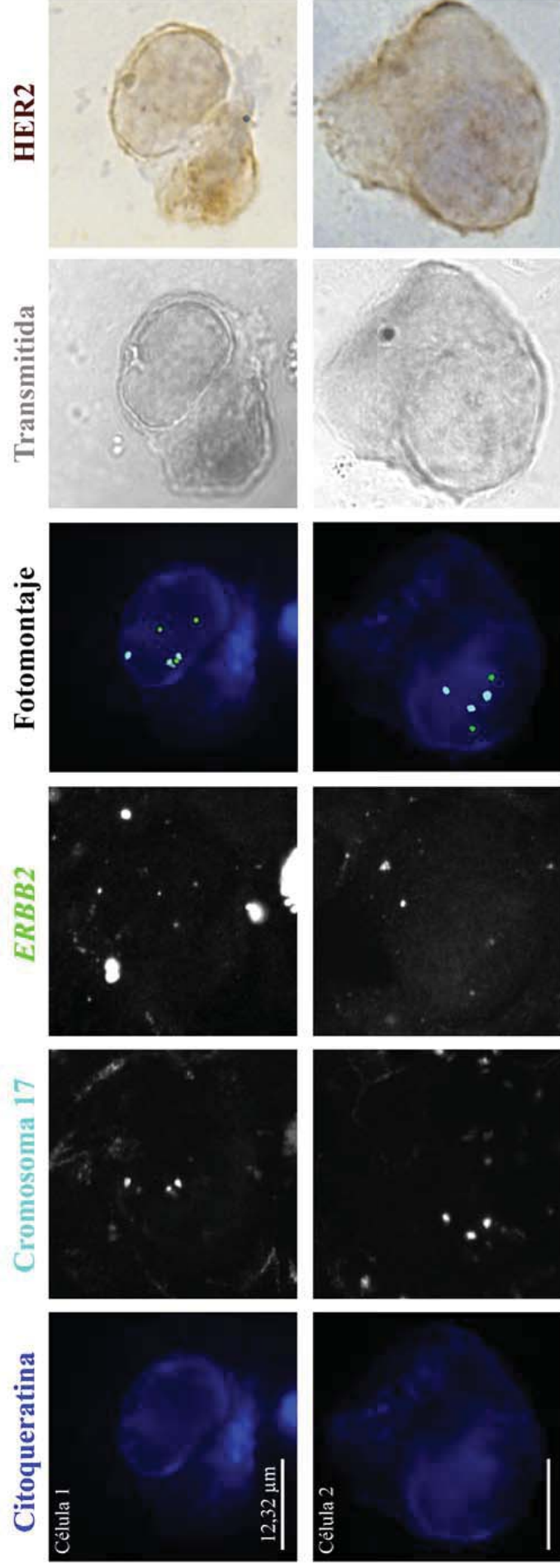
Paciente IN28: En este paciente se encontraron un total de 26 CK+/CTCs intactas. De estas 26 CK+/CTCs detectadas, 23 de ellas presentaron polisomía (trisomía) para el cromosoma 17 (88,46%) y 3 CK+/CTCs presentaron disomía para este cromosoma (11,54%) (Tabla 2). El número medio de copias del CEP17 en estas CK+/CTCs fue de 2,88 copias por célula. En 20 de estas 26 CK+/CTCs fue posible evaluar el número absoluto de copias del gen *ERBB2*: 4 de las 20 células tumorales presentaron 3 copias del gen (20%) y 16 de ellas presentaron 2 copias del gen (80%). En resumen podemos decir que no se encontró amplificación del gen. El estado del gen *ERBB2* en estas CK+/CTCs fue de 2,20 copias por

célula. En la figura 2 se muestra un ejemplo representativo del estado del gen *ERBB2* y del cromosoma 17 en las CK+/CTCs aisladas.

Tabla 2. Aneusomía del cromosoma 17 de acuerdo a la expresión de la proteína HER2 en CK+/CTCs del paciente IN28.

Aneusomía	Nº CK+/CTC	%		Expresión de la proteína HER2					CK+/CTC totales
				0	1+	2+	3+	2+/3+	
Trisomía	23	88,46	Nº de CK+/CTC	0	8	5	6	11	19
			% de CK+/CTC	0	42,11	26,32	31,58	57,89	
Disomía	3	11,54	Nº de CK+/CTC	0	0	2	0	2	2
			% de CK+/CTC	0	0	100	0	100	
CK+/CTC totales	26		Nº de CK+/CTC	0	8	7	6	13	21
			% de CK+/CTC	0	38,09	33,33	28,57	61,90	

Figura 2. Imágenes en fluorescencia (objetivo 100X) de las CK+/CTCs aisladas de sangre periférica del paciente IN28 (barra de escala: 12,32 μ m). La columna "Citoqueratina" muestra la marcación con CK de las células tumorales, las cuales se identifican claramente por su fluorescencia azul, evaluación realizada por microscopia de fluorescencia. Las columnas "Cromosoma 17" y "ERBB2" muestran las señales de hibridación para el CEP17 y el ERBB2 (HER2/neu) respectivamente (sobreposición de diferentes planos), evaluación realizada por microscopia confocal. La columna "Fotomontaje" muestra la sobreposición de las columnas "Citoqueratina" (azul), "Cromosoma 17" (agua o azul claro) y "ERBB2" (verde). La columna "Transmitida" muestra la morfología de las células CK+, analizada por microscopia confocal. La expresión de la proteína HER2 aparece en la última columna "HER2". Todas las CK+/CTCs son las mismas en las diferentes columnas.



Citoqueratina

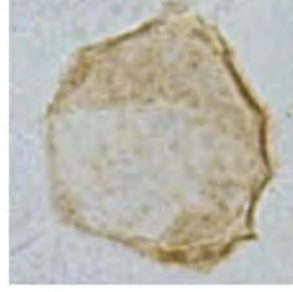
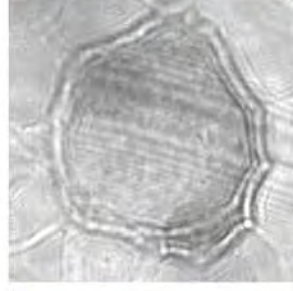
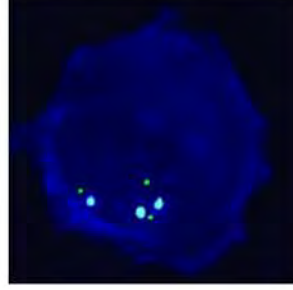
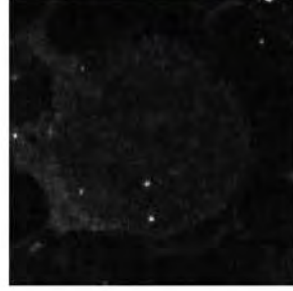
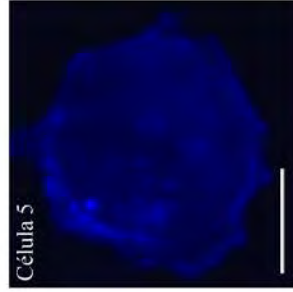
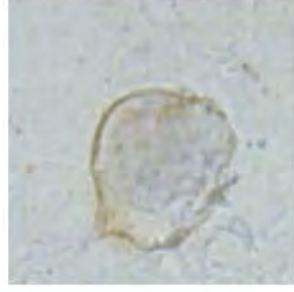
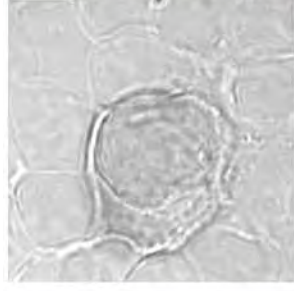
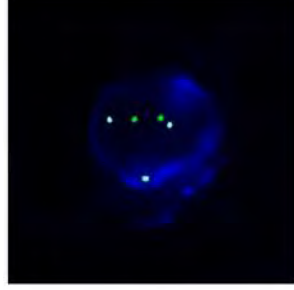
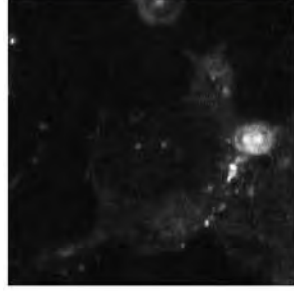
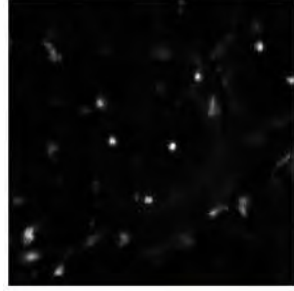
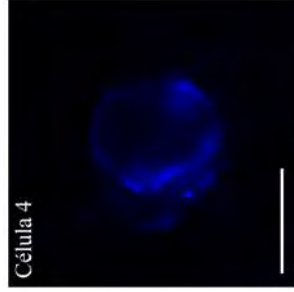
Cromosoma 17

ERBB2

Fotomontaje

Transmisión

HER2



3.4. Expresión de la proteína HER2 en las CTCs

Solamente se pudo realizar la evaluación de la expresión de la proteína HER2 en 21 de las 26 CK+/CTCs aisladas en el paciente IN28. Trece de estas 21 CK+/CTCs (61,90%) presentaron sobreexpresión de la proteína; 6 CK+/CTCs presentaron una marcación 3+; y 7 una marcación 2+. Ocho CK+/CTCs (38,10%) presentaron una marcación suave de membrana y fueron evaluadas como negativas para la expresión de HER2. Las 5 CK+/CTCs restantes de las 26 CK+/CTCs aisladas en la muestra, no fueron evaluables. En la figura 2 se muestra un ejemplo representativo de la expresión de la proteína HER2 en las CK+/CTCs aisladas.

Además de estas 21 CK+/CTCs se encontraron 9 células que eran negativas para la expresión de las CKs estudiadas (CK-/CTCs), pero que el examen histopatológico determinó que eran células tumorales. De estas 9 CK-/CTCs la sobreexpresión de HER2 fue detectada en 6 células tumorales (marcación 3+) y las otras 3 células tumorales presentaron una marcación suave, que fue anotada como negativa para la expresión de HER2 (Figura 3). En resumen, 19 (13 CK+/CTCs y 6 CK-/CTCs) CTCs presentaron sobreexpresión de HER2 (63,33%) y 11 (8CK+/CTCs y 3 CK-/CTCs) CTCs no presentaron expresión de la proteína (Figura 3).

3.5. Inmunohistoquímica e hibridación fluorescente *in situ* (FISH) del tumor primario del paciente IN28

Debido a los resultados que se obtuvieron en las CTCs del paciente IN28, se realizó un estudio más completo de su tumor primario. El examen histológico reveló un adenocarcinoma infiltrativo (Figura 4) sin nódulos positivos ni metástasis a distancia (seguimiento hasta el 15 de Abril de 2008). Las muestras marcadas con hematoxilina & eosina

mostraron un alto grado de agresividad tumoral (Figura 4A, B). Este tumor primario presentó una marcación fuerte para Ki67 (hasta un 90% de las células estaban teñidas) (Figura 4E), ciclina D1 (aproximadamente el 50%) (Figura 4G), con una expresión casi nula para p53 (Figura 4F) y no expresión de HER2 (Figura 4H). En él aparece una microvasculatura bien desarrollada, demostrada por la inmunomarcación con CD31 y CD34 (Figura 4C, D respectivamente), y presencia de células tumorales dentro de los vasos pequeños.

El análisis FISH se realizó en dos secciones diferentes del tumor primario, demostrando ambas no amplificación del gen *ERBB2* y un patrón disómico para el cromosoma 17 (resultado que no se muestra). Los resultados e expresión de HER2 y el análisis FISH del tumor primario concuerdan entre sí, pero no con los resultados obtenidos en las CK+/CTCs de este paciente.

Figura 3. Expresión de HER2 en las CK-/CTCs (objetivo de 100X) del paciente IN28. La evaluación de la marcación de la proteína HER2 aparece en la esquina inferior derecha de las imágenes (barra de escala: 12,32 μ m).

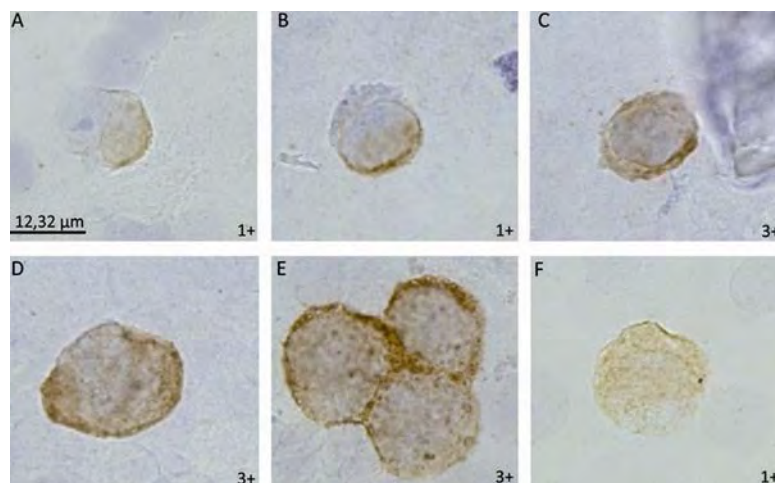
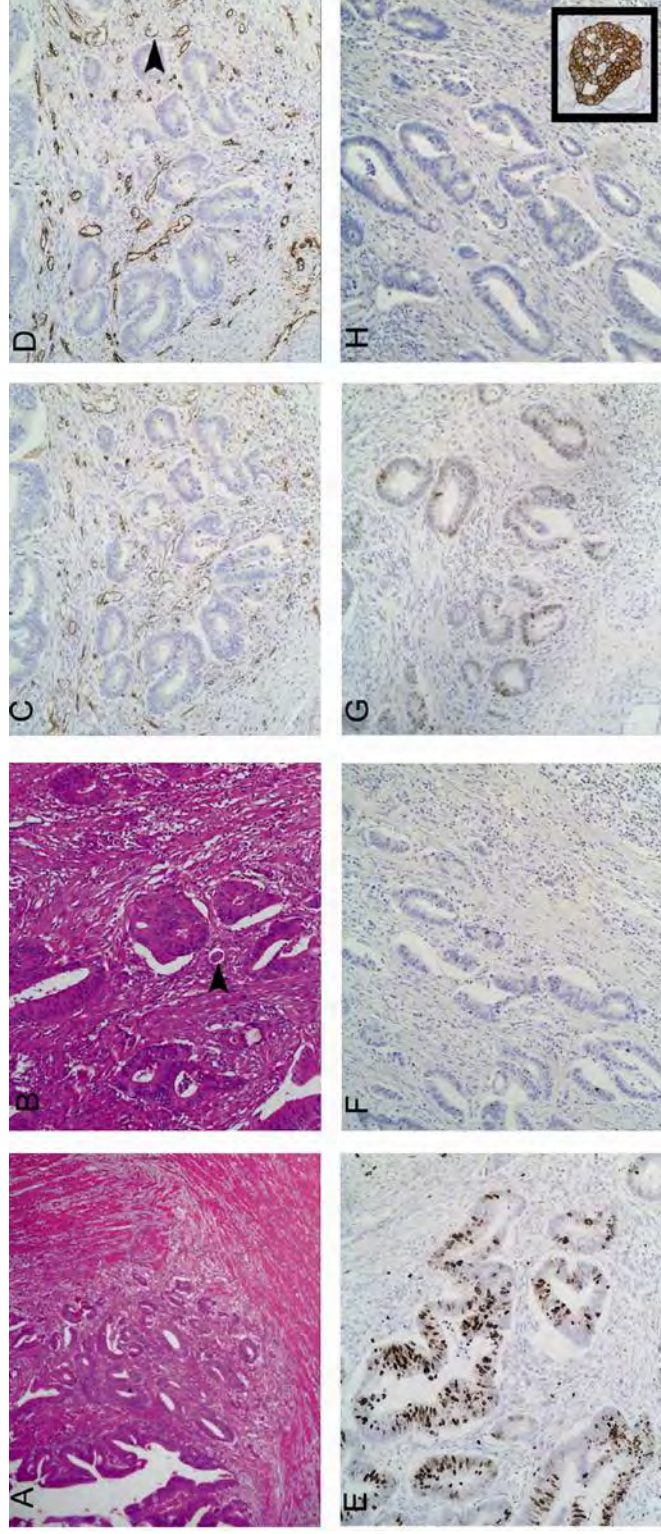


Figura 4. Características histopatológicas del tumor primario del paciente IN28. (A) Glándulas neoplásicas con un patrón de crecimiento infiltrante que afecta a la capa muscular propia del intestino. Marcación Hematoxilina& Eosina, objetivo 10X. (B) Detalle de las glándulas neoplásicas, atípicas pero bien conformadas, aunque hay glándulas fusionadas presentes. Tener en cuenta la presencia de invasión (señalada por la flecha) linfovascular (pequeños vasos). Marcación Hematoxilina& Eosina, objetivo 40X. (C-G) Expresión inmunohistoquímica de marcadores que definen molecularmente este tumor, se muestra una gran densidad microvascular por la inmunotinción con CD31 (C) y CD34 (D). Las flechas señalan pequeños vasos con invasión. Alto índice proliferativo (Ki67) (E), baja expresión de p53 (F), alta expresión de ciclina D1 (G) y resultado negativo en el test Herceptest (H), para la expresión de la proteína HER2 (en la esquina inferior derecha de la última imagen se inserta un control positivo, carcinoma de mama intraductal, para el Herceptest). Todas las figuras: método Envision®, objetivo 20x.



DISCUSIÓN GENERAL

I. CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO

1. Recogida de datos

Los datos clínicos y patológicos de los pacientes estudiados, se obtuvieron de las historias clínicas generadas en los Servicios de Oncología Médica, Cirugía y Patología del Hospital Universitario de Jaén.

El carácter retrospectivo de los estudios ha supuesto una limitación a la hora de la recogida de datos, tanto clínicos como patológicos, sobre todo en los pacientes metastásicos. En cuanto al seguimiento y la recogida de datos referidos a la evolución postoperatoria de los pacientes, han existido casos en los que la historia clínica no incluía referencias de la evolución, recidiva tumoral y/o muerte del paciente. Ésta fue solicitada al Servicio de Oncología Médica y, en algunos casos, la información fue requerida a los familiares mediante llamada telefónica.

2. Población de pacientes y tiempo de seguimiento

1.2.1. Tipo de población

En cáncer de mama se ha estudiado una población heterogénea de 92 pacientes, compuesta por: neoadyuvantes (25); adyuvantes (42) y metastásicos (25). Diecinueve (76%) de los pacientes metastásicos habían recibido un tratamiento previo de quimioterapia, que había terminado 24 semanas antes de la extracción sanguínea, y 6 (24%) de ellos no lo habían recibido, ya que eran pacientes recién diagnosticados como metastásicos en el momento de entrar en el estudio. El porcentaje de pacientes con CTCs es del 62% (57/92): 68,0% (17/25) neoadyuvantes; 57,1% (24/42) adyuvantes; y 64% (16/25) metastásicos, y el seguimiento que se realiza es de 21 meses (rango = 2-31 meses).

La mayor parte de los estudios publicados encuentran diferencias en los porcentajes de detección de CTCs entre pacientes metastásicos y no metastásicos [Cristofanilli y cols., 2004; Bidard y cols., 2008a; Bidard y cols., 2008b; Pierga y cols., 2008; Bidard y cols., 2010]. El hecho de que los resultados del primer trabajo experimental no muestren diferencias significativas, entre los pacientes metastásicos y los no metastásicos, se puede deber a que se ha incluido en el estudio una población heterogénea de pacientes metastásicos, es decir, pacientes que habían recibido un tratamiento previo de quimioterapia y pacientes que no lo habían recibido. Además, el porcentaje de detección de células CK+ en los pacientes no metastásicos, es superior al que otros autores indican [Pierga y cols., 2008; Bidard y cols., 2010].

En el caso de los pacientes con cáncer de colon, se ha estudiado una población más homogénea, compuesta por 33 pacientes no metastásicos de los cuales 17 (51,5%) presentaban nódulos linfáticos afectados (estadio III) y 16 (48,5%) no los presentaban (estadio 0-II). El porcentaje de pacientes con CTCs en sangre periférica es del 9,09% (3/33): 3,03% (1/11) en estadio II y 6,06% (2/17) en estadio III, y el seguimiento que se realizó fue de 13 meses (rango = 0,5-29,9 meses).

Los estudios publicados presentan diferencias en los porcentajes de detección de CTCs entre pacientes metastásicos: del 26% al 75% [Cohen y cols., 2008; Molnar y cols., 2001], y no metastásicos: del 5% al 57% [Thorsteinsson y cols., 2011; Wong y cols., 2009]; pero además, la detección de CTCs en pacientes metastásicos es más baja que en otros tipos de tumores sólidos de origen epitelial [Cohen y cols., 2008;

Cristofanilli y *cols.*, 2004; Gaforio y *cols.*, 2003]. Cohen y Terstappen indican en su investigación de 2006 [Cohen y *cols.*, 2006], que esto se puede deber a la biología del cáncer colorrectal, ya que a diferencia de tumores como el cáncer de mama y el de próstata, éste se disemina preferentemente por la vena porta hepática (originando metástasis en hígado) antes que sistémica. De forma alternativa, esta hipótesis también podría explicar las diferencias de los porcentajes de detección de CTCs que existen entre los pacientes metastásicos y los no metastásicos con cáncer colorrectal. Hay que tener en cuenta que la fuente de CTCs en sangre periférica es tanto el tumor primario como las metástasis, y debido a que en cáncer colorrectal la diseminación del tumor primario es principalmente por la vena porta hepática, como se aprecia en el trabajo de Wind y *cols.* (2009) donde en tres momentos diferentes (intra-cirugía sin extirpación del tumor; intra-cirugía tras extirpación del tumor; y post-cirugía) el porcentaje de pacientes con CTCs es de 7%; 4%; 4% en sangre periférica vs. 54%; 31%; 26% en sangre portal, serían las metástasis las responsables del mayor vertido de CTCs al torrente sanguíneo periférico.

Muy pocos estudios se enfocan en la detección de CTCs en poblaciones de pacientes con cáncer colorrectal no metastásico [Sastre y *cols.*, 2008; Maestro y *cols.*, 2009; Wind y *cols.*, 2009; Wong y *cols.*, 2009; Thorsteinsson y *cols.*, 2011]. Las características de estos trabajos son: el volumen de las muestras estudiadas es de 7,5 ml de sangre periférica en todos excepto en el trabajo de Wong y *cols.* (2009) donde se analizan 10 ml; el marcador de aislamiento de CTCs es la molécula de adhesión epitelial (EpCAM), el mAb anti-EpCam utilizado es el clon HEA125 (reconoce un glicopéptido de peso molecular 34 KDa) en todos los trabajos excepto en el de Wong y *cols.* (2009) donde se utiliza el clon Ber-EP4 (reconoce dos glicopéptidos de peso molecular 34 KDa y

39 KDa); las CTCs son detectadas con anti-CKs 8/18/19, excepto en el trabajo de Wong y cols. (2009) donde se utilizó anti-CK20; y los porcentajes de pacientes que presentan células CK+ varían desde el 5% [Thorsteinsson y cols., 2011] al 57% [Wong y cols., 2009].

Para analizar mejor estos resultados podemos hacer una división entre estos trabajos según el momento en que se realiza la extracción sanguínea que se va a evaluar para la detección de CTCs:

1. Estudios en los que se evalúa si la presencia de CTCs en sangre periférica tras la cirugía y antes del tratamiento con quimioterapia tenía valor pronóstico. Maestro y cols. (2009) estudiaron una población de pacientes metastásicos y no metastásicos con cáncer de mama (438), de próstata (50) y colorrectal (197); y Sastre y cols. (2008) se enfocaron en una población de estudio de 97 pacientes recién diagnosticados con cáncer colorrectal. Los porcentajes de pacientes, con cáncer de colon no metastásico, con un número de CTCs ≥ 2 en 7,5 ml de sangre periférica son muy similares entre sí: 15,2% [Maestro y cols., 2009] y 26% [Sastre y cols., 2008]. En el estudio de Maestro y cols. (2009), las diferencias entre los porcentajes de pacientes que presentan un número de CTCs ≥ 2 en 7,5 ml de sangre periférica según el estadio tumoral son evidentes: 15,2% no metastásicos vs. 61,3% metastásicos.
2. Estudios en los que se evalúa si la presencia de CTCs en sangre periférica antes de cirugía tiene valor pronóstico. La población y la extracción sanguínea de estudio de estas investigaciones son iguales a las del tercer trabajo experimental de esta tesis, y los resultados obtenidos en dos de estos trabajos son similares a los expuestos en esta tesis:

- a) Wind y cols. (2009) evaluaron si la detección de CTCs, en sangre periférica y portal, de 31 pacientes con cáncer de colon no metastásico tenía valor pronóstico. La toma de muestras se realizó en diferentes momentos: antes de cirugía; durante la cirugía; y justo al finalizar la operación. Este estudio muestra un porcentaje de pacientes del 6,7% (2 pacientes CK+ de los 31) con células CK+ en sangre periférica antes de cirugía, del 7% durante el acto operatorio y antes de extirpar el tumor, del 4% durante el acto operatorio y tras de extirpar el tumor y del 4% tras finalizar la cirugía. Los resultados en las muestras de sangre portal dan unos porcentajes de pacientes con células CK+ mayores (54%; 31%; y 26%, respectivamente, donde no existe extracción pre-cirugía), existiendo diferencias también si la operación fue realizada por laparoscopia o abierta. Sus resultados no presentaron ninguna correlación entre la presencia de CTCs en sangre periférica de estos pacientes y las características clinicopatológicas del tumor primario o la progresión de la enfermedad.

- b) Thorsteinsson y cols. (2011) comprobaron si la detección de CTCs antes y después de la cirugía, en sangre periférica, en 20 pacientes con cáncer de colon no metastásico tenía valor pronóstico. Este trabajo muestra un porcentaje de pacientes con células CK+ antes de cirugía del 5% (solamente un paciente CK+ de los 20 estudiados) y todas las muestras que se tomaron tras la cirugía resultaron ser negativas. Los resultados obtenidos en este estudio indican que no existe una correlación entre la detección

de CTCs y las características patológicas de los pacientes, la progresión de la enfermedad o la supervivencia.

- c) Wong y cols. (2009) analizaron si la detección de CTCs antes de cirugía o de la quimioterapia en 132 pacientes con cáncer colorrectal tenía valor pronóstico. De estos pacientes: 101 eran estadios I-III, y sus muestras sanguíneas se obtuvieron antes y después de la cirugía (5 días tras ésta); y 31 pacientes eran metastásicos, y sus muestras se obtuvieron pre-tratamiento. Los controles utilizados fueron 3 cohortes poblacionales diferentes: 30 pacientes con cáncer de mama, próstata, hígado y pulmón; 30 pacientes con enfermedades intestinales benignas; y 40 voluntarios sanos. En ninguna de estas cohortes control se detectaron CTCs (células CK20+), demostrando que este método de detección es específico para pacientes con cáncer colorrectal. Los resultados mostraron unos porcentajes de pacientes CK20+ por estadios de: 39% estadio I, 55% estadio II, 73% estadio II y 77% estadio IV. Utilizando un punto de corte de ≥ 11 CTCs por 10 ml en la extracción basal, que es la media del número de células CK20+ que detectan en esta extracción en los 132 pacientes, obtuvieron que los pacientes que presentaban ≥ 11 CTCs por 10 ml tenían una supervivencia inferior a los que presentaban menos células. Por lo tanto la detección de ≥ 11 CTCs por 10 ml resultó ser un factor pronóstico de la enfermedad, junto con el número de ganglios linfáticos afectados, sobre la supervivencia global de la población (seguimiento de 24 meses a 83 pacientes en total). Tras esto, utilizando un punto de corte de ≥ 8 CTCs por 10 ml en la extracción pre-cirugía, que es la media del número de células CK20+ que detectaron en esta extracción en los 101 pacientes en

estadios I-III, obtuvieron que los pacientes que presentaban ≥ 8 CTCs por 10 ml tenían un tiempo libre de enfermedad más corto que los que presentaban menos células. Por lo tanto, según estos investigadores, el número de CTCs CK20+ en la extracción basal, se correlaciona con el TNM y la afectación ganglionar de los pacientes. Además, utilizando el número medio de CTCs detectadas en la población como puntos de corte, la detección de CTCs antes de cirugía se correlaciona con la recurrencia, la enfermedad metastásica y la supervivencia global de la población.

Según la bibliografía consultada, la detección de CTCs, o porcentaje de pacientes CK+, en cáncer colorrectal no metastásico va a depender de: el momento en el que se extraiga la muestra sanguínea, pre- o post-cirugía; y de los anticuerpos de aislamiento y detección empleados.

En cuanto a la influencia que tiene el mAb de aislamiento en la detección de CTCs en sangre periférica, hay que tener en cuenta que dentro de emplear un mismo mAb, como el anti-EpCAM, el tipo de clon utilizado también influye. Antolovic y cols. (2010) demostraron que la detección de CTCs en pacientes con cáncer de colon (I-IV) dependía del clon anti-EpCAM empleado en el enriquecimiento inmunomagnético. En este trabajo se utilizaron dos sistemas de enriquecimiento inmunomagnético, que se aplicaron tras un gradiente de densidad con ficoll: el primero empleaba el clon Ber-EP4 (reconoce dos antígenos de 34 KDa y 39 KDa en EpCAM) y el segundo el clon KS1/4 (reconoce un antígeno de 40-42 KDa en EpCAM). La detección de las CTCs fue por técnicas moleculares (RT-PCR) y el marcador empleado fue la CK20. Los resultados mostraron que 11 de los 39 pacientes estudiados (28%)

presentaban CTCs (CK20+); de estos 11 pacientes con CTCs: 6 fueron detectados con el clon Ber-EP4, y 5 con el KS1/4; en ningún caso se produjo la detección de CTCs (CK20+) por ambos sistemas simultáneamente. Por lo tanto, las diferencias encontradas entre los trabajos de Wind y *cols.* (2009) y Thorsteinsson y *cols.* (2011) vs. Wong y *cols.* (2009) se pueden deber a los clones anti-EpCAM empleados, y no a que utilicen diferentes mAb de detección. Pero, según la casa comercial Invitrogen (el kit de enriquecimiento inmunomagnético empleado por Wong y *cols.*, (2009) es el CELlection Epithelial Enrich, Dynal Biotech, Dynal® de Invitrogen), el clon Ber-EP4 tiene la misma reactividad que el clon HEA125. Esto indicaría que es el mAb de detección la causa de la diferencia que existe entre los porcentajes de pacientes con CTCs que se detectan entre estos trabajos.

De forma global, excepto el trabajo de Wong y *cols.* (2009), los estudios que analizan la extracción pre-cirugía obtienen unos porcentajes de pacientes con CTCs en sus muestras sanguíneas similares a los obtenidos en el tercer trabajo experimental de esta tesis.

1.2.2. Tamaño de la población de estudio y tiempo de seguimiento

El tamaño muestral (número de pacientes de la población) y el tiempo de seguimiento de la población varía mucho entre los diferentes estudios, tanto de pacientes con cáncer de mama como de pacientes con cáncer colorrectal, según el objetivo que se quiera alcanzar:

- Cuando el objetivo del estudio es comprobar el valor pronóstico de la detección de CTCs en la extracción basal, el tamaño de la población de estudio y el tiempo de seguimiento oscilan entre: 20 pacientes

con cáncer de colon no metastásico, con un seguimiento de un mes [Thorsteinsson y cols., 2011], y 430 pacientes con cáncer colorrectal metastásico, con un seguimiento mínimo de 11 meses [Cohen y cols., 2009].

- Cuando el objetivo es analizar si la detección de las CTCs sirve como marcador de respuesta al tratamiento empleado o como sistema de monitorización del mismo, el tiempo de seguimiento y el tamaño de la población de estudio oscilan entre: los 5 meses de seguimiento a 177 pacientes con cáncer de mama metastásico [Hayes y cols., 2006], y los 28 meses de seguimiento a 58 pacientes con cáncer de mama [Camara y cols., 2007].
- Cuando el objetivo es estudiar las anomalías cromosómicas de las CTCs y poder compararlas con el tumor primario, el número de casos estudiados oscila entre los 31 pacientes [Fehm y cols., 2002] y los 77 [Leversha y cols., 2009], y no se hace referencia al tiempo de seguimiento.

Ya que uno de los objetivos de esta tesis es el análisis del valor pronóstico de la detección de CTCs en la sangre periférica de pacientes, con cáncer de mama y colon, antes de cirugía o de iniciar el tratamiento adyuvante y/o en primera línea, se puede decir que tanto el tamaño de las poblaciones de estudio como el tiempo de seguimiento realizado a los pacientes no son inferiores a los empleados por otras investigaciones con este mismo fin. Aún así, algunos de los resultados que se han obtenido, en los trabajos experimentales, deberían ser ratificados en poblaciones de estudio más grandes durante periodos de tiempo más extensos.

3. Características de las técnicas empleadas

1.3.1. Anticuerpos utilizados

1.3.1.1. Anticuerpo de aislamiento de CTCs

El anticuerpo monoclonal (mAb) utilizado para el aislamiento de las CTCs en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama y colon, es el mAb anti-citoqueratinas 7/8 (clon CAM5.2; isotipo: Inmunoglobulina (Ig) G2a; ratón anti-humano. Miltenyi Biotec) que reconoce específicamente las citoqueratinas (CKs) 7/8, pero no reconoce los heterodímeros de CKs 8-18 ni 8-19. Este mAb de aislamiento se ha utilizado en varios estudios, tanto para la marcación magnética específica de células tumorales mamarias [Martin y cols., 1998; Fehm y cols., 2002], como de células tumorales de colon [Molnar y cols., 2001; Weihrauch y cols., 2002; Fehm y cols., 2002].

A la hora de la elección del mAb de aislamiento celular hay que tener en cuenta la heterogeneidad propia de cada tumor, es decir, cada tipo de tumor expresa diferentes antígenos epiteliales específicos y diferentes niveles de expresión de estos antígenos. Por ejemplo, en el epitelio mamario aparecen expresadas, sobre todo, las CKs 7/8/18/19 [Moll y cols., 1982]; y éstas son también las CKs más expresadas en los tumores de mama, pero esta expresión puede variar durante la progresión tumoral [Willipinski-Stapelfeldt y cols., 2005; Woelfle y cols., 2004]. En el epitelio del colon aparecen expresadas, sobre todo, las CKs 8/18/19/20 [Moll y cols., 1982; Moll, 1991]; pero esta expresión puede variar durante la progresión tumoral [Polley y cols., 2006].

Hay que tener en cuenta varios hechos que afectan, sobre todo, al aislamiento de CTCs en pacientes con cáncer de colon: el primero, la expresión de CK7 se encuentra en tumores de ovario, endometrio, mama y pulmón, pero no en tumores del tracto gastrointestinal inferior [Rubin y cols., 2001; Chu y cols., 2000; Lugli y cols., 2008]; segundo, la marcación por CK7 y CK20, se emplea para diferenciar el origen de lesiones metastásicas de cáncer de colon y de pulmón [Kummar y cols., 2002; Varadhachary y cols., 2004]; y por último, la expresión de CKs puede variar durante la progresión tumoral [Woelfle y cols., 2004; Willipinski-Stapelfeldt y cols., 2005; Polley y cols., 2006], y esta variación se puede detectar en las CTCs aisladas [Fehm y cols., 2002; Mikolajczyk y cols., 2011]. Por lo tanto, hay que ser consciente de las limitaciones del anticuerpo anti-CKs 7/8 en el aislamiento de CTCs de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama y colon, especialmente en estos últimos.

Respecto a esto hay que señalar que, cuando se realizan los ensayos de eficacia de la técnica se hacen recuentos celulares en controles positivos, los cuales se procesan mezclando sangre periférica de voluntarios sanos con 1.000 células tumorales, de las líneas tumorales MCF-7, MDA-MB-231 y SK-Br-3 (líneas celulares de cáncer de mama humanas) y las líneas tumorales HT-29 y Caco-2 (líneas celulares de cáncer de colon humanas), siguiendo el protocolo publicado en 2003 [Gaforio y cols., 2003]. Los rangos de recuperación que se obtienen son: del 60% al 80% (cálculos basados en el número total de células tumorales que se mezclan con la sangre periférica de voluntarios sanos) para las líneas celulares de cáncer de mama; y un rango un poco inferior para las líneas celulares de cáncer de colon (40%-75%, datos no mostrados). En los controles de Caco-2, los rangos de recuperación de células tumorales son

inferiores a los obtenidos para las demás líneas, además esta línea celular se marca menos (marcación anti-CKs 7/8) (resultados no mostrados), esto se puede deber a que la línea Caco-2 expresa la CK8 en menor proporción que las otras líneas [Dimmler y cols., 2001]. Ocurre algo similar con la línea tumoral MDA-MB-231, resultado que queda reflejado en el nivel de recuperación de células tumorales de esta línea en la Tabla 1 del trabajo publicado en 2008 [Campos y cols., 2008] (*Capítulo 4. Resumen global de los resultados: Resultados del trabajo experimental del capítulo 1*). Este último resultado fue contrastado por biología molecular, para lo que se realizó una extracción de mRNA y una retrotranscripción seguida por la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para las CKs 7/8 en las líneas tumorales MCF-7 y MDA-MB-231, y se obtuvo que la línea tumoral MDA-MB-231 presentaba una expresión más baja o casi nula de CK8 (resultados no mostrados), resultado que concuerda con el trabajo de Hollestelle y cols. (2010).

De aquí se puede deducir que, debido a que no todas las líneas de células tumorales expresan las CKs 7/8 en la misma proporción [Dimmler y cols., 2001; Hollestelle y cols., 2010], para estar seguros de los porcentajes celulares de recuperación que se obtienen, con este mAb, deberíamos emplear diferentes líneas tumorales. Además, las líneas de células tumorales que se usen deben ser del mismo tipo tumoral que el tumor que se va a estudiar, y no cumplir solo el requisito de ser epiteliales.

1.3.1.2. Anticuerpo de detección de CTCs

El mAb seleccionado para la detección de CTCs en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama; ocho pacientes con cáncer de colon; y para los controles de recuperación celular, es el mAb anti-CKs 7/8-FITC (clon CAM5.2; isotipo: IgG2a; ratón anti-humano. Miltenyi Biotec), seguido por el conjugado fosfatasa alcalina anti-FITC (isotipo: IgG1 de ratón. Miltenyi Biotec). Antes de aplicar esta marcación en las muestras clínicas, se comprobó en extracciones sanguíneas de 15 voluntarios sanos sin patología diagnosticada en curso, que no existía marcación por parte del mAb utilizado.

El mAb escogido para la detección de las CTCs en sangre periférica de pacientes con cáncer de colon y para realizar los controles de la técnica de *Inmunofenotipación y análisis citogenético en interfase fluorescente como herramienta para la investigación de neoplasias (Fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics as a tool for investigation of neoplasm, FICTION)* fue el anticuerpo biclonal AE1/AE3 (isotipo: IgG1; ratón anti-humano. BioGenex). Este anticuerpo está formado por la mezcla de dos clones que reconocen diferentes CKs. El clon AE1 detecta las CKs de alto peso molecular 10, 14, 15, y 16, y también la CK19 de bajo peso molecular; y el clon AE3 detecta las CKs de alto peso molecular 1, 2, 3, 4, 5, y 6, y las CKs 7 y 8 de bajo peso molecular. Con la combinación de estos dos clones se obtiene un cóctel de anticuerpos con un espectro de reactividad muy amplio.

Tras la marcación por el anticuerpo AE1/AE3 se añaden dos mAbs secundarios de forma secuencial. El primer mAb secundario utilizado es el Alexa Fluor 350 (isotipo: IgG (H+L); conejo anti-ratón. Invitrogen), el cual

reconoce la cadena pesada de la IgG y todas las clases de cadenas ligeras de las Igs de ratón, y el segundo es el Alexa Fluor 350 (isotipo: IgG (H+L); cabra anti-conejo. Invitrogen), que reconoce la cadena pesada de la IgG y todas las clases de cadenas ligeras de las Igs de conejo, ambos mAbs van conjugados con el fluorocromo Alexa Fluor 350 (longitud de onda excitación-emisión, 346-442 nm), creando así una cascada de fluorescencia.

Antes de aplicar esta marcación secuencial de varios mAbs en el segundo trabajo experimental, se realizaron varios controles con células tumorales de las líneas MCF-7 y MDA-MB-231. Estos controles se realizaron para comprobar que no existían falsos positivos por parte del anticuerpo de detección y los mAbs secundarios, y además se comparó la marcación obtenida, en ambas líneas de células tumorales, por el anticuerpo AE1/AE3 y el MNF116, por inmunofluorescencia (IF) indirecta. El resultado que se obtuvo fue que no existían uniones inespecíficas por parte de los anticuerpos empleados, ni secundarios ni primarios, y el AE1/AE3 marcaba las células tumorales de forma más intensa que el MNF116 (resultados no mostrados).

Los mAbs, de aislamiento y detección, escogidos poseen una gran influencia sobre la recuperación y marcación de las CTCs en sangre periférica. En el primer trabajo experimental de esta tesis, si se comparan los resultados obtenidos con los de otros grupos de investigación, parece que la utilización del mAb anti-CKs 7/8 de aislamiento y detección no influye en el número de pacientes a los que se les detectan células CK+ en sangre periférica. Pero en el tercer trabajo experimental se puede observar una menor detección de pacientes con células CK+, si se comparan con los obtenidos por Wong y cols. (2009), que emplean

anti-EpCAM como mAb de aislamiento y anti-CK20 como mAb de detección. Dejando de lado las diferencias que se han explicado antes en el apartado *Población de pacientes y tiempo de seguimiento*, entre el trabajo de Wong y cols., (2009) vs. Thorsteinsson y cols., (2011) y Wind y cols., (2009), y centrándome en: la baja expresión de CK7 que existe en tumores primarios de cáncer colorrectal; y los resultados de recuperación celular obtenidos en las líneas de cáncer de colon, debo decir que existe la posibilidad de que el mAb anti-CKs 7/8, que se ha utilizado para el aislamiento de las CTCs, no sea el más adecuado y por lo tanto los resultados obtenidos se pueden deber a esta limitación del estudio.

1.3.2. Técnica de aislamiento: doble gradiente de densidad y enriquecimiento inmunomagnético

La frecuencia de detección de células citoqueratina positivas (CK+) en sangre periférica de pacientes con cáncer, depende directamente del método de aislamiento de las CTCs que se emplee, y varía según los estudios realizados, tanto en cáncer de mama [Kasimir-Bauer y cols., 2001; Beitsch y Clifford, 2000] como en cáncer colorrectal [Zhang y cols., 2005; Cohen y cols., 2008], por lo tanto para poder realizar una comparación de los resultados que se obtienen, sería necesario efectuar una estandarización internacional de los protocolos que se utilizan en la detección de CTCs.

En general menos de 10 células tumorales por mililitro son aisladas en la sangre periférica de pacientes con cáncer, incluso de pacientes metastásicos, por lo tanto, es imprescindible la utilización de técnicas de enriquecimiento de la muestra [Ring y cols., 2004]. Está

totalmente aceptado que el método de aislamiento de células tumorales es un paso crítico [Pantel y Otte, 2001], y que en los pasos previos a la examinación microscópica existen pérdidas celulares que se estiman de hasta un 60% [Goeminne y cols., 2000].

En los trabajos experimentales de esta tesis, se ha aplicado un sistema de enriquecimiento de la muestra doble: primero, una centrifugación en doble gradiente de densidad; y segundo, una selección inmunomagnética positiva.

- Con el enriquecimiento por centrifugación en doble gradiente de densidad se consigue aislar la fracción de células mononucleares o fracción mononuclear (MNC) y la fracción de células granulocíticas o fracción granulocítica (GC) de las muestras de sangre periférica, sin afectar la viabilidad celular [English y Andersen, 1974]. Tras esto, se comprobó en qué fracción celular sedimentaban preferentemente las células tumorales mamarias, y se observó que la mayor parte de ellas sedimentan junto a la fracción MNC [Figura 2 del primer trabajo experimental (*Capítulo 4. Resumen global de los resultados: Resultados del trabajo experimental del capítulo 1*)], pero también eran detectadas en la fracción GC. Este mismo ensayo se repitió con 1.000 células tumorales de líneas celulares de cáncer de colon (HT-29 y Caco-2), y los resultados obtenidos fueron muy similares a los de las líneas celulares de cáncer de mama (datos no mostrados).

Hay que tener en cuenta que los resultados obtenidos por este modelo experimental no pueden predecir los resultados que se obtendrán en las muestras clínicas. Se sabe que las líneas celulares tumorales de cultivos son células muy homogéneas, mientras que las CTCs varían ampliamente en tamaño, forma y peso. Es razonable, por

lo tanto, asumir que un número importante de células tumorales sedimentarán con la fracción GC en las muestras clínicas. De acuerdo con esta hipótesis, Partridge y *cols.* (1999) demostraron que al analizar muestras sanguíneas de pacientes con cáncer epitelial de cuello y cabeza, hallaban células tumorales que sedimentaban con la fracción GC. Los resultados del primer trabajo experimental de esta tesis sugieren que las células tumorales de líneas mamarias pueden ser perdidas si solo se evalúa la fracción MNC. Debido a que posteriormente se comprobó que ocurría algo muy similar con las líneas de colon, es lógico recomendar la examinación de ambas fracciones, tanto MNC como GC, en todos los protocolos de enriquecimiento celular para la detección de CTCs en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama y colon.

- Como segundo paso se utiliza un enriquecimiento inmunomagnético, que es una técnica sensible y específica, para obtener una suspensión celular con una mayor proporción de CTCs. Martin y *cols.* (1998) estandarizaron la técnica de enriquecimiento inmunomagnético que se ha utilizado tras la centrifugación en doble gradiente de densidad. Varios grupos de investigación han utilizado el mismo procedimiento de enriquecimiento que se ha empleado (Carcinoma Cell Enrichment kit; sistema MACS; Miltenyi Biotec), o un método similar al expuesto en esta tesis, seguido por diferentes sistemas de detección, como pueden ser técnicas de IF o citometría de flujo, demostrando obtener unos porcentajes similares de detección de CTCs en pacientes con tumores sólidos de origen epitelial a los expuestos en el primer trabajo experimental de esta tesis (62% de pacientes con cáncer de mama presentan CTCs en sangre periférica). Por ejemplo: Racila y *cols.* (1998) evaluaron la

sangre periférica de pacientes con cáncer de mama y detectaron células CK+ en 32 de los 33 pacientes estudiados, para su estudio emplearon una combinación de un método de enriquecimiento inmunomagnético y citometría de flujo; Engel y cols. (1999) analizaron muestras de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama y de ovario, y detectaron células CK+ en 35 de los 48 pacientes (72,9%) empleando un método que combinaba una selección inmunomagnética (MACS) seguida por FISH; Martin y cols. (1998) examinaron muestras de sangre periférica de pacientes con carcinoma de mama, próstata, colon, recto y pulmón, y detectaron células CK+ en 21 de los 34 pacientes examinados (61,8%), utilizando el método MACS seguido por una detección inmunocitoquímica (ICC); Cristofanilli y cols. (2004), empleando una combinación de un método de enriquecimiento de ferrofluidos e IF para la detección de CTCs en sangre periférica, detectaron ≥ 5 células CK+ en 87 de los 177 pacientes con cáncer de mama que estudiaron (49%); Dawood y cols. (2008) detectaron células CK+ en 114 de las 185 muestras sanguíneas de pacientes con cáncer de mama que analizaron (61,6%) empleando el mismo sistema que Cristofanilli y cols. (2004). En cuanto a los porcentajes de detección de pacientes con cáncer de colon que presentan células CK+ (9,09%), esto ha sido comentado en el apartado *Características del estudio: Población de pacientes y tiempo de seguimiento* de la Discusión.

El enriquecimiento inmunomagnético mejora la detección de células CK+ en las muestras. El estudio de Königsberg y cols. (2010) analiza la recuperación celular, de una línea de cáncer de colon mezclada con sangre periférica de voluntarios sanos, al aplicar diferentes sistemas de enriquecimiento, y obtiene una mayor recuperación al aplicar un

enriquecimiento inmunomagnético que un enriquecimiento basado en las características físicas de las células tumorales. Los mismos resultados aparecen al comparar los porcentajes de pacientes CK+ detectados en estudios que emplean un enriquecimiento inmunomagnético, con los obtenidos por trabajos que solo emplean un método de enriquecimiento basado en las características físicas de las células tumorales: Weihrauch y cols. (2002), obtuvieron que un 65% de los pacientes con cáncer de colon presentaban células CK+ en médula ósea, tras un enriquecimiento inmunomagnético de la muestra vs. Leinung y cols. (2000), que obtuvieron un 24,8% de pacientes con cáncer de colon con células CK+ tras un enriquecimiento por gradiente de densidad; Woelfle y cols. (2005), obtuvieron que un 35% de los pacientes con cáncer presentaban células CK+ en médula ósea, empleando un enriquecimiento inmunomagnético, vs. 21% sin este método de enriquecimiento inmunomagnético.

La limitación más significativa de este método es la carencia de un marcador tumoral específico para las células tumorales que se encuentran en sangre periférica. Como marcadores más utilizados en el enriquecimiento de la muestra están la EpCAM y las CKs (sobre todo CKs 7/8). Algunos investigadores han recomendado que el enriquecimiento inmunomagnético por selección positiva de células tumorales debe optimizarse usando un combinado de marcadores. Por ejemplo, con la combinación de CKs y EpCAM se obtienen porcentajes de detección de CTCs superiores a cuando se emplea uno de estos marcadores de forma individual [Deng y cols., 2008; Mikolajczyk y cols., 2011].

La EpCAM es una molécula de superficie que está expresada en la mayor parte de células epiteliales y carcinomas [Spizzo y cols., 2002; Went y cols., 2006; Went y cols., 2008]. Por lo tanto, se considera un marcador de células tumorales epiteliales localizadas en tejidos hematopoyéticos, como médula ósea y sangre periférica [Meng y cols., 2004a; Cristofanilli y cols., 2004; Cohen y cols., 2008; Sastre y cols., 2008]. El principal problema de utilizar la EpCAM para el aislamiento de CTCs es que se produzcan falsos negativos debido a que no se detectan las CTCs que no la expresan [Antolovic y cols., 2010; Mikolajczyk y cols., 2011], ya que no todos los tumores expresan esta molécula y hay tejidos que tienen una regulación muy baja de las moléculas de adhesión durante la progresión tumoral [Tai y cols., 2007; Willipinski-Stapelfeldt y cols., 2005; Paterlini-Brechot y Benali, 2007; van der Gun y cols., 2008]. También pueden ocurrir falsos positivos debido a la detección de células no tumorales que expresan EpCAM [Choesmel y cols., 2004a].

Las CKs son parte del citoesqueleto de las células epiteliales, exactamente forman los filamentos intermedios de éstas, y son características de estas células, por lo tanto, al igual que la EpCAM, se consideran un marcador de células tumorales epiteliales localizadas en tejidos hematopoyéticos. Sin embargo, se han descrito expresiones de CKs en: procesos inflamatorios [Kowalewska y cols., 2010]; y por parte de las MNC [Kaho y Huan, 2002; Kowalewska y cols., 2010], sobre todo, en muestras de aspirados de médula ósea [Choesmel y cols., 2004b], que pueden contribuir a la detección de falsos positivos, principalmente en ensayos que utilizan técnicas moleculares para la detección de CTCs. Aunque las CKs se expresan en todos los tumores sólidos de origen epitelial [Moll y cols., 1982; Moll, 1991], hay que tener en cuenta que

pueden modificar su expresión durante la progresión tumoral [Woelfle y cols., 2004; Willipinski-Stapelfeldt y cols., 2005; Polley y cols., 2006; Paterlini-Brechot y Benali, 2007], por lo que en sangre periférica pueden aparecer CTCs con baja expresión de CKs e incluso negativas para este marcador (CTCs que expresan CK pero por debajo del nivel de detección que se está utilizando o diferentes CKs a las empleadas) [Fehm y cols., 2002; Mikolajczyk y cols., 2011]. Si bien las CKs han sido validadas como un marcador de células tumorales de origen epitelial en sangre, tanto para el cáncer de mama como para el cáncer colorrectal [Molnar y cols., 2001; Fehm y cols., 2002; Gaforio y cols., 2003; Cristofanilli y cols., 2004; Cohen y cols., 2008; Wong y cols., 2009], hay que recordar que no son marcadores tumorales específicos.

1.3.3. Técnicas de detección de CTCs

La limitación más importante que presentan las técnicas de detección, al igual que la técnica de enriquecimiento inmunomagnético, es la carencia de un marcador tumoral específico de CTCs. El marcador más utilizado son las CKs, aunque hay que tener en cuenta lo que se ha comentado anteriormente.

Cuando la detección se realiza por técnicas inmunológicas, ICC e IF, tras el enriquecimiento de la muestra se realiza la marcación de las células tumorales con mAbs frente a antígenos específicos, como pueden ser: CK20 y mucinas, en cáncer gastrointestinal y de vejiga [Soeth y cols., 1997; Retz y cols., 2001; Hardingham y cols., 2000]; el antígeno específico de próstata (PSA) en cáncer de próstata [Ghossein y cols., 1997]; la tiroquinasa en melanoma [Ghossein y Bhattacharya, 2000; Schitteck y cols., 2001]; y mamaglobulina,

CKs, mucinas (MUC1) y la proteína HER2 en cáncer de mama [Zach y cols., 2000; Zach y cols., 2002; Naume y cols., 2001; Grunewald y cols., 2000; de Cremoux y cols., 2000; Benoy y cols., 2004; Swerts y cols., 2004; Slade y cols., 2005; Wülfing y cols., 2006; Munzone y cols., 2010; Ignatiadis y cols., 2011].

Las CKs que más se utilizan en la detección de CTCs, por técnicas ICC y de IF, en cáncer de mama son las CKs 7/8/18/19 [Gaforio y cols., 2003; Cristofanilli y cols., 2004; Cristofanilli y cols., 2005], y en cáncer colorrectal son las CKs 8; 18; 19; y 20 [Cohen y cols., 2008; Maestro y cols., 2009; Cohen y cols., 2009; Wong y cols., 2009], aunque también se utilizan anticuerpos denominados pan-antiCKs que incluyen un rango más amplio de detección de éstas. Cómo el mAb MNF116, que reconoce las CKs 5, 6, 8, 17 y 19 [Molnar y cols., 2001]; o el mAb C11 que reconoce las CKs 4-6, 8, 10, 13 y 18 [Fehm y cols., 2002]; o el cóctel de anticuerpos AE1-AE3, que reconoce las CKs 1-8, 10, 14-16, y 19 [Campos y cols., 2008]. La elección de estos marcadores va a depender del tipo de tumor estudiado, y hay que recordar que la mayoría de ellos no son específicos de células tumorales.

Las técnicas empleadas como sistema de detección de CTCs en esta tesis han sido la ICC y la IF indirecta. Ambas son técnicas muy específicas, ya que utilizan mAbs para el reconocimiento de los marcadores deseados (mAb dirigidos frente a proteínas o a epítomos muy específicos), pero en ambos casos se pueden originar falsos positivos en la detección de CTCs. Esto se puede deber a que exista una expresión mínima o ilegítima del marcador estudiado en la población de células que no nos interesa, por ejemplo: anti-mucinas [Brugger y cols., 1999] y anti-CKs [Vagunda y cols., 2001]. Además, cuando se emplean técnicas

inmunológicas, hay que tener en cuenta que pueden aparecer falsos negativos debidos a que las células metastásicas tumorales *in vivo* pueden no expresar los marcadores que se han estudiado *in vitro* (líneas celulares) o si lo hacen, que lo hagan en niveles muy bajos, debido a la heterogeneidad del tumor [Zehentner, 2002; Fehm y cols., 2002; Mikolajczyk y cols., 2011].

En el caso de la técnica ICC, también pueden aparecer falsos positivos debidos a los sistemas de revelado empleados, fosfatasa alcalina o peroxidasa [Braun y Pantel, 1999]. El sistema de revelado empleado, en el primer trabajo experimental y en los controles de recuperación celular, ha sido la fosfatasa alcalina y el sustrato de la enzima para obtener el precipitado de color rojo (Fast Red TR/Naphthol AS-MX solución sustrato, Sigma-Aldrich). Aunque se ha empleado, para el enriquecimiento inmunomagnético y la detección por ICC, un método estandarizado previamente [Martin y cols., 1988], se realizaron controles al inicio del estudio para asegurar que no existían falsos positivos.

Otra limitación que presenta la técnica de ICC es que el sustrato de la enzima se revela colorimétricamente, por lo tanto a la hora de evaluar varios marcadores simultáneamente en las células tumorales aisladas hay que acoplar varios sistemas de revelado, utilizando diferentes enzimas y sustratos, haciendo que la metodología se vuelva complicada.

Para asegurar la alta especificidad de los ensayos, se incorporaron los siguientes controles y precauciones en los estudios:

- i. Los controles positivos (células de líneas tumorales que se mezclan con sangre periférica de voluntarios sanos) son procesados de forma separada a las muestras de los pacientes, para evitar contaminación;
- ii. Los primeros mililitros de sangre que se colectan del paciente son desechados para evitar contaminación por células epiteliales;
- iii. En el primer trabajo experimental se emplea un método de enriquecimiento inmunomagnético seguido de una detección inmunocitoquímica, los cuales han sido estandarizados previamente [Martin y cols., 1998];
- iv. Antes de la marcación con el anticuerpo monoclonal (mAb) anti-CKs, se emplea un reactivo de bloqueo de los receptores Fc de las células (leucocitarias) que impide la formación de uniones inespecíficas;
- v. El mAb CAM5.2 (anti-CKs 7/8) es el que se utiliza para la marcación magnética específica de células tumorales mamarias. Distintos e independientes estudios han evaluado el uso de varios mAbs para la detección de células tumorales diseminadas y han demostrado que el mAb CAM5.2 origina una marcación fuerte y uniforme en carcinomas primarios derivados de varios órganos, incluido de mama [Martin y cols., 1998]. Este mAb también ha sido empleado para la marcación magnética de células tumorales de colon [Molnar y cols., 2001; Weihrauch y cols., 2002; Fehm y cols., 2002].

Para evitar falsos positivos en la evaluación de las muestras, solo se han considerado células CK+ las que presentaban las siguientes características: células nucleadas con morfología de célula tumoral, mayor ratio núcleo/citoplasma, y una marcación fuerte para las CKs.

La especificidad de los ensayos fue confirmada empleando controles de voluntarios sanos (controles negativos), donde no se detectó células CK+.

Una vez establecida la validez de la técnica en la detección de CTCs en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama, se realizó una modificación que permitía evaluar simultáneamente el fenotipo y el genotipo de las CTCs aisladas, examinando simultáneamente el número de copias de *ERBB2/TOP2A/CEP17* y la expresión de las CKs 1-8/10/14-16/19 en estas células por IF indirecta. Esto se realizó aplicando la técnica FICTION tras el enriquecimiento inmunomagnético.

La técnica FICTION fue desarrollada para poder asignar a células tumorales un clon citogenéticamente definido y, al mismo tiempo, poder determinar su linaje celular [Weber-Matthiesen y cols., 1992; Weber-Matthiesen y cols., 1993]. Esta técnica ha demostrado ser útil en el estudio de neoplasias hematógenas [Nylund y cols., 1993; Haferlach y cols., 1997; Temple y cols., 2004; Young y cols., 2006] y algunos tumores sólidos [Terada y cols., 2000; Zhang y cols., 2000; Dettori y cols., 2003]. En el caso de tumores sólidos, Zhang y cols. (2000) emplearon esta técnica en seis líneas celulares de cáncer de mama para conocer la relación que existía entre la expresión del receptor de estrógenos (ER) y la delección del gen del receptor de estrógenos (*ESR*). Terada y cols. (2000) estudiaron, empleando la técnica FICTION, en 105 pacientes con cáncer gástrico la frecuencia de células positivas para el antígeno nuclear de proliferación celular y las aberraciones en el cromosoma 17 de estas células, demostrando que eran indicadores del potencial metastásico del tumor. Dettori y cols. (2003) emplearon esta técnica para evaluar la expresión del antígeno de membrana mitocondrial

y estudiar simultáneamente las aberraciones en el cromosoma 18 que presentaban pacientes con tumores tiroideos.

En el segundo y tercer trabajo experimental de esta tesis, se empleó como sistema de detección de CTCs la IF indirecta. Esta técnica es muy similar a la ICC empleada anteriormente, sin embargo el mAb usado en la detección no va unido a un sistema de revelado enzimático sino a un sistema de revelado por fluorescencia. En los ensayos realizados en esta tesis, se utilizó, una cascada de dos mAbs secundarios fluorescentes, de forma que se amplifica la señal de fluorescencia y se pueden reconocer más fácilmente las CTCs. Los resultados obtenidos en los controles positivos, sangre periférica de voluntarios sanos mezclada con células tumorales de líneas mamarias y de colon, muestran que las células tumorales presentan una marcación fluorescente azul [Figura 1 del segundo trabajo experimental (*Capítulo 4. Resumen global de los resultados: Resultados del trabajo experimental del capítulo 2*) y figura 1 del tercer trabajo experimental (*Capítulo 4. Resumen global de los resultados: Resultados del trabajo experimental del capítulo 3*)] y una preservación buena de su morfología. La especificidad de los ensayos fue confirmada empleando controles de voluntarios sanos (controles negativos); donde no se detectó, en ninguno de ellos, células CK+ (con fluorescencia azul).

Para asegurar la alta especificidad de los ensayos, se incorporan a las precauciones anteriormente descritas las siguientes:

- i. Uso del anticuerpo biclonal AE1/AE3 (pan-antiCKs) para el inmunofenotipaje;
- ii. Utilización de un suero bloqueante (suero de conejo), de la misma especie animal en la que se desarrolla el primer mAb secundario

fluorescente (conejo anti-ratón), para evitar uniones inespecíficas del primer mAb secundario y por lo tanto amplificar una señal errónea.

La IF a diferencia de la ICC no tiene limitación a la hora de evaluar dos marcadores o más simultáneamente. Los mAbs que se utilizan en esta técnica pueden ir conjugados, directa o indirectamente, con diferentes fluorocromos. Los fluorocromos son moléculas que emiten fluorescencia al absorber energía de una longitud de onda específica, la fluorescencia emitida es fácil de detectar a través de un sistema de filtros y de detección de la misma, por ejemplo: por citometría de flujo o microscopia de fluorescencia. Existe una amplia gama de fluorocromos (que dan lugar a una amplia gama de fluorescencias (colores), dependiendo de la longitud de onda emitida por cada uno), que se pueden emplear para estudiar simultáneamente varios marcadores en las CTCs [de Bono y cols., 2007; Stojadinovic y cols., 2007b; Cao y cols., 2010]. El único límite que existe en esta técnica es que se deben utilizar mAbs conjugados con fluorocromos, o con sistemas de revelado de amplificación de la señal, que no se solapen en su rango de longitudes de onda de absorción y emisión.

En ambos tipos de técnicas de detección, ICC e IF indirecta, se puede producir una pérdida de especificidad en el ensayo debida a la pequeña proporción de CTCs que existen en la muestra, comparadas con la cantidad de células hematopoyéticas presentes. Así que, tanto la técnica escogida como el marcador utilizado para la detección son cruciales para obtener la mayor sensibilidad y especificidad posible [Ko y cols., 2000; Silva y cols., 2001].

En cuanto a la evaluación genética realizada en los trabajos experimentales, los resultados obtenidos demuestran que la técnica FICTION puede ser empleada para evaluar la amplificación o delección de genes en líneas celulares [Figura 2 del segundo trabajo experimental (*Capítulo 4. Resumen global de los resultados: Resultados del trabajo experimental del capítulo 2*) y figura 1 del tercer trabajo experimental (*Capítulo 4. Resumen global de los resultados: Resultados del trabajo experimental del capítulo 3*)] o en CTCs de sangre periférica de pacientes con tumores sólidos de origen epitelial [Figura 2 del tercer trabajo experimental (*Capítulo 4. Resumen global de los resultados: Resultados del trabajo experimental del capítulo 3*)], sin ningún problema. Los resultados obtenidos en las líneas celulares de cáncer de mama, coinciden con las evaluaciones genéticas llevadas a cabo por otros grupos de investigación que emplean otras técnicas. Por ejemplo, varios trabajos han demostrado la amplificación de los genes *ERBB2* y *TOP2A* en las células SK-BR-3 mediante técnicas como: la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) [Szöllösi y cols., 1995; Järvinen y cols., 1999; Järvinen y cols., 2000; Forozan y cols., 2000]; la hibridación genómica comparativa (CGH) [Forozan y cols., 2000; Lottner y cols., 2005]; y el cariotipado espectral [Kytölä y cols., 2000]. Otros trabajos han demostrado la delección del gen *ERBB2* en MCF-7 por técnicas como FISH [Szöllösi y cols., 1995] y CGH [Shadeo y Lam, 2006]; y un número de copias normal de este gen en MDA-MB-231 por cariotipado de bandas-G [Satya-Prakash y cols., 1981] y FISH [Grushko y cols., 2002; Lottner y cols., 2005]. En cuanto al gen *TOP2A*, no he encontrado estudios que indiquen su estado en estas dos líneas tumorales.

La técnica FICTION permite, además, poder realizar una segunda marcación de moléculas de superficie en las CTCs aisladas, y analizadas previamente. Se puede de esta forma, analizar la expresión de una proteína en estas células tumorales tras conocer su fenotipo y genotipo. En el tercer trabajo experimental de esta tesis, se ha demostrado que se puede analizar la expresión de la proteína HER2 en las CTCs aisladas de sangre periférica, las cuales previamente habían sido caracterizadas para la expresión de CKs y el número de copias de *ERBB2*/CEP17. Este análisis se ha realizado en varios controles positivos y en la muestra clínica del paciente con número de identificación (IN) 28.

Previo al análisis de la muestra clínica del paciente IN28, se realizaron; varios controles positivos, muestras de sangre periférica de voluntarios sanos mezcladas con células de diferentes líneas tumorales (HT-29, Caco-2, MCF-7, MDA-MB-231 o SK-Br-3) que se procesaron según el protocolo de FICTION seguido de una marcación de la proteína HER2 (protocolo de la casa comercial, DAKO, CA); y un control negativo, que se realiza igual que los controles anteriores pero se le añade peróxido de hidrógeno, para este control se empleó la línea tumoral mamaria SK-Br-3, ya que sobreexpresa esta proteína. Los resultados obtenidos en los controles demostraron que: no existían reacciones cruzadas entre el protocolo de FICTION y el de marcación de la proteína HER2 (en el control de peróxido de hidrógeno se obtiene un resultado negativo para la marcación de la proteína, que era lo que se esperaba); la morfología de las células tumorales se mantenían; y era fácilmente distinguible, a la vez que cuantificable, la marcación de la proteína HER2 en las células tumorales. Cuando se aplicó este protocolo a la muestra del paciente IN28 se pudo, además de cuantificar la expresión de la proteína HER2 en las CK+/CTCs, identificar 9 células tumorales que no habían sido

reconocidas como CK+ (CK-/CTCs), seguramente por no expresar las CKs estudiadas. Los resultados obtenidos fueron que, al igual que en los controles positivos, las CTCs de sangre periférica del paciente IN28 mantuvieron su morfología y fueron fácilmente evaluables para la expresión de la proteína HER2. En este caso, debido a que más del 10% de las CTCs analizadas sobreexpresaban la proteína, la muestra se consideró positiva para la expresión de HER2 en las CTCs. En cuanto a esto, hay que indicar que varios estudios señalan que con la evaluación de solamente 10 CTCs se puede conocer el estado de HER2 en la mayoría de los pacientes [Meng y cols., 2004a; Meng y cols., 2006; Cao y cols., 2010].

Hay que añadir que tras la puesta a punto de la metodología desarrollada en el segundo trabajo experimental, se comprobó que era posible su utilización en una muestra clínica de una paciente con cáncer de mama metastásico, antes de ser utilizada en la población de pacientes con cáncer de colon. La muestra clínica fue una extracción de sangre periférica, tomada previamente al tratamiento que se le iba a administrar a la paciente, la cual se analizó para la detección de CTCs siguiendo el protocolo publicado en 2008 [Campos y cols., 2008]. En esta muestra se pudieron detectar dos CTCs, que fueron claramente identificadas (expresión de CKs, fluorescencia azul) y cuya morfología era acorde a un fenotipo maligno. La evaluación genética mostró que ambas células tumorales eran diploides y no presentaban ninguna alteración en el número de copias de los genes *ERBB2* y *TOP2A* (datos no mostrados).

4. **Conservación de las muestras**

Las muestras clínicas evaluadas por ICC, fueron procesadas hasta el final, es decir, hasta la evaluación de las mismas. Tras esto se almacenaron en el medio en que se montaron, gelatina glicerizada (MERCK; Darmstadt, Alemania), a temperatura ambiente, junto con los controles positivos y negativos que se incluyeron en el estudio. Siguiendo este sistema se han almacenado: la primera extracción sanguínea o basal (extracción previa a la cirugía y/o al tratamiento quimioterápico, hormonoterápico y/o dirigido) de los 92 casos que se recogieron en el primer trabajo experimental de esta tesis; las extracciones correspondientes al seguimiento del tratamiento que se les estaba aplicando a estos 92 pacientes, con un intervalo de ≤ 5 , 5-12, 12-24 y ≥ 24 meses; las extracciones correspondientes a las revisiones tras el tratamiento; las muestras de 20 pacientes neoadyuvantes nuevos, que se procesaron entre 2003-2004 (extracción basal y al mes del tratamiento); y la extracción basal de los primeros 8 pacientes con cáncer de colon. En total existen almacenadas de esta forma 506 muestras biológicas.

En marzo de 2006, se realizó un estudio retrospectivo de 15 muestras de pacientes neoadyuvantes con cáncer de mama, en el cual se aplicó la técnica FISH para la evaluación de *ERBB2/TOP2A/CEP17* en las CTCs que habían sido aisladas. Inicialmente este protocolo se ensayó en controles positivos, procesados como los controles de recuperación celular, en los que se obtuvo, de forma general: la marcación de los centrómeros en algunas células tumorales, pero nunca de los genes; una marcación génica incompleta, ya que no todos los controles positivos mostraron la hibridación de la sonda, las células hematopoyéticas de estos controles tampoco presentaban hibridación de la sonda; y la

colocalización de las células tumorales fue difícil tras la destrucción de la membrana celular. Al aplicar este protocolo en las muestras clínicas de los pacientes, se obtuvo que: el número de muestras que no hibridaron era superior al obtenido en los controles positivos; y la colocalización de las CTCs fue más difícil al aparecer un número menor de células tumorales que en los controles positivos. Por lo tanto, este tipo de procesamiento solo permite realizar un estudio de la aneusomía cromosómica de las muestras, y no de todas ellas, preferiblemente de las muestras más recientes, aunque esta premisa no asegure que la técnica FISH se pueda realizar con éxito.

Las muestras clínicas procesadas para una detección por IF indirecta, pacientes con cáncer de colon, fueron procesadas hasta el aislamiento de las células tumorales (tras el enriquecimiento inmunomagnético) y almacenadas a -20 °C, junto con controles positivos y negativos que garantizarían el estado de conservación de las muestras clínicas.

Inicialmente, antes de aplicar este tipo de almacenaje a las muestras clínicas y a los controles correspondientes, se realizaron varias pruebas de almacenaje a -20 °C de varios controles positivos, durante 3 y 6 meses, y se comprobó que existía una conservación adecuada de las muestras. Además, durante el procesamiento de las muestras clínicas se fueron rescatando controles positivos almacenados a -20 °C, que habían sido almacenados durante diferentes momentos (12 meses, 24 meses y 36 meses antes del procesamiento de las muestras clínicas y los controles correspondientes) comprobando que las muestras se conservaban adecuadamente.

Una vez que se obtenía un número de muestras adecuado, tanto clínicas como de controles, se procedía con la técnica FICTION y la evaluación de las mismas. Tras esto, las muestras se almacenan a -20 °C para asegurar que la fluorescencia se mantenga el mayor tiempo posible. De esta forma han sido procesadas las muestras sanguíneas de: una paciente con cáncer de mama, de la que se obtuvo la extracción basal; 78 pacientes con cáncer de colon, de los cuales se ha obtenido la extracción basal, y 23 muestras de segunda extracción (extracción sanguínea que se realiza un mes tras el tratamiento administrado). En total existen almacenadas a -20 °C, 102 muestras clínicas procesadas completamente.

Del total de los pacientes con cáncer de colon, se obtuvieron los datos clínicos y anatomopatológicos de los primeros 33 casos, que son los que se exponen en el tercer trabajo experimental de esta tesis.

II. UTILIDAD CLÍNICA DE LA DETECCIÓN DE CTCs EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA

1. Trabajos existentes sobre el tema

La presencia de células cancerosas en sangre periférica es conocida desde antaño [Ashworth, 1869; Engell, 1955]. En los últimos años se han utilizado diferentes técnicas inmunológicas y moleculares para detectar células tumorales en médula ósea, nódulos linfáticos y sangre periférica de pacientes con cáncer [Pelkey y cols., 1996; Pantel y cols., 2003; Ross y Slodkowska, 2009; Königsberg y cols., 2010; Negin y Cohen, 2010; Ignatiadis y Reinholz, 2011; Königsberg y cols., 2011].

Actualmente está aceptado el valor pronóstico que tiene la detección de células tumorales diseminadas (DTCs) en médula ósea de pacientes con cáncer de mama, sobre el tiempo libre de enfermedad y la supervivencia global [Braun y cols., 2000; Braun y cols., 2001a; Solomayer y cols., 2001; Pantel y cols., 2003]. En cuanto al análisis genético de las DTCs en médula ósea, la primera evidencia de la naturaleza maligna de estas células fue expuesta en el trabajo de Müller y cols. (1996). En este trabajo se describió que las células CK+ aisladas en médula ósea de pacientes con cáncer de mama presentaban, predominantemente, un patrón diploide para el cromosoma 17 y el gen *ERBB2*, aunque 2 de los 9 pacientes estudiados presentaron amplificación del gen. En cuanto al análisis genético de las DTCs hay que destacar el trabajo de Schmidt-Kittler y cols. (2003), donde se propone la *teoría de la evolución paralela del cáncer* debido a que las DTCs de pacientes en estadio M0, además de portar menos aberraciones genéticas, portan

aberraciones genéticas diferentes a las CTCs de pacientes en estadio M1 y a las células del tumor primario, esto hace suponer que la diseminación tumoral, además de ocurrir de una forma temprana, no sucede a partir del clon más avanzado del tumor primario (modelo de “*expansión y selección clonal*”, entendiendo como clon más avanzado aquel que es seleccionado por presentar mutaciones más inestables que otorgan ventajas de crecimiento, que serán las responsables de la progresión tumoral y la formación de las metástasis).

El problema principal que presenta este tipo de análisis es que la muestra de estudio es un aspirado de médula ósea, generalmente de cresta ilíaca o de las costillas, el cual es un proceso invasivo y resulta incómodo para el paciente, por lo tanto es difícil que se utilice como método rutinario en el seguimiento de la enfermedad.

Hasta la fecha de la primera publicación incluida en esta tesis, hay que señalar que aunque existían trabajos que estudiaban la detección de CTCs en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama, la mayor parte de estos eran estudios basados en técnicas moleculares [Aerts y cols., 2001; Bischoff y cols., 2003; Stathopoulou y cols., 2003], y ninguno demostraba el valor pronóstico de la detección de estas células en sangre periférica. En cuanto a los trabajos que empleaban técnicas inmunológicas, pasaba algo parecido: dos trabajos señalaban la detección de CTCs como marcador de monitorización del tratamiento [Racila y cols., 1998; Kasimir-Bauer y cols., 2002]; los otros trabajos, o solo publicaban el método desarrollado [Martin y cols., 1998], o no demostraban el valor pronóstico de la detección de estas células [Witzig y cols., 2002], o se centraban en el análisis genético de las mismas Engel y cols., 1999; Fehm y cols., 2002]. En cuanto al estudio genético de

las CTCs, los trabajos publicados demuestran que estas células son heterogéneas respecto a las anormalidades cromosómicas que presentan, y es más frecuente la ganancia de cromosomas que la pérdida de los mismos [Engel y cols., 1999; Fehm y cols., 2002]. El trabajo de Engel y cols. (1999), señala que las anormalidades cromosómicas que presentan los tumores primarios aparecen en las CTCs, aunque en una menor frecuencia, y sus resultados sugieren que el cromosoma 17 está envuelto en la formación de micrometástasis en pacientes con cáncer de ovario y mama, de forma más frecuente que los cromosomas 7 y 12.

La ventaja fundamental que presenta la evaluación de la detección de las CTCs en sangre periférica, que algunos autores han definido como “biopsia líquida” [Bednarz-Knoll y cols., 2011; Pachmann y cols., 2011; Kuhn y Bethel, 2012], es que con una mera extracción sanguínea, proceso poco invasivo y que se puede realizar de forma rutinaria, se podría realizar el seguimiento de la evolución del paciente.

2. Relación de la presencia de CTCs en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama con los factores pronósticos clásicos

En el primer trabajo experimental de esta tesis, se detectaron CTCs (células CK+) en el 62% de las muestras sanguíneas de los pacientes con cáncer de mama, siempre recogiendo ambas fracciones celulares, MNC y GC. Como se ha comentado antes, varios estudios obtienen porcentajes de pacientes con células CK+ en sangre periférica similares o más altos que los detectados en el primer trabajo experimental.

Los resultados obtenidos en pacientes con cáncer de mama muestran que la detección de células CK+ no se produce sólo en los pacientes con cáncer avanzado (13/17 casos (76,5%) con tumores T4) sino también en 9 de los 18 casos (50%) de los pacientes con tumores pequeños (T1) [Tabla I del primer trabajo experimental (*Capítulo 4. Resumen global de los resultados: Resultados del trabajo experimental del capítulo 1*)]. Además, los resultados sugieren que existe una asociación entre la presencia de células CK+ en sangre periférica y el estadio de los nódulos linfáticos ($p=0,033$) [Tabla I del primer trabajo experimental (*Capítulo 4. Resumen global de los resultados: Resultados del trabajo experimental del capítulo 1*)]. No obstante, se han detectado células CK+ en sangre periférica en 5 de los 15 pacientes nódulos negativos (N0) (33,3%). Este hallazgo sugiere que, por este método, se puede identificar una diseminación temprana de células tumorales al torrente sanguíneo, y que la presencia de células tumorales en sangre periférica puede ser un evento más frecuente de lo esperado. Estos resultados concuerdan con los presentados por Solakoglu y cols. (2002) que encontraron células CK+ en médula ósea en el 78,9% de los pacientes sin metástasis (M0). Por otro lado, no se encontró ninguna correlación, estadísticamente significativa, entre la presencia de células CK+ en sangre periférica y biomarcadores como cerB-2, p53 o ki67 [Tabla I del primer trabajo experimental (*Capítulo 4. Resumen global de los resultados: Resultados del trabajo experimental del capítulo 1*)].

Estudios posteriores al primer trabajo experimental de esta tesis han obtenido resultados muy similares a estos, donde pacientes con tumores pequeños presentan CTCs en sangre [Fhem y cols., 2009; Lang y cols., 2009; Krishnamurthy y cols., 2010; Banys y cols., 2012]. Sin embargo, aparece disparidad en los resultados de estos estudios en

cuanto a la asociación que existe entre la presencia de CTCs y el estado de los nódulos linfáticos, por un lado hay estudios que demuestran una correlación entre ambos, aunque obtengan que pacientes NO también presentan CTCs [Fhem y cols., 2009; Banys y cols., 2012], y por otro lado, hay estudios que indican que no existe dicha correlación [Lang y cols., 2009; Krishnamurthy y cols., 2010].

De forma llamativa, los resultados del primer trabajo experimental muestran una asociación significativa ($p=0,049$) entre la presencia de células CK+ en sangre periférica y el estatus del ER en el tumor primario, cuando se analizan los datos de todos los pacientes (metastásicos y no metastásicos). Este resultado sugiere que la expresión del ER puede conferir propiedades ventajosas a las células tumorales de mama, como la de facilitar la entrada de la célula tumoral al torrente sanguíneo o la de prevenir la apoptosis celular. En este contexto, el estudio de Lippert y cols. (2003) muestra que muchos, pero no todos, de los metabolitos endógenos del estradiol provocan un patrón bifásico en la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama ER+, por ejemplo: a bajas concentraciones se obtiene un efecto estimulador y a altas concentraciones se obtiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular. Además se ha demostrado que los estrógenos pueden prevenir la apoptosis a través de un mecanismo mediado por los ER [Song y Santen, 2003].

En pacientes con cáncer de mama, las decisiones terapéuticas se realizan utilizando indicadores de predicción y pronóstico, donde el estado del ER es importante a la hora de la toma de decisión del tratamiento. Existe un consenso general en cuanto a que pacientes con cáncer de mama con tumores ER+ poseen una supervivencia más larga

que pacientes con tumores ER-, pero esto se limita a un subgrupo de pacientes específicos [Kenny y cols., 1999; Utsumi y cols., 2000; Costa y cols., 2002]. Watts y cols. (1995) sugieren que la sobreexpresión de la ciclina D1 en tumores ER+ puede conllevar insensibilidad a los anti-estrógenos. Costa y cols. (2002) presentaron resultados que indicaban que el estado del receptor de progesterona en el tumor primario de pacientes con cáncer de mama es comparable al valor predictivo que tiene el estado de los ER sobre la prognosis de la enfermedad. También es importante señalar, que varios estudios recientes han demostrado que aparece una variación del fenotipo de las CTCs con respecto a los marcadores del tumor primario (HER2, ER y PgR) [Meng y cols., 2004a; Meng y cols., 2006; Fehm y cols., 2009; Fehm y cols., 2010; Somlo y cols., 2011; Banys y cols., 2012], lo cual podría explicar la resistencia que presentan algunos pacientes sometidos a ciertos tratamientos, como tratamientos hormonales o trastuzumab.

Por lo tanto, es imperativo encontrar e identificar nuevos marcadores predictivos y de pronóstico de la enfermedad que puedan soportar la toma de decisiones sobre el tratamiento. Los resultados obtenidos en el primer trabajo experimental sugieren que, debido al potencial tumorigénico y metastásico que tienen las CTCs [Pretlow y cols., 2000; Fehm y cols., 2002], la detección de células CK+ en sangre periférica sería un buen indicador de una diseminación temprana de la enfermedad, y puede llevarnos a identificar un subgrupo de pacientes con cáncer de mama (que incluyen pacientes con tumor primario ER+) con un peor pronóstico.

Estudios posteriores al primer trabajo experimental de esta tesis, sugieren que la diseminación de CTCs es más frecuente en pacientes con cáncer de mama cuyo tumor primario es triple negativo (HER2-/ER-/PgR-) [Fehm y cols., 2009; Banys y cols., 2012]; seguida por la diseminación de CTCs en pacientes cuyo tumor primario es del subtipo tumoral HER2+/ER-/PgR- y del subtipo ER+ y/o PgR+ [Banys y cols., 2012], o directamente por la diseminación del subtipo ER+ y/o PgR+ [Fehm y cols., 2009]. Pero ninguno de ellos muestra una asociación entre la presencia de CTCs y el estatus del ER en el tumor primario.

3. Impacto pronóstico de la presencia de CTCs en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama

Los resultados del primer trabajo experimental muestran que la detección de células CK+ en sangre periférica, antes de quimioterapia, se correlaciona significativamente con la progresión libre de enfermedad y la supervivencia global de la población [Figuras 3 y 4 del primer trabajo experimental (*Capítulo 4. Resumen global de los resultados: Resultados del trabajo experimental del capítulo 1*)]. Por consiguiente, con un periodo de seguimiento medio de 21 meses, la detección de células CK+ en sangre periférica parece que predice la progresión de la enfermedad de forma anticipada en pacientes con cáncer de mama.

La conclusión del primer trabajo experimental incluido en esta tesis es que: la detección de células CK+ en sangre periférica antes de la quimioterapia puede identificar a pacientes con cáncer de mama con un peor pronóstico. Aunque hacen falta realizar estudios con seguimientos en el tiempo más largos y poblaciones con un mayor número de pacientes, para poder confirmar los resultados obtenidos.

Tras esta publicación [Gaforio y cols., 2003], han ido apareciendo estudios cuyos resultados y conclusiones coinciden con los expuestos en esta tesis. Cristofanilli y cols. (2004; 2005) demostraron que la detección de CTCs (≥ 5 CTCs por 7,5 ml de sangre periférica) en pacientes metastásicos de cáncer de mama, antes de iniciar el tratamiento con quimioterapia, es un factor pronóstico independiente de la enfermedad. Estudios posteriores, sugieren que la cuantificación de CTCs durante el tratamiento puede ser una herramienta útil para la estratificación de los pacientes y diseñar tratamientos dirigidos [Hayes y cols., 2006; Dawood y cols., 2008].

En el caso de pacientes metastásicos de cáncer de mama, son varias las publicaciones que han demostrado el valor pronóstico de la detección de CTCs en sangre periférica, tanto antes como durante el tratamiento administrado [Pierga y cols., 2004; Budd y cols., 2006; Camara y cols., 2007; Bidard y cols., 2008a; Dawood y cols., 2008; Nolé y cols., 2008; Pierga y cols., 2012], además en este tipo de pacientes parece que la detección de DTCs no tiene el interés clínico que posee su detección en pacientes no metastásicos [Bidard y cols., 2008a; Bidard y cols., 2008b], siendo un mejor marcador la detección de CTCs [Pierga y cols., 2004; Bidard y cols., 2008a]. En cuanto a la detección de CTCs en pacientes con cáncer de mama en estadios tempranos, aunque parece predecir la recaída de la enfermedad durante el tratamiento quimioterápico [Pierga y cols., 2008], es necesario realizar más estudios para estar seguros de su valor pronóstico [Bidard y cols., 2010].

Hay que destacar dos hechos: el primero es que la Asociación Americana de Oncología (ASCO) señala en la guía de 2007 de marcadores tumorales para cáncer de mama, la detección de CTCs en sangre

periférica como un futuro marcador de diagnóstico de la enfermedad y evaluación de la terapia administrada, aunque en este momento su uso no está recomendado [Harris y cols., 2007]. En esta guía se cita el artículo publicado en 2003 [Gaforio y cols., 2003], como uno de los primeros trabajos donde se demuestra el valor pronóstico de la detección de CTCs en sangre periférica en este tipo de pacientes. Y el segundo es que la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) acepta el uso del sistema CellSearch System (Veridex LLC, Raritan, NJ) para la monitorización de los niveles de CTCs en sangre periférica de pacientes con cáncer metastásico de mama, colon y próstata, y así poder evaluar la respuesta al tratamiento quimioterápico que están siguiendo.

III. UTILIDAD CLÍNICA DE LA DETECCIÓN DE CTCs EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON CÁNCER DE COLON

1. Trabajos existentes sobre el tema

Los primeros trabajos que hablan de la detección de células tumorales en sangre de pacientes con cáncer colorrectal, fueron los de Engell en 1955 y 1959. En ellos se describe que existía un porcentaje alto de pacientes que presentaban CTCs en sangre en el momento de la cirugía; y supuso que debía existir una diseminación previa a ésta.

Con la llegada de la PCR y la qRT-PCR, se introdujo una tecnología para el estudio de la enfermedad mínima residual muy útil [Ghossein y Rosai, 1996], de hecho la técnica más utilizada para la detección de CTCs en pacientes con cáncer colorrectal metastásico ha sido la qRT-PCR [Huang y cols., 2003; Koch y cols., 2006; Wang y cols., 2006], utilizando las CKs (sobre todo la CK20) y el antígeno carcinoembrionario (CEA) como marcadores principales. Aunque la mayor parte de los estudios utilizan marcadores múltiples para caracterizar las CTCs en sangre [Schuster y cols., 2004; Sergeant y cols., 2008; Gervasoni y cols., 2008; Tsouma y cols., 2010].

Los estudios de qRT-PCR presentan resultados muy controvertidos como son: falsos positivos, la detección de los marcadores en muestras de voluntarios sanos [Wang y cols., 2006; Vlems y cols., 2002]; rangos de detección de una amplia variabilidad, 0,8% a 100,0% [Sergeant y cols., 2008]; correlación de la presencia de las CTCs con las características biológicas del tumor primario [Huang y cols., 2003; Zhang y cols., 2005] o con un mal pronóstico de la enfermedad

[Koch y cols., 2006; Tsouma y cols., 2010]; e incluso otros estudios fallan a la hora de encontrar cualquier valor pronóstico en la detección de estas células tumorales [Wharton y cols., 1999; Vlems y cols., 2002].

Por otro lado, varios estudios han aplicado técnicas inmunológicas para la detección de CTCs en pacientes con cáncer colorrectal. Estos trabajos generalmente usan como marcador de aislamiento celular la EpCAM [Cohen y cols., 2008; Maestro y cols., 2009; Sastre y cols., 2008; Wong y cols., 2009; Wind y cols., 2009; Thorsteinsson y cols., 2011] o las CKs 7/8 [Molnar y cols., 2001; Fehm y cols., 2002], y como marcador de detección, todos emplean, las CKs. Estos trabajos muestran rangos de detección con una menor variación (5% al 75%) [Thorsteinsson y cols., 2011; Molnar y cols., 2001], que los obtenidos en los estudios que emplean técnicas moleculares. Además, varios de estos estudios inmunológicos concluyen que la detección de CTCs en sangre periférica de pacientes con cáncer colorrectal metastásico, tras la cirugía y antes de iniciar la quimioterapia, tiene valor pronóstico sobre la enfermedad [Cohen y cols., 2008; Cohen y cols., 2009; Wong y cols., 2009].

Como se ha indicado antes, se conoce muy poco sobre las características genéticas de las CTCs aisladas en sangre periférica de pacientes con cáncer. Solo he encontrado tres estudios que analicen las características genéticas de las CTCs en sangre periférica de pacientes con cáncer de colon metastásico [Fehm y cols., 2002] y no metastásico [Wind y cols., 2009; Wong y cols., 2009]. Excepto uno de los trabajos [Wind y cols., 2009], los otros demuestran que las CTCs presentan aneuploidías cromosómicas, y es más frecuente la ganancia que la pérdida de los cromosomas. Estos resultados concuerdan con los

obtenidos en CTCs aisladas de pacientes con otros tipos de tumores sólidos epiteliales, como cáncer de mama [Fehm y cols., 2002; Meng y cols., 2004a; Meng y cols., 2004b] y próstata [Fehm y cols., 2002; Swennenhuis y cols., 2009].

2. Relación de la presencia de CTCs en sangre periférica de pacientes con cáncer de colon con los factores pronósticos clásicos

En el estudio presentado en el tercer trabajo experimental de esta tesis, se detectaron células CK+ en el 9,09% (media de 9,67 células tumorales por 10 ml de sangre periférica) de las muestras sanguíneas de los pacientes con cáncer de colon no metastásico, siempre recogiendo ambas fracciones celulares, MNC y GC.

Como se ha comentado antes en el apartado de *Limitaciones del estudio: Tipo y tamaño de la población de pacientes y tiempo de seguimiento*, las investigaciones que centran su estudio en la detección de CTCs en sangre periférica de pacientes con cáncer colorrectal metastásico obtienen porcentajes de pacientes con células CK+ en sangre periférica más altos que los detectados en el tercer trabajo experimental de esta tesis. Pero, de forma general, las investigaciones que se centran en poblaciones de pacientes con cáncer colorrectal no metastásico obtienen porcentajes de pacientes con células CK+ en sangre periférica, antes de la cirugía, muy similares a los expuestos aquí.

Los resultados del tercer trabajo experimental muestran que la detección de células CK+ no está correlacionada con las variables clinicopatológicas estudiadas [Tabla 1 del tercer trabajo experimental (*Capítulo 4. Resumen global de los resultados: Resultados del trabajo experimental del capítulo 3*)]. Resultado que concuerda con el de otros estudios realizados en el mismo tipo de pacientes [Wind y cols., 2009; Thorsteinsson y cols., 2011].

3. Impacto pronóstico de la presencia de CTCs en sangre periférica de pacientes con cáncer de colon

La detección de CTCs en sangre periférica de pacientes con cáncer colorrectal metastásico parece ser un factor pronóstico de la enfermedad [Cohen y cols., 2008; Cohen y cols., 2009], pero actualmente no existen resultados concluyentes en pacientes de estadios tempranos [Sastre y cols., 2008; Maestro y cols., 2009; Wind y cols., 2009; Wong y cols., 2009; Thorsteinsson y cols., 2011]. Los resultados obtenidos en el tercer trabajo experimental sugieren que, la detección de células CK+/CTCs en sangre periférica de pacientes con cáncer de colon no metastásico, antes de la cirugía y del tratamiento con quimioterapia, no tiene valor pronóstico sobre la enfermedad.

De forma general, los resultados obtenidos por otros grupos de investigación, excepto el de Wong y cols. (2009), señalan lo mismo que se presenta en esta tesis [Wind y cols., 2009; Thorsteinsson y cols., 2011]. Por lo tanto, harían falta realizar más estudios para estar seguros del valor pronóstico de la detección de CTCs en ese tipo de pacientes.

IV. VENTAJAS DE LA TÉCNICA FICTION Y UTILIDAD CLÍNICA DE LA CARACTERIZACIÓN, GENÉTICA Y FENOTÍPICA, DE LAS CTCs EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON TUMORES SÓLIDOS EPITELIALES

1. Ventajas de la técnica FICTION

La evaluación genética y fenotípica por la técnica FICTION, permite realizar de forma simultánea y a nivel unicelular la caracterización de las CTCs.

En el estudio de las CTCs es muy importante el uso de una técnica que permita una evaluación unicelular, ya que estas células presentan una alta heterogeneidad tanto a nivel genético [Engel y cols., 1999; Fehm y cols., 2002; Swennenhuis y cols., 2009] como fenotípico [Fehm y cols., 2002; Mikolajczyk y cols., 2011; Königsberg y cols., 2011].

La técnica FICTION supone una gran ventaja con respecto a la evaluación genética por FISH, ya que para realizar esta última es necesario la destrucción de la membrana celular y relocalizar las células para su evaluación, lo que conlleva tiempo y la pérdida de células evaluables, como ocurre en algunos estudios publicados [Swennenhuis y cols., 2009]. Por el contrario, la técnica FICTION no daña la membrana celular lo que permite realizar una segunda evaluación de otros marcadores en la célula de interés, tanto realizando un FICTION doble [Weber-Matthiesen y cols., 1993] como una marcación por ICC, como es el caso del tercer trabajo experimental presentado en esta tesis. Posibilitando de esta forma realizar una mejor caracterización fenotípica de las CTCs, lo que podría ser útil para el estudio del proceso tumoral, una

mejor clasificación de los pacientes y permitir buscar nuevas dianas terapéuticas en estas células tumorales.

En cuanto a la comparación de la técnica FICTION con las técnicas de detección de CTCs moleculares, solo cabe decir que la diferencia básica y la ventaja fundamental que presenta el FICTION es que permite la evaluación de la célula tumoral *in situ*, y no a través de marcadores sin la visualización de la célula de interés.

2. Utilidad clínica en cáncer de mama

La técnica descrita en el segundo trabajo experimental de esta tesis, se podría aplicar para la detección precoz de CTCs que porten amplificación de *ERBB2/TOP2A*, sobre todo en el caso de pacientes con cáncer de mama. De esta forma se podría monitorizar, de una forma relativamente simple, la respuesta a terapias con trastuzumab y antraciclinas. Sin embargo, lo primero que habría que hacer es comprobar la validez clínica de esta metodología en muestras clínicas de pacientes.

Hay que tener en cuenta que actualmente se desconoce si las amplificaciones o deleciones de *ERBB2/TOP2A* que encontramos en las CTCs podrían representar un patrón general de las aberraciones del tumor primario. Como, la amplificación de *ERBB2* que aparece en aproximadamente el 20% al 35% de los cánceres de mama invasivos; o la modificación de la *TOP2A*, que se ha encontrado alterada en el 90% de los tumores que presentan *ERBB2* amplificado, aunque algunos tumores que presentan copias extras de *ERBB2* muestran amplificación o deleción de *TOP2A* [Järvinen y cols., 1999]. Esto podría tener implicaciones terapéuticas, ya que deleciones en *TOP2A* confieren resistencia a los inhibidores de la topoisomerasa II [Järvinen y Liu, 2003], por lo que se

podría explicar la pérdida gradual de eficacia, común en cáncer de mama, de este tipo de tratamientos.

Hay estudios que han demostrado la adquisición de la expresión de HER2 en las CTCs durante la progresión tumoral [Meng y cols., 2004a; Fhem y cols., 2007; Fehm y cols., 2010]. Sin embargo, otros estudios han demostrado que tanto el tumor primario como las metástasis presentan un estado similar para este gen [Tanner y cols., 2001; Dirix y cols., 2005]. Teniendo en cuenta esto, uno podría pensar que las CTCs proceden de un subclon de células tumorales que no debe ser una muestra representativa de todo el tumor.

Aunque no se conozca si las CTCs presentan exactamente un patrón general de las aberraciones del tumor primario o si son un subclon de células tumorales no representativas de éste, sabemos que en ellas puede aparecer una variación tanto del genotipo como del fenotipo respecto a lo detectado en el del tumor primario, como es la amplificación de *ERBB2* [Meng y cols., 2004a; Meng y cols., 2006] y la expresión de HER2, ER y PgR [Meng y cols., 2004a; Meng y cols., 2006; Fehm y cols., 2007; Fehm y cols., 2009; Fhem y cols., 2010; Somlo y cols., 2011; Banys y cols., 2012;]. Basándose en este genotipo y fenotipo diferencial de las CTCs, hay varios trabajos que las han utilizado como diana terapéutica, por ejemplo: Meng y cols. (2004a) administraron trastuzumab a 4 pacientes con cáncer de mama cuyo tumor primario era HER2- pero sus CTCs aisladas presentaban amplificación del gen *ERBB2*, y obtuvieron una remisión completa de la enfermedad en uno de los casos y parcial en dos de ellos; Liu y cols. (2010) sometieron a una paciente con cáncer de mama, cuyas CTCs presentaban expresión de EGFR y su tumor primario no (solo el 2% lo expresaba), a una terapia con capecitabina y

lapatinib (anti-EGFR/HER2), tras la cual se monitorizó el nivel de CTCs que expresaban EGFR, y sus resultados mostraron como: en las primeras semanas, se produjo una disminución de 8 veces en el número de CTCs, además de una disminución del 50% del tumor; tras nueve semanas de tratamiento, no se detectaron CTCs y se produjo una reducción de las lesiones tumorales del 80%; tras 18 semanas de tratamiento aparece un aumento del marcador CA 15.3 y se detectan 2 CTCs EGFR-, y este resultado se mantuvo tras 30 y 42 semanas de tratamiento. Estos dos ensayos demuestran, cómo es posible utilizar la detección y caracterización, genética y fenotípica, de las CTCs para definir los tratamientos opcionales que pueden emplearse de forma personalizada en las pacientes con cáncer de mama y monitorizar el número de estas células, positivas para una diana específica, para comprobar la eficacia de dicha terapia.

Aunque la metodología descrita en el segundo trabajo experimental de esta tesis, se centra en la evaluación de *ERBB2/TOP2A/CEP17* en líneas celulares, se pueden emplear otras dianas de estudio con esta misma técnica. Por ejemplo, las pacientes con cáncer de mama NO que portan una delección 11q parece que pueden beneficiarse de una terapia basada en antraciclinas [Climent y cols., 2007].

3. **Utilidad clínica en cáncer de colon**

Para poder corroborar el valor clínico de la caracterización, genética y fenotípica, de las CTCs en muestras clínicas, se ha aplicado la metodología publicada en 2008 [Campos y cols., 2008] en una población de 33 pacientes con cáncer de colon no metastásico. Después de obtener que el 9,09% (3/33) de los pacientes presentaban CTCs en sus muestras sanguíneas, se enfocó el estudio en el paciente IN28, ya que sus CTCs presentaban características distintas al tumor primario, lo que podría indicar el valor pronóstico de la caracterización de estas células tumorales en la progresión tumoral.

El tumor primario del paciente IN28 (paciente en estadio II) era un adenocarcinoma infiltrativo sin nódulos linfáticos comprometidos y sin metástasis a distancia, que se caracterizó por: una marcación intensa para Ki67 y ciclina D1; una marcación difusa con intensidad moderada para MMP9 (dato no mostrado); una marcación, prácticamente, negativa para p53; y la no expresión de COX-2, MMP2 (datos no mostrados) y HER2 [Figura 4 del tercer trabajo experimental (*Capítulo 4. Resumen global de los resultados: Resultados del trabajo experimental del capítulo 3*)]. Los análisis FISH de las secciones del tumor primario demostraron disomía para el cromosoma 17 y para el gen *ERBB2*.

En este paciente se aislaron un total de 26 CK+/CTCs en sangre periférica. Estas células tumorales resultaron ser una población celular heterogénea, tanto para las características genéticas como fenotípicas estudiadas. Las CK+/CTCs presentaron dos patrones genéticos básicos: un patrón predominante (88,46%), que era trisómico para el cromosoma 17; y un patrón, menos común, que era disómico para este cromosoma

(11,54%). En general, ambas poblaciones de CK+/CTCs presentaron 2 copias para el gen *ERBB2* (80%), y no se detectó amplificación del mismo. En cuanto a sus características fenotípicas, y en contraste con los resultados obtenidos en el análisis genético, resultó que el 61,90% de las CK+/CTCs sobreexpresaba la proteína HER2, 63,33% si se tienen en cuenta las CK-/CTCs detectadas en la muestra, otra característica fenotípica de esta población de CTCs (variación de la expresión de las CKs estudiadas). La expresión de la proteína HER2, en estas CTCs, puede estar relacionada con la ploidía del cromosoma 17, como indican varios estudios realizados en cáncer de mama [Salido y cols., 2005; Ma y cols., 2005]. El hallazgo de una población, genética y fenotípicamente, heterogénea de CTCs en la misma muestra de sangre periférica, está en consonancia con los resultados obtenidos en pacientes metastásicos con cáncer de colon [Fehm y cols., 2002], próstata y mama [Fehm y cols., 2002; Mikolajczyk y cols., 2011]. El hecho de que las CTCs del paciente IN28 presenten sobreexpresión de la proteína HER2 (HER2+/CTCs), mientras que su tumor primario no lo haga, puede ser explicado porque estas CTCs provengan de un subclon de células tumorales inusual que no es fácilmente detectable en la biopsia del tumor primario. Aunque una explicación alternativa podría ser que las CTCs que expresan HER2 *de novo*, adquieren ventajas para metastatizar. Esta idea no es contradictoria con los datos que se barajan de cáncer de mama, donde se ha descrito como la sobreexpresión de HER2 puede ser adquirida durante la progresión tumoral: las CTCs pueden expresar HER2 aunque su tumor primario haya sido considerado HER2- [Meng y cols., 2004a; Fehm y cols., 2007; Fehm y cols., 2010]; y se ha comprobado que la detección de CTCs con HER2+ (HER2+/CTCs), está asociada a un peor pronóstico de la enfermedad [Wülfing y cols., 2006].

Indiscutiblemente, solo con los datos del tercer trabajo experimental no se puede concluir que los pacientes con cáncer de colon que presenten HER2+/CTCs deban ser tratados con trastuzumab (Herceptin). Sin embargo, existen antecedentes en cáncer de mama donde se han utilizado terapias dirigidas frente a CTCs, según la expresión de proteínas en la superficie de estas células [Meng y cols., 2004a; Liu y cols., 2010], que han obtenido resultados en la respuesta al tratamiento aplicado (como una respuesta completa, o parcial e incluso la disminución de las lesiones metastásicas) indicando que estas células se pueden utilizar con este fin. Actualmente, no existen estudios de este tipo en pacientes con cáncer de colon, por lo que solo podemos suponer una utilidad igual que en el caso de cáncer de mama.

En la actualidad, las características del tumor primario son el estándar más utilizado para la clasificación de pacientes y la toma de decisión del tratamiento que van a recibir. La terapia adyuvante estándar en cáncer colorrectal está basada en la asociación del 5-fluorouracilo con levamisole y/o leucovorin [Watanabe y cols., 2001; Chau y Cunningham, 2002]. La primera línea de tratamiento que se usa en los casos avanzados consiste en la asociación de la terapia adyuvante estándar con nuevas drogas más reactivas, como irinotecan, oxaliplatino y fluoropirimidinas orales [Benson, 2007; Comella y cols., 2009; Hebbar y cols., 2009]; y la combinación de estos tratamientos con anticuerpos monoclonales (Cetuximab o Bevacizumab) [Cunningham y cols., 2004; Hurwitz y cols., 2009].

Debemos tener en cuenta que la inestabilidad genética del tumor [Goel y cols., 2003; Grady, 2004; Samowitz y cols., 2007] hace que una fracción de células tumorales continúe mutando, dando lugar a variantes que son resistentes a los regímenes de terapia usados [Jhawer y cols., 2008; Jiang y cols., 2009]. Estas resistencias al tratamiento que aparecen hacen que se busquen nuevas terapias, lo más específicas posibles, por ejemplo aquellas que usan como diana alteraciones génicas específicas, como pueden ser:

- alteraciones en el protooncogen *C-MYC* (localizado en el cromosoma 8) que codifica un factor de transcripción y es una de las oncoproteínas más frecuentemente desreguladas en los tumores malignos [Facchini y Penn, 1998];
- alteraciones en *ERBB2* (localizado en el cromosoma 17), miembro de la familia EGFR, que es una diana común en cáncer de mama [Slamon y cols., 2001; Madarnas y cols., 2008]. Varias investigaciones han demostrado que este gen se encuentra sobreexpresado o amplificado en otros tipos de tumores, como: cáncer de pulmón, gástrico y colorrectal [Nathanson y cols., 2003; Takenaka y cols., 2011; Tsapralis y cols., 2012]; exactamente, del 3% al 14% de los tumores primarios colorrectales presentan sobreexpresión o amplificación de *ERBB2* [Nathanson y cols., 2003; Al-Kuraya y cols., 2007; Dursun y cols., 2001; Kavanagh y cols., 2009], y esto nos permitiría emplear terapias anti-HER2, como el trastuzumab y lapatinib, en esta subpoblación de pacientes [Kuwada y cols., 2004; Langer y cols., 2004; Park y cols., 2007; Tapia y cols., 2007; Al-Kuraya y cols., 2007; Kavanagh y cols., 2009; Kelly y cols., 2010; Javle y Hsueh, 2010;

Choi y cols., 2011; Morishita y cols., 2010]. De hecho, aunque no esté aprobado el uso de terapias anti-HER2 en pacientes con cáncer de colon, se están realizando estudios clínicos para evaluar la eficacia de estos tratamientos en la población de pacientes HER2+.

Los resultados obtenidos en esta tesis, junto con los de otros grupos de investigación [Meng y cols., 2004a; Meng y cols., 2006; Fehm y cols., 2007; Fehm y cols., 2010; Liu y cols., 2010], sugieren que el análisis patológico del tumor primario no debería ser el único estándar utilizado para aplicar un tratamiento específico tras la operación, ya que la caracterización, genética y fenotípica, de las CTCs aporta una información adicional a éste. De esta forma se podría combinar tanto la información ofrecida por el tumor primario como las CTCs, a la hora de la clasificación y la toma de decisión del tratamiento a seguir en pacientes con tumores sólidos epiteliales.

Según los resultados obtenidos en los pacientes con cáncer de colon se puede decir que:

- (i) La caracterización de las CTCs por la técnica FICTION, de forma individual, hecho que es importante debido a la heterogeneidad que presentan estas células, puede aportar información adicional a la obtenida por los métodos patológicos convencionales, y completar el diagnóstico de la enfermedad;
- (j) La triploidía del cromosoma 17 y la sobreexpresión de la proteína HER2, pueden aparecer en las CTCs de pacientes con cáncer de colon, en estadios tempranos.

En resumen, en esta tesis se presenta una metodología que inicialmente solo permitía el aislamiento y cuantificación de CTCs en sangre periférica de pacientes con tumores sólidos de origen epitelial [Gaforio y *cols.*, 2003], y que posteriormente fue modificada y permitió analizar estas células tumorales tanto genética como fenotípicamente de forma simultánea [Campos y *cols.*, 2008], sin la necesidad de destruir la membrana celular y realizar una relocalización de las células, lo que ocurre con la técnica FISH y se traduce en consumo de tiempo y pérdida de células evaluables. Además, se expone el valor pronóstico que tiene la detección de CTCs en pacientes con cáncer de mama, tanto sobre el tiempo libre de enfermedad como en la supervivencia global, y cómo la detección de estas células tumorales señala una población de pacientes con un mal pronóstico de la enfermedad en los que se incluyen pacientes cuyo tumor primario es ER+ [Gaforio y *cols.*, 2003]. Se incluyen además, los resultados preliminares de un estudio realizado en pacientes con cáncer de colon no metastásico donde, aunque parece que este marcador no tiene valor predictivo, el hecho de emplear una técnica tan versátil como la desarrollada en 2008 [Campos y *cols.*, 2008] ha permitido comprobar que las CTCs aportan información diferente y complementaria a la que ofrece el estudio anatomopatológico del tumor primario.

CONCLUSIONES

- I. Se ha desarrollado una metodología que permite de forma individualizada: aislar, cuantificar y estudiar, genética y fenotípicamente, las células tumorales circulantes (CTCs) en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama y cáncer de colon.
- II. La detección de CTCs en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama antes del tratamiento con quimioterapia puede identificar un subgrupo de pacientes con un peor pronóstico de la enfermedad.
- III. La detección de CTCs en sangre periférica de pacientes con cáncer de colon no metastásico, antes de la cirugía y del tratamiento con quimioterapia, no es un marcador pronóstico de la enfermedad. Pero hacen falta realizar más estudios para poder corroborar esta conclusión.
- IV. El análisis individualizado, de las características genéticas y fenotípicas, de las CTCs aisladas de sangre periférica, aporta información sobre el proceso metastásico. Lo que nos permite ofrecer información adicional al análisis patológico convencional del tumor.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

Utilidad pronóstica de la detección de CTCs en pacientes con tumores sólidos de origen epitelial.

Abraham BK, Fritz P, McClellan M, Hauptvogel P, Athellogou M and Brauch H. **Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis.** *Clin Cancer Res.* 2005;11(3):1154-9.

Administración de Drogas y Alimentos [Food and Drug Administration (FDA)]:
<http://www.fda.gov/default.htm>

AdnaGen:

http://www.adnagen.com/hosting_i24/daten/HTML_Dateien/e_products_tumor2.htm

Aerts J, Wynendaele W, Paridaens R, Christiaens MR, van den Bogaert W, van Oosterom AT and Vandekerckhove F. **A real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) to detect breast carcinoma cells in peripheral blood.** *Ann Oncol.* 2001;12(1):39-46.

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

Aichel O. **Über zellverschmelzung mit qualitativ abnormer chromosomenverteilung als ursache der geschwulstbildung.** In: Roux W, ed. *Vorträge und aufsätze über entwickelungsmechanik der organismen.* Leipzig: Wilhelm Engelmann, 1911:92-111.

Ajisaka H and Miwa K. **Micrometastases in sentinel nodes of gastric cancer.** *Br J Cancer.* 2003;89(4):676-80.

Aktas B, Müller V, Tewes M, Zeitz J, Kasimir-Bauer S, Loehberg CR, Rack B, Schneeweiss A and Fehm T. **Comparison of estrogen and progesterone receptor status of circulating tumor cells and the primary tumor in metastatic breast cancer patients.** *Gynecol Oncol.* 2011;122(2):356-60.

Aktas B, Tewes M, Fehm T, Hauch S, Kimmig R and Kasimir-Bauer S. **Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients.** *Breast Cancer Res.* 2009;11(4):R46.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ and Clarke MF. **Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(7):3983-8.

- Alix-Panabières C, Vendrell JP, Pellé O, Rebillard X, Riethdorf S, Müller V, Fabbro M and Pantel K. **Detection and characterization of putative metastatic precursor cells in cancer patients.** *Clin Chem.* 2007;53(3):537-9.
- Alix-Panabières C, Riethdorf S and Pantel K. **Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis.** *Clin Cancer Res.* 2008;14(16):5013-21.
- Al-Kuraya K, Novotny H, Bavi P, Siraj AK, Uddin S, Ezzat A, Sanea NA, Al-Dayel F, Al-Mana H, Sheikh SS, Mirlacher M, Tapia C, Simon R, Sauter G, Terracciano L and Tornillo L. **HER2, TOP2A, CCND1, EGFR and C-MYC oncogene amplification in colorectal cancer.** *J Clin Pathol.* 2007;60(7):768-72.
- Alonso A, Moreno S, Valiente A, Artigas M, Pérez-Juana A and Ramos Arroyo MA. **Genetic mechanisms in the hereditary predisposition to colorectal cancer.** *An Sist Sanit Navar.* 2006;29(1):59-76.
- Allgayer H, Heiss MM, Riesenberger R, Grützner KU, Tarabichi A, Babic R and Schildberg FW. **Urokinase plasminogen activator receptor (uPA-R): one potential characteristic of metastatic phenotypes in minimal residual tumor disease.** *Cancer Res.* 1997;57(7):1394-9.
- Andersson I, Aspegren K, Janzon L, Landberg T, Lindholm K, Linell F, Ljungberg O, Ranstam J and Sigfússon B. **Mammographic screening and mortality from breast cancer: the Malmö mammographic screening trial.** *BMJ.* 1988;297(6654):943-8.
- Antolovic D, Galindo L, Carstens A, Rahbari N, Büchler MW, Weitz J and Koch M. **Heterogeneous detection of circulating tumor cells in patients with colorectal cancer by immunomagnetic enrichment using different EpCAM-specific antibodies.** *BMC Biotechnol.* 2010;28:10:35.
- Antoniou AC, Pharoah PD, McMullan G, Day NE, Stratton MR, Peto J, Ponder BJ and Easton DF. **A comprehensive model for familial breast cancer incorporating BRCA1, BRCA2 and other genes.** *Br J Cancer.* 2002;86(1):76-83.
- Antoniou AC, Pharoah PDP, McMullan G, Day NE, Ponder BAJ and Easton D. **Evidence for further breast cancer susceptibility genes in addition to BRCA1 and BRCA2 in a population-based study.** *Genet Epidemiol.* 2001;21(1):1-18.

- Antoniou AC, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, Loman N, Olsson H, Johannsson O, Borg A, Pasini B, Radice P, Manoukian S, Eccles DM, Tang N, Olah E, Anton-Culver H, Warner E, Lubinski J, Gronwald J, Gorski B, Tulinius H, Thorlacius S, Eerola H, Nevanlinna H, Syrjäkoski K, Kallioniemi OP, Thompson D, Evans C, Peto J, Lalloo F, Evans DG and Easton DF. **Average risks of breast and ovarian cancer associated with *BRCA1* or *BRCA2* mutations detected in case series unselected for family history: A combined analysis of 22 studies.** *Am J Hum Genet.* 2003;72:1117-30.
- Ashworth TR. **A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death.** *Aus Med J.* 1869;14:146-9.
- Austoker J and Hewitson P. **Screening for colorectal cancer.** *BMJ.* 2008;337:a2207. doi:10.1136/bmj.a2207.
- Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Ding S, Byrd DR, Cascinelli N, Cochran AJ, Coit DG, Eggermont AM, Johnson T, Kirkwood JM, Leong SP, McMasters KM, Mihm MC Jr, Morton DL, Ross MI and Sondak VK. **Multivariate analysis of prognostic factors among 2,313 patients with stage III melanoma: comparison of nodal micrometastases versus macrometastases.** *J Clin Oncol.* 2010;28(14):2452-9.
- Balic M, Lin H, Young L, Hawes D, Giuliano A, McNamara G, Datar RH and Cote RJ. **Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype.** *Clin Cancer Res.* 2006;12(19):5615-21.
- Balmain A, Gray J and Ponder B. **The genetics and genomics of cancer.** *Nat Genet.* 2003;33:238-44.
- Banys M, Krawczyk N, Becker S, Jakubowska J, Staebler A, Wallwiener D, Fehm T and Rothmund R. **The influence of removal of primary tumor on incidence and phenotype of circulating tumor cells in primary breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat.* 2012;132(1):121-9.
- Becker S, Becker-Pergola G, Fehm T, Wallwiener D and Solomayer EF. **Her2 expression on disseminated tumor cells from bone marrow of breast cancer patients.** *Anticancer Res.* 2005;25(3B):2171-5.

- Becker S, Becker-Pergola G, Wallwiener D, Solomayer EF and Fehm T. **Detection of cytokeratin-positive cells in the bone marrow of breast cancer patients undergoing adjuvant therapy.** *Breast Cancer Res Treat.* 2006;97(1):91-6.
- Bednarz-Knoll N, Alix-Panabières C and Pantel K. **Clinical relevance and biology of circulating tumor cells.** *Breast Cancer Res.* 2011;13(6):228.
- Beiske K, Burchill SA, Cheung IY, Hiyama E, Seeger RC, Cohn SL, Pearson AD and Matthay KK; International Neuroblastoma Risk Group Task Force. **Consensus criteria for sensitive detection of minimal neuroblastoma cells in bone marrow, blood and stem cell preparations by immunocytology and QRT-PCR: Recommendations by the International Neuroblastoma Risk Group Task Force.** *Br J Cancer.* 2009;100(10):1627-37.
- Beitsch PD and Clifford E. **Detection of carcinoma cells in the blood of breast cancer patients.** *Am J Surg.* 2000;180(6):446-9.
- Belinsky SA, Klinge DM, Dekker JD, Smith MW, Bocklage TJ, Gilliland FD, Crowell RE, Karp DD, Stidley CA and Picchi MA. **Gene promoter methylation in plasma and sputum increases with lung cancer risk.** *Clin Cancer Res.* 2005;11(18):6505-11.
- Benoy IH, Elst H, Van der Auwera I, Van Laere S, van Dam P, Van Marck E, Scharpé S, Vermeulen PB and Dirix LY. **Real-time RT-PCR correlates with immunocytochemistry for the detection of disseminated epithelial cells in bone marrow aspirates of patients with breast cancer.** *Br J Cancer.* 2004;91(10):1813-20.
- Benson AB. **New Approaches to assessing and treating early-stage colon and rectal cancers: Cooperative group strategies for assessing optimal approaches in early-stage disease.** *Clin Cancer Res.* 2007;13(22):6913-20.
- Bergman J, Reznicek RC and Rajfer J. **Surveillance of patients with bladder carcinoma using fluorescent *in-situ* hybridization on bladder washings.** *BJU Int.* 2008;101(1):26-9.
- Bian Y, Caldes T, Wijnen J, Franken P, Vasen H, Kaklamani V, Nafa K, Peterlongo P, Ellis N, Baron JA, Burn J, Moeslein G, Morrison PJ, Chen Y, Ahsan H, Watson P, Lynch HT, de la Chapelle A, Fodde R and Pasche B. **TGFB β 1*6A may contribute to hereditary colorectal cancer.** *J Clin Oncol.* 2005;23(13):3074-8.

- Bidard FC, Mathiot C, Delaloge S, Brain E, Giachetti S, de Cremoux P, Marty M and Pierga JY. **Single circulating tumor cell detection and overall survival in nonmetastatic breast cancer.** *Ann Oncol.* 2010;21(4):729-33.
- Bidard FC, Vincent-Salomon A, Gomme S, Nos C, de Rycke Y, Thiery JP, Sigal-Zafrani B, Mignot L, Sastre-Garau X and Pierga JY; Institut Curie Breast Cancer Study Group. **Disseminated tumor cells of breast cancer patients: a strong prognostic factor for distant and local relapse.** *Clin Cancer Res.* 2008b;14(11):3306-11.
- Bidard FC, Vincent-Salomon A, Sigal-Zafrani B, Diéras V, Mathiot C, Mignot L, Thiery JP, Sastre-Garau X and Pierga JY. **Prognosis of women with stage IV breast cancer depends on detection of circulating tumor cells rather than disseminated tumor cells.** *Ann Oncol.* 2008a;19(3):496-500.
- Bilchik AJ and Compton C. **Close collaboration between surgeon and pathologist is essential for accurate staging of early colon cancer.** *Ann Surg.* 2007;245(6):864-6.
- Bilchik AJ, DiNome M, Saha S, Turner RR, Wiese D, McCarter M, Hoon DS and Morton DL. **Prospective multicenter trial of staging adequacy in colon cancer: preliminary results.** *Arch Surg.* 2006;141(6):527-34.
- Bilchik AJ, Hoon DS, Saha S, Turner RR, Wiese D, DiNome M, Koyanagi K, McCarter M, Shen P, Iddings D, Chen SL, Gonzalez M, Elashoff D and Morton DL. **Prognostic impact of micrometastases in colon cancer: interim results of a prospective multicenter trial.** *Ann Surg.* 2007;246(4):568-77.
- Bilchik AJ, Saha S, Wiese D, Stonecypher JA, Wood TF, Sostrin S, Turner RR, Wang HJ, Morton DL and Hoon DS. **Molecular staging of early colon cancer on the basis of sentinel node analysis: a multicenter phase II trial.** *J Clin Oncol.* 2001;19(4):1128-36.
- Bischoff J, Rosenberg R, Dahm M, Janni W and Gutschow K. **Minimal residual disease in bone marrow and peripheral blood of patients with metastatic breast cancer.** *Recent Results Cancer Res.* 2003;162:135-40.
- Bonnet D and Dick JE. **Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell.** *Nat Med.* 1997;3(7):730-7.

- Borgen E, Naume B, Nesland JM, Nowels KW, Pavlak N, Ravkin I and Goldbard S. **Use of automated microscopy for the detection of disseminated tumor cells in bone marrow samples.** *Cytometry*. 2001;46(4):215-21.
- Borgen E, Pantel K, Schlimok G, Müller P, Otte M, Renolen A, Ehnle S, Coith C, Nesland JM and Naume B. **A European interlaboratory testing of three well-known procedures for immunocytochemical detection of epithelial cells in bone marrow. Results from analysis of normal bone marrow.** *Cytometry B Clin Cytom*. 2006;70(6):400-9.
- Bos PD, Zhang XHF, Nadal C, Shu W, Gomis RR, Nguyen DX, Minn AJ, Van de Vijver M, Gerald W, Foekens JA and Massagué J. **Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain.** *Nature*. 2009;459(7249):1005-9.
- Bozionellou V, Mavroudis D, Perraki M, Papadopoulos S, Apostolaki S, Stathopoulos E, Stathopoulou A, Lianidou E and Georgoulas V. **Trastuzumab administration can effectively target chemotherapy-resistant Cytokeratin-19 messenger RNA-positive tumor cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer.** *Clin Cancer Res*. 2004;10(24):8185-94.
- Braun S and Pantel K. **Micrometastatic bone marrow involvement: Detection and prognostic significance.** *Med Oncol*. 1999;16(3):154-65.
- Braun S, Cevatli BS, Assemi C, Janni W, Kantenich CR, Schindlbeck C, Rjosk D and Hepp F. **Comparative analysis of micrometastasis to the bone marrow and lymph nodes of node-negative breast cancer patients receiving no adjuvant therapy.** *J Clin Oncol*. 2001a;19(5):1468-75.
- Braun S, Pantel K, Müller P, Janni W, Hepp F, Kantenich CR, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmüller G and Schlimok G. **Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer.** *N Engl J Med*. 2000;342(8):525-33.
- Braun S, Schindlbeck C, Hepp F, Janni W, Kantenich C, Riethmüller G and Pantel K. **Occult tumor cells in bone marrow of patients with locoregionally restricted ovarian cancer predict early distant metastatic relapse.** *J Clin Oncol*. 2001b;19(2):368-75.

- Braun S, Schlimok G, Heumos I, Schaller G, Riethdorf L, Riethmüller G and Pantel K. **erbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I–III breast cancer patients.** *Cancer Res.* 2001c;61:1890-5.
- Brugger W, Bühring HJ, Grünebach F, Vogel W, Kaul S, Müller R, Brümmendorf TH, Ziegler BL, Rappold I, Brossart P, Scheduling S and Kanz L. **Expression of MUC-1 epitopes on normal bone marrow: implications for the detection of micrometastatic tumor cells.** *J Clin Oncol.* 1999;17(5):1535-44.
- Bubendorf L, Grilli B, Sauter G, Mihatsch MJ, Gasser TC and Dalquen P. **Multiprobe FISH for enhanced detection of bladder cancer in voided urine specimens and bladder washings.** *Am J Clin Pathol.* 2001;116(1):79-86.
- Buchner A, Riesenberger R, Kotter I, Hofstetter A, Stief C and Oberneder R. **Frequency and prognostic relevance of disseminated tumor cells in bone marrow of patients with metastatic renal cell carcinoma.** *Cancer.* 2006;106(7):1514-20.
- Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, Stopeck A, Borden E, Miller MC, Matera J, Repollet M, Doyle GV, Terstappen LW and Hayes DF. **Circulating tumor cells versus imaging- Predicting overall survival in metastatic breast cancer.** *Clin Caner Res.* 2006;12(21):6403-9.
- Buergy D, Fuchs T, Kambakamba P, Mudduluru G, Maurer G, Post S, Tang Y, Nakada MT, Yan L and Allgayer H. **Prognostic impact of extracellular matrix metalloprotease inducer: Immunohistochemical analyses of colorectal tumors and immunocytochemical screening of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with gastrointestinal cancer.** *Cancer.* 2009;115(20):4667-78.
- Cabanas RM. **An approach for the treatment of penile carcinoma.** *Cancer.* 1977;39(2):456-66.
- Calistri D, Rengucci C, Bocchini R, Saragoni L, Zoli W and Amadori D. **Fecal multiple molecular tests to detect colorectal cancer in stool.** *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2003;1(5):377-83.
- Camara O, Kavallaris A, Nöschel H, Rengsberger M, Jörke C and Pachmann K. **Seeding of epithelial cells into circulation during surgery for breast cancer: the fate of malignant and benign mobilized cells.** *World J Surg Oncol.* 2006;4:67.

- Camara O, Rengsberger M, Egbe A, Koch A, Gajda M, Hammer U, Jörke C, Rabenstein C, Untch M and Pachmann K. **The relevance of circulating epithelial tumor cells (CETC) for therapy monitoring during neoadjuvant (primary systemic) chemotherapy in breast cancer.** *Ann Oncol.* 2007;18(9):1484-92.
- Campos M, Prior C, Warleta F, Zudaire I, Ruíz-Mora J, Catena R, Calvo A and Gaforio JJ. **Phenotypic and genetic characterization of circulating tumor cells by combining immunomagnetic selection and FICTION techniques.** *J Histochem Cytochem.* 2008;56(7):667-75.
- Cao S, Li Y, Li J, Li CF, Zhang W, Yang ZQ and Meng SD. **Quantitative determination of HER2 expression by confocal microscopy assay in CTCs of breast cancer.** *Oncol Rep.* 2010;23(2):423-8.
- Claus EB, Petruzella S, Matloff E and Carter D. **Prevalence of *BRCA1* and *BRCA2* mutations in women diagnosed with ductal carcinoma *in situ*.** *JAMA.* 2005;293(8):964-9.
- Claus EB, Rish N and Thompson WD. **Genetic analysis of breast cancer in the Cancer and Steroid Hormone Study.** *Am J Hum Genet.* 1991;48:232-42.
- Climent J, Dimitrow P, Fridlyand J, Palacios J, Siebert R, Albertson DG, Gray JW, Pinkel D, Lluch A and Martinez-Climent JA. **Deletion of chromosome 11q predicts response to Anthracycline-based chemotherapy in early breast cancer.** *Cancer Res.* 2007;67(2):818-26.
- Clinical Outcomes of Surgical Therapy Study Group. **A comparison of laparoscopically assisted and open colectomy for colon cancer.** *N Engl J Med.* 2004;350(20):2050-9.
- Cohen AM, Kelsen D, Saltz L, Minsky BD, Nelson H, Farouk R, Gunderson LL, Michelassi F, Arenas RB, Schilsky RL and Willet CG. **Adjuvant therapy for colorectal cancer.** *Curr Probl Surg.* 1997;34(8):601-76.
- Cohen SJ, Alpaugh RK, Gross S, O'Hara SM, Smirnov DA, Terstappen LW, Allard WJ, Bilbee M, Cheng JD, Hoffman JP, Lewis NL, Pellegrino A, Rogatko A, Sigurdson E, Wang H, Watson JC, Weiner LM and Meropol NJ. **Isolation and characterization of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer.** *Clin Colorectal Cancer.* 2006;6(2):125-32.

- Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, Picus J, Morse M, Mitchell E, Miller MC, Doyle GV, Tissing H, Terstappen LW and Meropol NJ. **Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer.** *J Clin Oncol.* 2008;26(19):3213-21.
- Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, Picus J, Morse MA, Mitchell E, Miller MC, Doyle GV, Tissing H, Terstappen LW and Meropol NJ. **Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer.** *Ann Oncol.* 2009;20(7):1223-9.
- Cohnheim J. **Vorlesungen über allgemeine Pathologie.** A Hirschwald, Berlin, 1877.
- Colleoni M, Rotmensz N, Peruzzotti G, Maisonneuve P, Mazzarol G, Pruneri G, Luini A, Intra M, Veronesi P, Galimberti V, Torrissi R, Cardillo A, Goldhirsch A and Viale G. **Size of breast cancer metastases in axillary lymph nodes: Clinical relevance of minimal lymph node involvement.** *J Clin Oncol.* 2005;23(7):1379-89.
- Comella P, Casaretti R, Sandomenico C, Avallone A and Franco L. **Role of Oxaliplatin in the treatment of colorectal cancer.** *Therapeut Clin Risk Manag.* 2009;5(1):229-38.
- Comité Conjunto Americano del Cáncer (American Joint Committee on Cancer): <http://www.cancerstaging.org/>
- Conzelmann M, Linnemann U and Berger MR. **K-ras codon 12 and 13 mutations are correlated with differential patterns of tumor cell dissemination in colorectal cancer patients.** *Int J Oncol.* 2004;24(6):1537-44.
- Cornfield D, Liu Z, Gorczyca W and Weisberger J. **The potential role of flow cytometry in the diagnosis of small cell carcinoma.** *Arch Pathol Lab Med.* 2003;127(4):461-4.
- Corradini P, Voena C, Astolfi M, Delloro S, Pilotti S, Arrigoni G, Bregni M, Pileri A and Gianni AM. **Maspin and mamaglobin genes are specific markers for RT-PCR detection of minimal residual disease in patients with breast cancer.** *Ann Oncol.* 2001;12(12):1693-8.
- Costa SD, Lange S, Klinga K, Merkle E and Kaufmann M. **Factors influencing the prognostic role of oestrogen and progesterone receptor levels in breast cancer-results of the analysis of 670 patients with 11 years of follow-up.** *Eur J Cancer.* 2002;38(10):1329-34.

Cristofanilli M and Mendelsohn J. **Circulating tumor cells in breast cancer: Advanced tools for "tailored" therapy?**. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(46):17073-4.

Cristofanilli M, Broglio KR, Guarneri V, Jackson S, Fritsche HA, Islam R, Dawood S, Reuben JM, Kau SW, Lara JM, Krishnamurthy S, Ueno NT, Hortobagyi GN and Valero V. **Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: Biologic staging beyond tumor burden**. *Clin Breast Cancer*. 2007;7(6):471-9.

Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW and Hayes DF. **Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer**. *N Engl J Med*. 2004;351(8):781-91.

Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, Doyle GV, Matera J, Allard WJ, Miller MC, Fritsche HA, Hortobagyi GN and Terstappen LW. **Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer**. *J Clin Oncol*. 2005;23(7):1420-30.

Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I and Van Cutsem E. **Cetuximab monotherapy and Cetuximab plus Irinotecan in Irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer**. *New Engl J Med*. 2004;351(14):337-45.

Chau I and Cunningham D. **Chemotherapy in colorectal cancer: New options and new challenges**. *Brit Med Bull*. 2002;64:159-80.

Chen BT, Loberg RD, Neeley CK, O'Hara SM, Gross S, Doyle G, Dunn RL, Kalikin LM and Pienta KJ. **Preliminary study of immunomagnetic quantification of circulating tumor cells in patients with advanced disease**. *Urology*. 2005;65(3):616-21.

Chen GD, Fachin F, Fernandez-Suarez M, Wardle BL and Toner M. **Nanoporous elements in microfluidics for multiscale manipulation of bioparticles**. *Small*. 2011;7(8):1061-7.

Chen XQ, Bonnefoi H, Pelte MF, Lyautey J, Lederrey C, Movarekhi S, Schaeffer P, Mulcahy HE, Meyer P, Stroun M and Anker P. **Telomerase RNA as a detection marker in the serum of breast cancer patients**. *Clin Cancer Res*. 2000;6(10):3823-6.

- Chen Y, Zou TN, Wu ZP, Zhou YC, Gu YL, Liu X, Jin CG and Wang XC. **Detection of cytokeratin 19, human mammaglobin, 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.
- Cho EH, Wendel M, Luttgen M, Yoshioka C, Marrinucci D, Lazar D, Schram E, Nieva J, Bazhenova L, Morgan A, Ko AH, Korn WM, Kolatkar A, Bethel K and Kuhn P. **Characterization of circulating tumor cell aggregates identified in patients with epithelial tumors.** *Phys Biol.* 2012;9(1):016001.
- Choesmel V, Anract P, Høifødt H, Thiery JP and Blin N. **A relevant immunomagnetic assay to detect and characterize epithelial cell adhesion molecule-positive cells in bone marrow from patients with breast carcinoma: immunomagnetic purification of micrometastases.** *Cancer.* 2004a;101(4):693-703.
- Choesmel V, Pierga JY, Nos C, Vincent-Salomon A, Sigal-Zafrani B, Thiery JP and Blin N. **Enrichment methods to detect bone marrow micrometastases in breast carcinoma patients: Clinical relevance.** *Breast Cancer Res.* 2004b;6(5):R556-70.
- Choi JH, Han HS, Lee HC, Lee OJ, Kim JT, Lim SN, Lee KH and Kim ST. **Positive response to trastuzumab in a case of HER2-overexpressing metastatic gastric cancer that presented as severe thrombocytopenia.** *Onkologie.* 2011;34(11):621-4.
- Choi SH, Barsky SH and Chang HR. **Clinicopathologic analysis of sentinel lymph node mapping in early breast cancer.** *Breast J.* 2003;9(3):153-62.
- Chu P, We E and Weiss LM. **Cytokeratin 7 and Cytokeratin 20 expression in epithelial neoplasm: A survey of 435 cases.** *Modern Pathol.* 2000;13(9):962-72.
- Danila DC, Heller G, Gignac GA, Gonzalez-Espinoza R, Anand A, Tanaka E, Lilja H, Schwartz L, Larson S, Fleisher M and Scher HI. **Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer.** *Clin Cancer Res.* 2007;13(23):7053-8.
- Dawood S, Broglio K, Valero V, Reuben J, Handy B, Islam R, Jackson S, Hortobagyi GN, Fritsche H and Cristofanilli M. **Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: from prognostic stratification to modification of the staging system?.** *Cancer.* 2008;113(9):2422-30.

- Day N and Warren R. **Mammographic screening and mammographic patterns.** *Breast Cancer Res.* 2000;2(4):247-51.
- de Boer M, van Deurzen CH, van Dijck JA, Borm GF, van Diest PJ, Adang EM, Nortier JW, Rutgers EJ, Seynaeve C, Menke-Pluymers MB, Bult P and Tjan-Heijnen VC. **Micrometastases or isolated tumor cells and the outcome of breast cancer.** *N Engl J Med.* 2009;361(7):653-63.
- de Boer M, van Dijck JA, Bult P, Borm GF and Tjan-Heijnen VC. **Breast cancer prognosis and occult lymph node metastases, isolated tumor cells, and micrometastases.** *J Natl Cancer Inst.* 2010;102(6):410-25.
- de Bono JS, Attard G, Adjei A, Pollak MN, Fong PC, Haluska P, Roberts L, Melvin C, Repollet M, Chianese D, Connely M, Terstappen LW and Gualberto A. **Potential applications of circulating tumor cells expressing the Insulin-like growth factor-I receptor.** *Clin Cancer Res.* 2007;13(12):3611-6.
- de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, Doyle GV, Terstappen LW, Pienta KJ and Raghavan D. **Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer.** *Clin Cancer Res.* 2008;14(19):6302-9.
- de Cremoux P, Extra JM, Denis MG, Pierga JY, Boustyn E, Nos C, Clough KB, Boudou E, Martin EC, Müller A, Pouillart P and Magdelénat H. **Detection of MUC1-expressing mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients by real-time polymerase chain reaction.** *Clin Cancer Res.* 2000;6(8):3117-22.
- de Jong MM, Nolte IM, te Meerman GJ, van der Graaf WT, de Vries EG, Sijmons RH, Hofstra RM and Kleibeuker JH. **Low-penetrance genes and their involvement in colorectal cancer susceptibility.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002;11(11):1332-52.
- Delage R, Soiffer RJ, Dear K and Ritz J. **Clinical significance of bcr-abl gene rearrangement detected by polymerase chain reaction after allogeneic bone marrow transplantation in chronic myelogenous leukemia.** *Blood.* 1991;78(10):2759-67.

- Deng G, Herrler M, Burgess D, Manna E, Krag D and Burke JF. **Enrichment with anti-cytokeratin alone or combined with anti-EpCAM antibodies significantly increases the sensitivity for circulating tumor cell detection in metastatic breast cancer patients.** *Breast Cancer Res.* 2008;10(4):R69.
- Denninghoff VC, Kahn AG, Falco J, Curutchet HP and Elsner B. **Sentinel lymph node: Detection of micrometastases of melanoma in a molecular study.** *Mol Diagn.* 2004;8(4):253-8.
- Dettori T, Frau DV, Lai ML, Mariotti S, Uccheddu A, Daniele GM, Tallini G, Faa G and Vanni R. **Aneuploidy in oncocytic lesions of the thyroid gland: Diffuse accumulation of mitochondria within the cell is associated with trisomy 7 and progressive numerical chromosomal alterations.** *Genes Chromosomes Cancer.* 2003;38(1):22-31.
- Diel IJ and Cote RJ. **Bone marrow and lymph node assessment for minimal residual disease in patients with breast cancer.** *Cancer Treat Rev.* 2000;26(1):53-65.
- Dieterle CP, Conzelmann M, Linnemann U and Berger MR. **Detection of isolated tumor cells by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for *K-ras* mutations in tissue samples of 199 colorectal cancer patients.** *Clin Cancer Res.* 2004;10(2):641-50.
- Dimmler A, Gerhards R, Betz C, Günther K, Reingruber B, Horbach T, Baumann I, Kirchner T, Hohenberger W and Papadopoulos T. **Transcription of cytokeratins 8, 18, and 19 in bone marrow and limited expression of cytokeratins 7 and 20 by carcinoma cells: Inherent limitations for RT-PCR in the detection of isolated tumor cells.** *Laboratory Investigation.* 2001;81(10):1351-61.
- Dirix L, Van Dam P and Vermeulen P. **Genomics and circulating tumor cells: Promising tools for choosing and monitoring adjuvant therapy in patients with early breast cancer?.** *Curr Opin Oncol.* 2005;17(6):551-8.
- Dong SM, Traverso G, Johnson C, Geng L, Favis R, Boynton K, Hibi K, Goodman SN, D'Allesio M, Paty P, Hamilton SR, Sidransky D, Barany F, Levin B, Shuber A, Kinzler KW, Vogelstein B and Jen J. **Detecting colorectal cancer in stool with the use of multiple genetic targets.** *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(11):858-65.

- Doubrovsky A, De Wilt JH, Scolyer RA, McCarthy WH and Thompson JF. **Sentinel node biopsy provides more accurate staging than elective lymph node dissection in patients with cutaneous melanoma.** *Ann Surg Oncol.* 2004;11(9):829-36.
- Dursun A, Poyraz A, Süer O, Sezer C and Akyol G. **Expression of Bcl-2 and c-ErbB-2 in colorectal neoplasia.** *Pathol Oncol Res.* 2001;7(1):24-27.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. **Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: Meta-analysis of individual patient data for 10 801 women in 17 randomised trials.** *Lancet.* 2011;378(9804):1707-16.
- Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, Pharoah PD, Thompson D, Ballinger DG, Struewing JP, Morrison J, Field H, Luben R, Wareham N, Ahmed S, Healey CS, Bowman R; SEARCH collaborators, Meyer KB, Haiman CA, Kolonel LK, Henderson BE, Le Marchand L, Brennan P, Sangrajrang S, Gaborieau V, Odefrey F, Shen CY, Wu PE, Wang HC, Eccles D, Evans DG, Peto J, Fletcher O, Johnson N, Seal S, Stratton MR, Rahman N, Chenevix-Trench G, Bojesen SE, Nordestgaard BG, Axelsson CK, Garcia-Closas M, Brinton L, Chanock S, Lissowska J, Peplonska B, Nevanlinna H, Fagerholm R, Eerola H, Kang D, Yoo KY, Noh DY, Ahn SH, Hunter DJ, Hankinson SE, Cox DG, Hall P, Wedren S, Liu J, Low YL, Bogdanova N, Schürmann P, Dörk T, Tollenaar RA, Jacobi CE, Devilee P, Klijn JG, Sigurdson AJ, Doody MM, Alexander BH, Zhang J, Cox A, Brock IW, MacPherson G, Reed MW, Couch FJ, Goode EL, Olson JE, Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Uitterlinden A, Rivadeneira F, Milne RL, Ribas G, Gonzalez-Neira A, Benitez J, Hopper JL, McCredie M, Southey M, Giles GG, Schroen C, Justenhoven C, Brauch H, Hamann U, Ko YD, Spurdle AB, Beesley J and Chen X; kConFab; AOCS Management Group, Mannermaa A, Kosma VM, Kataja V, Hartikainen J, Day NE, Cox DR and Ponder BA. **Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci.** *Nature.* 2007;447(7148):1087-93.
- Effenberger KE, Borgen E, Eulenburger CZ, Bartkowiak K, Grosser A, Synnestvedt M, Kaaresen R, Brandt B, Nesland JM, Pantel K and Naume B. **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.

- Eide MB, Liestøl K, Lingjaerde OC, Hystad ME, Kresse SH, Meza-Zepeda L, Myklebost O, Trøen G, Aamot HV, Holte H, Smeland EB and Delabie J. **Genomic alterations reveal potential for higher grade transformation in follicular lymphoma and confirm parallel evolution of tumor cell clones.** *Blood*. 2010;116(9):1489-97.
- Engel H, Kleespies C, Friedrich F, Breidenbach M, Kallenborn A, Schöndorf T, Kolhagen H and Mallmann P. **Detection of circulating tumour cells in patients with breast or ovarian cancer by molecular cytogenetics.** *Brit J Cancer*. 1999;81(7):1165-73.
- Engell HC. **Cancer cells in the blood; a five to nine year follow up study.** *Ann Surg*. 1959;149(4):457-61.
- Engell HC. **Cancer cells in the circulating blood; a clinical study on the occurrence of cancer cells in the peripheral blood and in venous blood draining the tumour area at operation.** *Acta Chir Scand Suppl*. 1955;201:1-70.
- English D and Andersen BR. **Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque.** *J Immunol Methods*. 1974;5(3):249-52.
- Ewing J. **Neoplastic diseases: A treatise on tumors.** 1928. Editorial: WB Saunders Co. (Philadelphia) 3^a ed.
- Fabisiewicz A, Kulik J, Kober P, Brewczyńska E, Pieńkowski T and Siedlecki JA. **Detection of circulating breast cancer cells in peripheral blood by a two-marker reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay.** *Acta Biochim Pol*. 2004;51(3):747-55.
- Facchini LM and Penn LZ. **The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights.** *FASEB J*. 1998;12(9):633-51.
- Fackler MJ, Malone K, Zhang Z, Schilling E, Garrett-Mayer E, Swift-Scanlan T, Lange J, Nayar R, Davidson NE, Khan SA and Sukumar S. **Quantitative multiplex methylation-specific PCR analysis doubles detection of tumor cells in breast ductal fluid.** *Clin Cancer Res*. 2006;12(11 Pt 1):3306-10.
- Fan T, Zhao Q, Chen JJ, Chen WT and Pearl ML. **Clinical significance of circulating tumor cells detected by an invasion assay in peripheral blood of patients with ovarian cancer.** *Gynecol Oncol*. 2009;112(1):185-91.

- Fearon EF and Vogelstein B. **A genetic model for colorectal tumorigenesis.** *Cell.* 1990;61:759-67.
- Fehm T, Becker S, Becker-Pergola G, Sotlar K, Gebauer G, Dürr-Störzer S, Neubauer H, Wallwiener D and Solomayer EF. **Presence of apoptotic and nonapoptotic disseminated tumor cells reflects the response to neoadjuvant systemic therapy in breast cancer.** *Breast Cancer Res.* 2006;8(5):R60.
- Fehm T, Becker S, Duerr-Stoerzer S, Sotlar K, Mueller V, Wallwiener D, Lane N, Solomayer E and Uhr J. **Determination of HER2 status using both serum HER2 levels and circulating tumor cells in patients with recurrent breast cancer whose primary tumor was HER2 negative or of unknown HER2 status.** *Breast Cancer Res.* 2007;9(5):R74.
- Fehm T, Hoffmann O, Aktas B, Becker S, Solomayer EF, Wallwiener D, Kimmig R and Kasimir-Bauer S. **Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by RT-PCR and comparison to status of bone marrow disseminated cells.** *Breast Cancer Res.* 2009;11(4):R59.
- Fehm T, Krawczyk N, Solomayer EF, Becker-Pergola G, Dürr-Störzer S, Neubauer H, Seeger H, Staebler A, Wallwiener D and Becker S. **ERalpha-status of disseminated tumour cells in bone marrow of primary breast cancer patients.** *Breast Cancer Res.* 2008;10(5):R76.
- Fehm T, Müller V, Aktas B, Janni W, Schneeweiss A, Stickeler E, Lattrich C, Löhberg CR, Solomayer E, Rack B, Riethdorf S, Klein C, Schindlbeck C, Brocker K, Kasimir-Bauer S, Wallwiener D and Pantel K. **HER2 status of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: A prospective, multicenter trial.** *Breast Cancer Res Treat.* 2010;124(2):403-12.
- Fehm T, Sagalowsky A, Clifford E, Beitsch P, Saboorian H, Euhus D, Meng S, Morrison L, Tucker T, Lane N, Ghadimi, Heselmeyer-Haddad K, Ried T, Rao C and Uhr J. **Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant.** *Clin Cancer Res.* 2002;8:2073-84.
- Felton T, Harris GC, Pinder SE, Snead DR, Carter GI, Bell JA, Haines A, Kollias J, Robertson JF, Elston CW and Ellis IO. **Identification of carcinoma cells in peripheral blood samples of patients with advanced breast carcinoma using RT-PCR amplification of CK7 and MUC1.** *Breast.* 2004;13(1):35-41.

- Fisher CJ, Egan MK, Smith P, Wicks K, Millis RR and Fentiman IS. **Histopathology of breast cancer in relation to age.** *Br J Cancer.* 1997;75(4):593-6.
- Fokas E, Engenhart-Cabillic R, Daniilidis K, Rose F and An HX. **Metastasis: the seed and soil theory gains identity.** *Cancer Metastasis Rev.* 2007;26(3-4):705-15.
- Foote F and Stewart F. **Lobular carcinoma *in situ*: a rare form of mammary cancer.** *Am J Pathol.* 1941;17:491-6.
- Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, Bishop DT, Weber B, Lenoir G, Chang-Claude J, Sobol H, Teare MD, Struewing J, Arason A, Scherneck S, Peto J, Rebbeck TR, Tonin P, Neuhausen S, Barkardottir R, Eyfjord J, Lynch H, Ponder BAJ, Gayther SA, Birch JM, Lindblom A, Stoppa-Lyonnet D, Bignon Y, Borg A, Hamann U, Haites N, Scott RJ, Maugard CM, Vasen H, Seitz S, Cannon-Albright LA, Schofield A, Zelada-Hedman M and the Breast Cancer Linkage Consortium. **Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the *BRCA1* and *BRCA2* genes in breast cancer families.** *Am J Hum Genet.* 1998;62:676-89.
- Forozan F, Mahlamäki EH, Monni O, Chen Y, Veldman R, Jiang Y, Gooden GC, Ethier SP, Kallioniemi A and Kallioniemi OP. **Comparative genomic hybridization analysis of 38 breast cancer cell lines: A basis for interpreting complementary DNA microarray data.** *Cancer Res.* 2000;60(16):4519-25.
- Friedl P. **Cell fusion: New mechanisms of plasticity in cancer?.** *Lancet Oncol.* 2005;6(12):916-8.
- Funasako Y, Uenosono Y, Hirata M, Arigami T, Yanagita S, Arima H, Ehi K, Kijima Y, Yoshinaka H and Natsugoe S. **Utility of the GeneSearch breast lymph node assay for the rapid evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer.** *Cancer.* 2010;116(19):4450-5.
- Fung TT, Hu FB, Holmes MD, Rosner BA, Hunter DJ, Colditz GA and Willett WC. **Dietary patterns and the risk of postmenopausal breast cancer.** *Int J Cancer.* 2005;116(1):116-21.
- Fusi A, Liu Z, Kümmerlen V, Nonnemacher A, Jeske J and Keilholz U. **Expression of chemokine receptors on circulating tumor cells in patients with solid tumors.** *J Transl Med.* 2012;10:52.

- Gaforio JJ, Serrano MJ, Sanchez-Rovira P, Sirvent A, Delgado-Rodriguez M, Campos M, de la Torre N, Algarra I, Dueñas R and Lozano A. **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(6):984-90.
- Galleano J. **La biología de las metástasis del cáncer, “perspectivas”** [en línea]: Presentación realizada para el curso de postgrado en dermatología, 2005. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Argentina.<http://www.fcm.uncu.edu.ar/medicina/posgrado/dermatologia/teoricos/Biologia_Metastasis.pdf> [Consulta: 2011].
- Gao F, Carter G, Tseng G and Chivukula M. **Clinical importance of histologic grading of lobular carcinoma in situ in breast core needle biopsy specimens: current issues and controversies.** *Am J Clin Pathol.* 2010;133(5):767-71.
- Gazzaniga P, Gandini O, Giuliani L, Magnanti M, Gradilone A, Silvestri I, Gianni W, Gallucci M, Frati L and Aglianò AM. **Detection of epidermal growth factor receptor mRNA in peripheral blood: A new marker of circulating neoplastic cells in bladder cancer patients.** *Clin Cancer Res.* 2001;7(3):577-83.
- Gervasoni A, Monasterio RM, Wengler GS, Rizzi A, Zaniboni A and Parolini O. **Molecular signature detection of circulating tumor cells using a panel of selected genes.** *Cancer Lett.* 2008;263(2):267-79.
- Ghossein RA and Rosai J. **Polymerase chain reaction in the detection of micrometastases and circulating tumor cells.** *Cancer.* 1996;78(1):10-6.
- Ghossein RA and Bhattacharya S. **Molecular detection and characterisation of circulating tumour cells and micrometastases in solid tumours.** *Eur J Cancer.* 2000;36(13):1681-94.
- Ghossein RA, Rosai J, Scher HI, Seiden M, Zhang ZF, Sun M, Chang G, Berlane K, Krithivas K and Kantoff PW. **Prognostic significance of detection of prostate-specific antigen transcripts in the peripheral blood of patients with metastatic androgen-independent prostatic carcinoma.** *Urology.* 1997;50(1):100-5.
- Giese T, Engstner M, Mansmann U, Hartschuh W and Arden B. **Quantification of melanoma micrometastases in sentinel lymph nodes using real-time RT-PCR.** *J Invest Dermatol.* 2005;124(3):633-7.

Giuliano M, Giordano A, Jackson S, Hess KR, De Giorgi U, Mego M, Handy BC, Ueno NT, Alvarez RH, De Laurentiis M, De Placido S, Valero V, Hortobagyi GN, Reuben JM and Cristofanilli M. **Circulating tumor cells as prognostic and predictive markers in metastatic breast cancer patients receiving first-line systemic treatment.** *Breast Cancer Res.* 2011;13(3):R67.

Gobardhan PD, Elias SG, Madsen EV, van Wely B, van den Wildenberg F, Theunissen EB, Ernst MF, Kokke MC, van der Pol C, Borel Rinkes IH, Wijsman JH, Bongers V, van Gorp J and van Dalen T. **Prognostic value of lymph node micrometastases in breast cancer: A multicenter cohort study.** *Ann Surg Oncol.* 2011;18(6):1657-64.

Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, Chang DK, Ricciardiello L, Carethers JM, Dowell JM, Wasserman L, Compton C, Mayer RJ, Bertagnolli MM and Boland CR. **Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability.** *Cancer Res.* 2003;63(7):1608-14.

Goeminne JC, Guillaume T and Symann M. **Pitfalls in the detection of disseminated non-hematological tumor cells.** *Ann Oncol.* 2000;11(7):785-92.

Gogas H, Kefala G, Bafaloukos D, Frangia K, Polyzos A, Pectasides D, Tsoutsos D, Panagiotou P, Ioannovich J and Loukopoulos D. **Prognostic significance of the sequential detection of circulating melanoma cells by RT-PCR in high-risk melanoma patients receiving adjuvant interferon.** *Br J Cancer.* 2002;87(2):181-6.

Goldthwaite CA. **Are Stem Cells Involved in Cancer?** [en línea]: Chapter 9 of Regenerative Medicine 2009. Stem Cell Information, The National Institutes of Health resource for stem cell research.
<<http://stemcells.nih.gov/info/2006report/2006chapter9.htm>> [Consulta: 2011].

González I, Fernández LJ, Gómez TE, Berganzo J, Soto JL and Carrato A. **A polymeric chip for micromanipulation and particle sorting by ultrasounds based on a multilayer configuration.** *Sensors and Actuators B.* 2010;144:310-7.

Goodman OB Jr, Fink LM, Symanowski JT, Wong B, Grobaski B, Pomerantz D, Ma Y, Ward DC and Vogelzang NJ. **Circulating tumor cells in patients with castration-resistant prostate cancer baseline values and correlation with prognostic factors.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(6):1904-13.

- Goodman OB Jr, Symanowski JT, Loudyi A, Fink LM, Ward DC and Vogelzang NJ. **Circulating tumor cells as a predictive biomarker in patients with hormone-sensitive prostate cancer.** *Clin Genitourin Cancer.* 2011;9(1):31-8.
- Grady WM. **Genomic instability and colon cancer.** *Cancer Metast Rev.* 2004;23(1-2):11-27.
- Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller DG and Morrow M. **American Joint Committee on Cancer Staging Manual.** 6th ed. Philadelphia: Springer; 2002. ISBN 0-387-95271-3.
- Greiner Bio-one: <http://www.greinerbioone.com/en/row/articles/literatures/manuals/>
- Grunewald K, Haun M, Urbanek M, Fiegl M, Müller-Holzner E, Gunsilius E, Dünser M, Marth C and Gastl G. **Mammaglobin gene expression: A superior marker of breast cancer cells in peripheral blood in comparison to epidermal-growth-factor receptor and Cytokeratin-19.** *Lab Invest.* 2000;80(7):1071-7.
- Grushko TA, Blackwood MA, Schumm PL, Hagos FG, Adeyanju MO, Feldman MD, Sanders MO, Weber BL and Olopade OI. **Molecular-cytogenetic analysis of HER-2/neu gene in BRCA1-associated breast cancers.** *Cancer Res.* 2002;62(5):1481-8.
- Gudjonsson T, Villadsen R, Nielsen HL, Rønnov-Jessen L, Bissell MJ and Petersen OW. **Isolation, immortalization, and characterization of a human breast epithelial cell line with stem cell properties.** *Genes Dev.* 2002;16(6):693-706.
- Guo J, Xiao B, Zhang X, Jin Z, Chen J, Qin L, Mao X, Shen G, Chen H and Liu Z. **Combined use of positive and negative immunomagnetic isolation followed by real-time RT-PCR for detection of the circulating tumor cells in patients with colorectal cancers.** *J Mol Med (Berl).* 2004;82(11):768-74.
- Gupta GP and Massagué J. **Cancer metastasis: Building a framework.** *Cell.* 2006;127:679-95.
- Gupta GP, Minn AJ, Kang Y, Siegel PM, Serganova I, Córdón-Cardo C, Olshen AB, Gerald WL and Massagué J. **Identifying site-specific metastasis genes and functions.** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2005;70:149-58.
- Gupta GP, Perk J, Acharyya S, de Candia P, Mittal V, Todorova-Manova K, Gerald WL, Brogi E, Benezra R and Massagué J. **ID genes mediate tumor reinitiation during breast cancer lung metastasis.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(49):19506-11.

Haferlach T, Winkemann M, Nickenic C, Meeder M, Ram-Petersen L, Schoch R, Nickelsen M, Weber-Matthiesen K, Schlegelberger B, Schoch C, Gassmann W and Löffler H.

Which compartments are involved in Philadelphia-chromosome positive chronic myeloid leukaemia? An answer at the single cell level by combining May-Grünwald-Giemsa staining and fluorescence *in situ* hybridization techniques. *Brit J Cancer.* 1997;97:99-106.

Hanahan D and Weinberg RA. **The hallmarks of cancer.** *Cell.* 2000;100(1):57-70.

Hall A. **The cytoskeleton and cancer.** *Cancer Metastasis Rev.* 2009;28:5-14.

Hardingham JE, Hewett PJ, Sage RE, Finch JL, Nuttall JD, Kotasek D and Dobrovic A.

Molecular detection of blood-borne epithelial cells in colorectal cancer patients and in patients with benign bowel disease. *Int J Cancer.* 2000;89(1):8-13.

Harish K. **Sentinel node biopsy: concepts and current status.** *Front Biosci.* 2005;10:2618-44.

Harris CC. **Chemical and physical carcinogenesis: Advances and perspectives for the 1990s.** *Cancer Res.* 1991;51(18):5023s-44s.

Harris JF, Chambers AF, Hill RP and LingV. **Metastatic variants are generated spontaneously at a high rate in mouse KHT tumor.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982;79:5547-51.

Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, Somerfield MR, Hayes DF and Bast Jr RC. **American Society of Clinical Oncology 2007 Update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer.** *J Clin Oncol.* 2007;25(33):5287-312.

Harriss DJ, Atkinson G, George K, Cable NT, Reilly T, Haboubi N, Zwahlen M, Egger M and Renehan AG; C-CLEAR group. **Lifestyle factors and colorectal cancer risk (1): Systematic review and meta-analysis of associations with body mass index.** *Colorectal Dis.* 2009;11(6):547-63.

Hatzfeld M and Franke WW. **Pair formation and promiscuity of cytokeratins: Formation in vitro of heterotypic complexes and intermediate-sized filaments by homologous and heterologous recombinations of purified polypeptides.** *J Cell Biol.* 1985;101(5 Pt 1):1826-41.

- Hawes D, Neville AM and Cote RJ. **Detection of occult metastasis in patients with breast cancer.** *Semin Surg Oncol.* 2001;20(4):312-8.
- Hayes DF, Bast RC, Desch CE, Fritsche H, Kemeny NE, Jessup JM, Locker GY, Macdonald JS, Mennel RG, Norton L, Ravdin P, Taube S and Winn RJ. **Tumor marker utility gradingsystem: A framework to evaluate clinical utility of tumor markers.** *J Natl Cancer Inst.* 1996;88:1456-66.
- Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Miller MC, Matera J, Allard WJ, Doyle GV and Terstappen LW. **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.
- Hebbbar M, Ychou M and Decreux M. **Current place of high-dose irinotecan chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer.** *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009;135(6):749-52.
- Heiss MM, Simon EH, Beyer BC, Gruetzner KU, Tarabichi A, Babic R, Schildberg FW and Allgayer H. **Minimal residual disease in gastric cancer: Evidence of an independent prognostic relevance of urokinase receptor expression by disseminated tumor cells in the bone marrow.** *J Clin Oncol.* 2002;20(8):2005-16.
- Hewitson P, Glasziou P, Irwig L, Towler B and Watson E. **Screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, Hemoccult.** *Cochrane Database Syst Rev.* 2007;24:(1):CD001216.
- Hoffmann K, Kerner C, Wilfert W, Mueller M, Thiery J, Hauss J and Witzigmann H. **Detection of disseminated pancreatic cells by amplification of cytokeratin-19 with quantitative RT-PCR in blood, bone marrow and peritoneal lavage of pancreatic carcinoma patients.** *World J Gastroenterol.* 2007;13(2):257-63.
- Hollestelle A, Nagel JH, Smid M, Lam S, Elstrodt F, Wasielewski M, Ng SS, French PJ, Peeters JK, Rozendaal MJ, Riaz M, Koopman DG, Ten Hagen TL, de Leeuw BH, Zwarthoff EC, Teunisse A, van der Spek PJ, Klijn JG, Dinjens WN, Ethier SP, Clevers H, Jochemsen AG, den Bakker MA, Foekens JA, Martens JW and Schutte M. **Distinct gene mutation profiles among luminal-type and basal-type breast cancer cell lines.** *Breast Cancer Res Treat.* 2010;121(1):53-64.
- Hosch SB, Braun S and Pantel K. **Characterization of disseminated tumor cells.** *Semin Surg Oncol.* 2001;20(4):265-71.

- Hou JM, Greystoke A, Lancashire L, Cummings J, Ward T, Board R, Amir E, Hughes S, Krebs M, Hughes A, Ranson M, Lorigan P, Dive C and Blackhall FH. **Evaluation of circulating tumor cells and serological cell death biomarkers in small cell lung cancer patients undergoing chemotherapy.** *Am J Pathol.* 2009;175(2):808-16.
- Hristozova T, Kanschak R, Budach V and Tinhofer I. **A simple multicolor flow cytometry protocol for detection and molecular characterization of circulating tumor cells in epithelial cancers.** *Cytometry A.* 2012. doi: 10.1002/cyto.a.22041.
- Huang P, Wang J, Guo Y and Xie W. **Molecular detection of disseminated tumor cells in the peripheral blood in patients with gastrointestinal cancer.** *J Cancer Res Clin Oncol.* 2003;129(3):192-8.
- Hurteau GJ and Spivack SD. **mRNA-specific reverse transcription-polymerase chain reaction from human tissue extracts.** *Anal Biochem.* 2002;307(2):304-15.
- Hurwitz HI, Yi J, Ince W, Novotny WF and Rosen O. **The clinical benefit of Bevacizumab in metastatic colorectal cancer is independent of *K-ras* mutation status: Analysis of a phase III study of Bevacizumab with chemotherapy in previously untreated metastatic colorectal cancer.** *Oncologist.* 2009;14(1):22-8.
- Ignatiadis M and Reinholz M. **Minimal residual disease and circulating tumor cells in breast cancer.** *Breast Cancer Res.* 2011;13(5):222.
- Ignatiadis M, Kallergi G, Ntoulia M, Perraki M, Apostolaki S, Kafousi M, Chlouverakis G, Stathopoulos E, Lianidou E, Georgoulas V and Mavroudis D. **Prognostic value of the molecular detection of circulating tumor cells using a multimarker reverse transcription-PCR assay for cytokeratin 19, mammaglobin A, and HER2 in early breast cancer.** *Clin Cancer Res.* 2008;14(9):2593-600.
- Ignatiadis M, Rothé F, Chaboteaux C, Durbecq V, Rouas G, Criscitiello C, Metallo J, Kheddoumi N, Singhal SK, Michiels S, Veys I, Rossari J, Larsimont D, Carly B, Pestrin M, Bessi S, Buxant F, Liebens F, Piccart M and Sotiriou C. **HER2-positive circulating tumor cells in breast cancer.** *PLoS One.* 2011;6(1):e15624.
- Im SS, Wilczynski SP, Burger RA and Monk BJ. **Early stage cervical cancers containing human papillomavirus type 18 DNA have more nodal metastasis and deeper stromal invasion.** *Clin Cancer Res.* 2003;9(11):4145-50.

Inomata M, Yasuda K, Shiraishi N and Kitano S. **Clinical evidences of laparoscopic versus open surgery for colorectal cancer.** *Jpn J Clin Oncol.* 2009;39(8):471-7.

Invitrogen (Life technologiesTM). CELlection Epithelial Enrich, Dynal Biotech, Dynal®

http://www.veritastk.co.jp/attached/1024/162%2003.CELlection_Epithelial_Enrich%28rev002%29.pdf

Janni W, Rack B, Lindemann K and Harbeck N. **Detection of micrometastatic disease in bone marrow: Is it ready for prime time?.** *Oncologist* 2005b;10:480-92.

Janni W, Rack B, Schindlbeck C, Strobl B, Rjosk D, Braun S, Sommer H, Pantel K, Gerber B and Friese K. **The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence.** *Cancer.* 2005a;103(5):884-91.

Järvinen TAH and Liu ET. **Simultaneous amplification of HER-2 (ERBB2) and topoisomerase II alpha (TOP2A) genes – molecular basis combination chemotherapy in cancer.** *Curr Cancer Drug Targets.* 2003;6(7):579-602.

Järvinen TAH, Tanner M, Bärlund M, Borg A and Isola J. **Characterization of topoisomerase IIa gene amplification and deletion in breast cancer.** *Genes Chromosome Cancer.* 1999;26(2):142-150.

Järvinen TAH, Tanner M, Rantanen V, Bärlund M, Borg A, Grénman S and Isola J. **Amplification and deletion of Topoisomerase IIa associate with ErbB-2 amplification and affect sensitivity to Topoisomerase II inhibitor Doxorubicin in breast cancer.** *Am J Pathol.* 2000;156(3):839-47.

Javle M and Hsueh CT. **Recent advances in gastrointestinal oncology--updates and insights from the 2009 annual meeting of the American Society of Clinical Oncology.** *J Hematol Oncol.* 2010;3:11.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E and Forman D. **Global cancer statistics.** *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69-90.

Jhawer M, Goel S, Wilson AJ, Montagna C, Ling YH, Byun DS, Nasser S, Arango D, Shin J, Klampfer L, Augenlicht LH, Perez-Soler R and Mariadason JM. **PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor Cetuximab.** *Cancer Res.* 2008;68(6):1953-61.

- Jiang Y, Kimchi ET, Staveley-O'Carroll KF, Cheng H and Ajani JA. **Assessment of *K-ras* mutation. A step toward personalized medicine for patients with colorectal cancer.** *Cancer*. 2009;115(16):3609-17.
- Kahn HJ, Presta A, Yang LY, Blondal J, Trudeau M, Lickley L, Holloway C, McCready DR, Maclean D and Marks A. **Enumeration of circulating tumor cells in the blood of breast cancer patients after filtration enrichment: Correlation with disease stage.** *Breast Cancer Res Treat*. 2004;86(3):237-47.
- Kaho RH and Huan LC. **High false-positive rate of cytokeratin-19 in detecting circulating tumor cells for nasopharyngeal carcinoma.** *Chang Gung Med J*. 2002;25(4):238-44.
- Kalluri R and Weinberg RA. **The basics of epithelial-mesenchymal transition.** *J Clin Invest*. 2009;119(6):1420-8.
- Kasimir-Bauer S, Oberhoff C, Schindler AE and Seeber S. **A summary of two clinical studies on tumor cell dissemination in primary and metastatic breast cancer: Methods, prognostic significance and implication for alternative treatment protocol.** *Int J Oncol*. 2002;20(5):1027-34.
- Kasimir-Bauer S, Oberhoff C, Sliwinska K, Neumann R, Schindler AE and Seeber S. **Evaluation of different methods for the detection of minimal residual disease in blood and bone marrow of patients with primary breast cancer: Importance for clinical use?** *Breast Cancer Res Treat*. 2001;69(2):123-32.
- Kavanagh D, Chambers G, O'Grady L, Barry KM, Waldron RP, Bennani F, Eustace PW and Tobbia I. **Is overexpression of HER-2 a predictor of prognosis in colorectal cancer?** *BMC Cancer*. 2009;9:1.
- Kaz AM and Brentnall TA. **Genetic testing for colon cancer.** *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2006;3(12):670-9.
- Kelly RJ, Carter C and Giaccone G. **Personalizing therapy in an epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer using PF-00299804 and trastuzumab.** *J Clin Oncol*. 2010;28(28):e507-10.

- Kenny FS, Hui R, Musgrove EA, Gee JM, Blamey RW, Nicholson RI, Sutherland RL and Robertson JF. **Overexpression of Cyclin D1 messenger RNA predicts for poor prognosis in estrogen receptor positive breast cancer.** *Clin Cancer Res.* 1999;5(8):2069-76.
- Kerbel RS, Waghorne C, Korczak B, Lagarde A and Breitman ML. **Clonal dominance of primary tumours by metastatic cells: Genetic analysis and biological implications.** *Cancer Surv.* 1988;7(4):597-629.
- Kim MJ, Lim KY, Kim JW, Nam IW, Lee JH and Myoung H. **Stage and mRNA expression of survivin in lymph node as prognostic indicators in patients with oral squamous cell carcinoma.** *Cancer Lett.* 2005;224(2):253-61.
- Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S, Nguyen DX, Zhang XH, Norton L and Massagué J. **Tumor self-seeding by circulating cancer cells.** *Cell.* 2009;139(7):1315-26.
- Klein CA, Blankenstein TJ, Schmidt-Kittler O, Petronio M, Polzer B, Stoecklein NH and Riethmüller G. **Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer.** *Lancet.* 2002;360(9334):683-9.
- Klevesath MB, Bobrow LG, Pinder SE and Purushotham AD. **The value of immunohistochemistry in sentinel lymph node histopathology in breast cancer.** *Br J Cancer.* 2005;92(12):2201-5.
- Ko Y, Grünewald E, Totzke G, Klinz M, Fronhoffs S, Gouni-Berthold I, Sachinidis A and Vetter H. **High percentage of false-positive results of cytokeratin 19 RT-PCR in blood: A model for the analysis of illegitimate gene expression.** *Oncology.* 2000;59(1):81-8.
- Kobayashi Y, Yoshinouchi M, Tianqi G, Nakamura K, Hongo A, Kamimura S, Mizutani Y, Kodama J, Miyagi Y and Kudo T. **Presence of human papilloma virus DNA in pelvic lymph nodes can predict unexpected recurrence of cervical cancer in patients with histologically negative lymph nodes.** *Clin Cancer Res.* 1998;4(4):979-83.
- Koch M, Kienle P, Hinz U, Antolovic D, Schmidt J, Herfarth C, von Knebel Doeberitz M and Weitz J. **Detection of hematogenous tumor cell dissemination predicts tumor relapse in patients undergoing surgical resection of colorectal liver metastases.** *Ann Surg.* 2005;241(2):199-205.

- Koch M, Kienle P, Kastrati D, Antolovic D, Schmidt J, Herfarth C, von Knebel Doeberitz M and Weitz J. **Prognostic impact of hematogenous tumor cell dissemination in patients with stage II colorectal cancer.** *Int J Cancer.* 2006;118(12):3072-7.
- Königsberg R, Gneist M, Jahn-Kuch D, Pfeiler G, Hager G, Hudec M, Dittrich C and Zeillinger R. **Circulating tumor cells in metastatic colorectal cancer: Efficacy and feasibility of different enrichment methods.** *Cancer Lett.* 2010;293(1):117-23.
- Königsberg R, Obermayr E, Bises G, Pfeiler G, Gneist M, Wrba F, de Santis M, Zeillinger R, Hudec M and Dittrich C. **Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients.** *Acta Oncol.* 2011;50(5):700-10.
- Köstler WJ, Brodowicz T, Hejna M, Wiltshcke C and Zielinski CC. **Detection of minimal residual disease in patients with cancer: A review of techniques, clinical implications, and emerging therapeutic consequences.** *Cancer Detect Prev.* 2000;24(4):376-403.
- Köstler WJ, Schwab B, Singer CF, Neumann R, Rücklinger E, Brodowicz T, Tomek S, Niedermayr M, Hejna M, Steger GG, Krainer M, Wiltshcke C and Zielinski CC. **Monitoring of serum Her-2/neu predicts response and progression-free survival to trastuzumab-based treatment in patients with metastatic breast cancer.** *Clin Cancer Res.* 2004a;10(5):1618-24.
- Köstler WJ, Steger GG, Soleiman A, Schwab B, Singer CF, Tomek S, Brodowicz T, Krainer M, Wiltshcke C, Horvat R, Jakesz R and Zielinski CC. **Monitoring of serum Her-2/neu predicts histopathological response to neoadjuvant trastuzumab-based therapy for breast cancer.** *Anticancer Res.* 2004b;24(2C):1127-30.
- Kowalewska M, Nowak R and Chechlinska M. **Implications of cancer-associated systemic inflammation for biomarker studies.** *Biochim Biophys Acta.* 2010;1806(2):163-71.
- Koyanagi K, Bilchik AJ, Saha S, Turner RR, Wiese D, McCarter M, Shen P, Deacon L, Elashoff D and Hoon DS. **Prognostic relevance of occult nodal micrometastases and circulating tumor cells in colorectal cancer in a prospective multicenter trial.** *Clin Cancer Res.* 2008;14(22):7391-6.

- Krawczyk N, Banys M, Neubauer H, Solomayer EF, Gall C, Hahn M, Becker S, Bachmann R, Wallwiener D and Fehm T. **HER2 status on persistent disseminated tumor cells after adjuvant therapy may differ from initial HER2 status on primary tumor.** *Anticancer Res.* 2009;29(10):4019-24.
- Krishnamurthy S, Cristofanilli M, Singh B, Reuben J, Gao H, Cohen EN, Andreopoulou E, Hall CS, Lodhi A, Jackson S and Lucci A. **Detection of minimal residual disease in blood and bone marrow in early stage breast cancer.** *Cancer.* 2010;116(14):3330-7.
- Krivacic RT, Ladanyi A, Curry DN, Hsieh HB, Kuhn P, Bergsrud DE, Kepros JF, Barbera T, Ho MY, Chen LB, Lerner RA and Bruce RH. **A rare-cell detector for cancer.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101(29):10501-4.
- Kufer P, Zippelius A, Lutterbüse R, Mecklenburg I, Enzmann T, Montag A, Weckermann D, Passlick B, Prang N, Reichardt P, Dugas M, Köllermann MW, Pantel K and Riethmüller G. **Heterogeneous expression of *MAGE-A* genes in occult disseminated tumor cells: A novel multimarker reverse transcription-polymerase chain reaction for diagnosis of micrometastatic disease.** *Cancer Res.* 2002;62(1):251-61.
- Kuhn P and Bethel K. **A fluid biopsy as investigating technology for the fluid phase of solid tumors.** *Phys Biol.* 2012;9(1):010301.
- Kühnel W. **Atlas color de citología e histología 2005.** Editorial: Médica Panamericana (España), edición 11ª. ISBN 978-84-7903-835-9.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N y Mitchell RN. **Robbins, Patología humana.** 2008. Editorial: Esvier España, S.A., edición 8ª. ISBN 978-84-8086-332-2.
- Kummar S, Fogarasi M, Canova A, Mota A and Ciesielski T. **Cytokeratin 7 and 20 staining for the diagnosis of lung and colorectal adenocarcinoma.** *Brit J Cancer.* 2002;86(12):1884-7.
- Kunter U, Buer J, Probst M, Duensing S, Dallmann I, Grosse J, Kirchner H, Schluepen EM, Volkenandt M, Ganzer A and Atzpodien J. **Peripheral blood tyrosinase messenger RNA detection and survival in malignant melanoma.** *J Natl Cancer Inst.* 1996;88(9):590-4.

- Kurahashi T, Hara I, Oka N, Kamidono S, Eto H and Miyake H. **Detection of micrometastases in pelvic lymph nodes in patients undergoing radical cystectomy for locally invasive bladder cancer by real-time reverse transcriptase-PCR for cytokeratin 19 and uroplakin II.** *Clin Cancer Res.* 2005;11(10):3773-7.
- Kuwada SK, Scaife CL, Kuang J, Li X, Wong RF, Florell SR, Coffey RJ Jr and Gray PD. **Effects of trastuzumab on epidermal growth factor receptor-dependent and -independent human colon cancer cells.** *Int J Cancer.* 2004;109(2):291-301.
- Kytölä S, Rummukainen J, Nordgren A, Karhu R, Farnebo F, Isola J and Larsson C. **Chromosomal alterations in 15 breast cancer cell lines by comparative genomic hybridization and spectral karyotyping.** *Genes Chromosomes Cancer.* 2000;28(3):308-17.
- Lacroix J, Becker HD, Woerner SM, Rittgen W, Drings P and von Knebel Doeberitz M. **Sensitive detection of rare cancer cells in sputum and peripheral blood samples of patients with lung cancer by preproGRP-specific RT-PCR.** *Int J Cancer.* 2001;92(1):1-8.
- Landi G, Polverelli M, Moscatelli G, Morelli R, Landi C, Fiscelli O and Erbazzi A. **Sentinel lymph node biopsy in patients with primary cutaneous melanoma: Study of 455 cases.** *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2000;14(1):35-45.
- Lang JE, Mosalpuria K, Cristofanilli M, Krishnamurthy S, Reuben J, Singh B, Bedrosian I, Meric-Bernstam F and Lucci A. **HER2 status predicts the presence of circulating tumor cells in patients with operable breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat.* 2009;113(3):501-7.
- Langer CJ, Stephenson P, Thor A, Vangel M and Johnson DH; Eastern Cooperative Oncology Group study 2598. **Trastuzumab in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer: Is there a role? Focus on Eastern Cooperative Oncology Group study 2598.** *J Clin Oncol.* 2004;22(7):1180-7.
- Langley RR and Fidler IJ. **The seed and soil hypothesis revisited--the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs.** *Int J Cancer.* 2011;128(11):2527-35.

- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA and Dick JE. **A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice.** *Nature*. 1994;367(6464):645-8.
- Larson CJ, Moreno JG, Pienta KJ, Gross S, Repollet M, O'hara SM, Russell T and Terstappen LW. **Apoptosis of circulating tumor cells in prostate cancer patients.** *Cytometry A*. 2004;62(1):46-53.
- Lauren P. **The two histological main types of gastric carcinoma. Diffuse and so-called intestinal type carcinoma: An attempt at histoclinical classification.** *Acta Patho Microbiol Scand*. 1965;64:31-49.
- Lee A, Kim Y, Han K, Kang CS, Jeon HM and Shim SI. **Detection of tumor markers including carcinoembryonic antigen, APC, and cyclin D2 in fine-needle aspiration fluid of breast.** *Arch Pathol Lab Med*. 2004;128(11):1251-1256.
- Leikola JP, Toivonen TS, Krogerus LA, von Smitten KA and Leidenius MH. **Rapid immunohistochemistry enhances the intraoperative diagnosis of sentinel lymph node metastases in invasive lobular breast carcinoma.** *Cancer*. 2005;104(1):14-9.
- Leinung S, Würfl P, Weiss CL, Röder I and Schönfelder M. **Cytokeratin-positive cells in bone marrow in comparison with other prognostic factors in colon carcinoma.** *Langenbecks Arch Surg*. 2000;385(5):337-43.
- Leversha MA, Han J, Asgari Z, Danila DC, Lin O, Gonzalez-Espinoza R, Anand A, Lilja H, Heller G, Fleisher M and Scher HI. **Fluorescence *in situ* hybridization analysis of circulating tumor cells in metastatic prostate cancer.** *Clin Cancer Res*. 2009;15(6):2091-7.
- Levin B, Lieberman DA, McFarland B, Andrews KS, Brooks D, Bond J, Dash C, Giardiello FM, Glick S, Johnson D, Johnson CD, Levin TR, Pickhardt PJ, Rex DK, Smith RA, Thorson A and Winawer SJ; American Cancer Society Colorectal Cancer Advisory Group; US Multi-Society Task Force; American College of Radiology Colon Cancer Committee. **Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: A joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology.** *Gastroenterology*. 2008;134(5):1570-95.

- Li F, Tiede B, Massagué J and Kang Y. **Beyond tumorigenesis: Cancer stem cells in metastasis.** *Cell Res.* 2007;17:3-14.
- Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E, Skytthe A and Hemminki K. **Environmental and heritable factors in the causation of cancer. Analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark and Finland.** *N Engl J Med.* 2000;343(2):78-85.
- Lilleby W, Nesland JM, Fosså SD, Torlakovic G, Waehre H and Kvalheim G. **The prognostic impact of cytokeratin-positive cells in bone marrow of patients with localized prostate cancer.** *Int J Cancer.* 2003;103(1):91-6.
- Lippert C, Seeger H and Mueck AO. **The effect of endogenous estradiol metabolites on the proliferation of human breast cancer cells.** *Life Sci.* 2003;72(8):877-83.
- Liu LH, Siziopikou KP, Gabram S and McClatchey KD. **Evaluation of axillary sentinel lymph node biopsy by immunohistochemistry and multilevel sectioning in patients with breast carcinoma.** *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124(11):1670-3.
- Liu Z, Fusi A, Schmittl A, Tinhofer I, Schneider A and Keilholz U. **Eradication of EGFR-positive circulating tumor cells and objective tumor response with lapatinib and capecitabine.** *Cancer Biol Ther.* 2010;10(9):860-4.
- Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, Somerfield MR, Hayes DF and Bast Jr RC. **ASCO 2006 Update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer.** *J Clin Oncol.* 2006;26(4):5313-27.
- Lottner C, Schwarz S, Diemeier S, Hartmann A, Knuechel R, Hofstaedter F and Brockhoff G. **Simultaneous detection of *HER2/neu* gene amplification and protein overexpression in paraffin-embedded breast cancer.** *J Pathol.* 2005;205(5):577-84.
- Lu J, Fan T, Zhao Q, Zeng W, Zaslavsky E, Chen JJ, Frohman MA, Golightly MG, Madajewicz S and Chen WT. **Isolation of circulating epithelial and tumor progenitor cells with an invasive phenotype from breast cancer patients.** *Int J Cancer.* 2010;126(3):669-83.
- Lugli A, Tzankov A, Zlobec I and Terracciano LM. **Differential diagnostic and functional role of the multi-marker phenotype CDX2/CK20/CK7 in colorectal cancer stratified by mismatch repair status.** *Modern Pathol.* 2008;21(11):1403-12.

- Ma Y, Lespagnard L, Dubecq V, Paesmans M, Desmedt C, Gomez-Galdon M, Veys I, Cardoso F, Sotiriou C, Di Leo A, Piccart MJ and Larsimont D. **Polysomy 17 in HER-2/neu status elaboration in breast cancer: Effect on daily practice.** *Clin Cancer Res.* 2005;11(12):4393-9.
- Madarnas Y, Trudeau M, Franek JA, McCready D, Pritchard KI and Messersmith H. **Adjuvant/neoadjuvant Trastuzumab therapy in women with HER-2/neu-overexpressing breast cancer: A systematic review.** *Cancer Treat Rev.* 2008;34(6):539-57.
- Maestro LM, Sastre J, Rafael SB, Veganzones SB, Vidaurreta M, Martín M, Olivier C, DE La Orden VB, Garcia-Saenz JA, Alfonso R, Arroyo M and Diaz-Rubio E. **Circulating tumor cells in solid tumor in metastatic and localizes stages.** *Anticancer Res.* 2009;29(11):4839-43.
- Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, Ulkus L, Brannigan B, Collura CV, Inserra E, Diederichs S, Iafrate AJ, Bell DW, Digumarthy S, Muzikansky A, Irimia D, Settleman J, Tompkins RG, Lynch TJ, Toner M and Haber DA. **Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells.** *N Engl J Med.* 2008;359(4):366-77.
- Malmgren JA, Atwood MK and Kaplan HG. **Increase in mammography detected breast cancer over time at a community based regional cancer center: A longitudinal cohort study 1990-2005.** *BMC Cancer.* 2008;8:131.
- Marrinucci D, Bethel K, Bruce RH, Curry DN, Hsieh B, Humphrey M, Krivacic RT, Kroener J, Kroener L, Ladanyi A, Lazarus NH, Nieva J and Kuhn P. **Case study of the morphologic variation of circulating tumor cells.** *Hum Pathol.* 2007;38(3):514-9.
- Marrinucci D, Bethel K, Kolatkar A, Luttgen MS, Malchiodi M, Baehring F, Voigt K, Lazar D, Nieva J, Bazhenova L, Ko AH, Korn WM, Schram E, Coward M, Yang X, Metzner T, Lamy R, Honnatti M, Yoshioka C, Kunken J, Petrova Y, Sok D, Nelson D and Kuhn P. **Fluid biopsy in patients with metastatic prostate, pancreatic and breast cancers.** *Phys Biol.* 2012;9(1):016003.
- Marrinucci D, Bethel K, Lazar D, Fisher J, Huynh E, Clark P, Bruce R, Nieva J and Kuhn P. **Cytomorphology of circulating colorectal tumor cells: a small case series.** *J Oncol.* 2010;2010:861341.

Martin VM, Siewert C, Scharl A, Harms T, Heinze R, Ohl S, Radbruch A, Miltenyi S and Schmitz J. **Immunomagnetic enrichment of disseminated epithelial tumor cells from peripheral blood by MACS.** *Exp Hematol.* 1998;26(3):252-64.

Massagué J. **Evolución y metástasis del cáncer.** *SEBBM.* 2009;160:22-25.

Massagué J. **TGF β in cancer.** *Cell.* 2008;134:215-30.

Mazouni C, Hall A, Broglio K, Fritsche H, Andre F, Esteva FJ, Hortobagyi GN, Buzdar AU, Pusztai L and Cristofanilli M. **Kinetics of serum HER-2/neu changes in patients with HER-2-positive primary breast cancer after initiation of primary chemotherapy.** *Cancer.* 2007;109(3):496-501.

Melchor L and Benítez J. **An integrative hypothesis about the origin and development of sporadic and familial breast cancer subtypes.** *Carcinogenesis.* 2008;29(8):1475-82.

Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF, Beitsch PD, Leitch M, Hoover S, Euhus D, Haley B, Morrison L, Fleming TP, Herlyn D, Terstappen LW, Fehm T, Tucker TF, Lane N, Wang J and Uhr JW. **Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy.** *Clin Cancer Res.* 2004b;10(24):8152-62.

Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Haley B, Perkins S, Beitsch P, Khan A, Euhus D, Osborne C, Frenkel E, Hoover S, Leitch M, Clifford E, Vitetta E, Morrison L, Herlyn D, Terstappen LW, Fleming T, Fehm T, Tucker T, Lane N, Wang J and Uhr J. **HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004a;101(25):9393-8.

Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Saboorian H, Haley B, Frenkel E, Euhus D, Leitch M, Osborne C, Clifford E, Perkins S, Beitsch P, Khan A, Morrison L, Herlyn D, Terstappen LW, Lane N, Wang J and Uhr J. **uPAR and HER-2 gene status in individual breast cancer cells from blood and tissues.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(46):17361-5.

Mikolajczyk SD, Millar LS, Tsinberg P, Coutts SM, Zomorodi M, Pham T, Bischoff FZ and Pircher TJ. **Detection of EpCAM-negative and cytokeratin-negative circulating tumor cells in peripheral blood.** *J Oncol.* 2011.doi:10.1155/2011/252361.

Miltenyi Biotec: <http://www.miltenyibiotec.com/en/default.aspx>

- Minn AJ, Gupta GP, Padua D, Bos P, Nguyen DX, Nuyten D, Kreike B, Zhang Y, Wang Y, Ishwaran H, Foekens JA, van de Vijver M and Massagué J. **Lung metastasis genes couple breast tumor size and metastatic spread.** *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(16):6740-5.
- Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, Viale A, Olshen AB, Gerald WL and Massagué J. **Genes that mediate breast cancer metastasis to lung.** *Nature*. 2005b;436(7050):518-24.
- Minn AJ, Kang Y, Serganova I, Gupta GP, Giri DD, Doubrovin M, Ponomarev V, Gerald WL, Blasberg R and Massagué J. **Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors.** *J Clin Invest*. 2005a;115(1):44-55.
- Miyamura K, Tanimoto M, Morishima Y, Horibe K, Yamamoto K, Akatsuka M, Kodera Y, Kojima S, Matsuyama K and Hirabayashi N. **Detection of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia by polymerase chain reaction: possible eradication of minimal residual disease by marrow transplantation.** *Blood*. 1992;79(5):1366-70.
- Miyazono K. **Transforming growth factor-beta signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer.** *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2009;85(8):314-23.
- Molnar B, Ladanyi A, Tanko L, Sréter L and Tulassay Z. **Circulating tumor cell clusters in the peripheral blood of colorectal cancer patients.** *Clin Cancer Res*. 2001;7(12):4080-5.
- Moll R. **Molecular diversity of cytokeratins: significance for cell and tumor differentiation.** *Acta Histochem Suppl*. 1991;41:117-27.
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B and Krepler R. **The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells.** *Cell*. 1982;31(1):11-24.
- Moreno JG, O'Hara SM, Gross S, Doyle G, Fritsche H, Gomella LG and Terstappen LW. **Changes in circulating carcinoma cells in patients with metastatic prostate cancer correlate with disease status.** *Urology*. 2001;58(3):386-92.

- Morishita A, Gong J, Nomura T, Yoshida H, Izuishi K, Suzuki Y, Kushida Y, Haba R, D'Armiento J and Masaki T. **The use of protein array to identify targetable receptor tyrosine kinases for treatment of human colon cancer.** *Int J Oncol.* 2010;37:829-35.
- Mortensen K, Lichtenberg J, Thomsen PD and Larsson LI. **Spontaneous fusion between cancer cells and endothelial cells.** *Cell Mol Life Sci.* 2004;61(16):2125-31.
- Moss AC, Jacobson GM, Walker LE, Blake NW, Marshall E and Coulson JM. **SCG3 transcript in peripheral blood is a prognostic biomarker for REST-deficient small cell lung cancer.** *Clin Cancer Res.* 2009;15(1):274-83.
- Mostert B, Sleijfer S, Foekens JA and Gratama JW. **Circulating tumor cells (CTCs): detection methods and their clinical relevance in breast cancer.** *Cancer Treat Rev.* 2009;35(5):463-74.
- Mueller P, Carroll P, Bowers E, Moore D 2nd, Cher M, Presti J, Wessman M and Pallavicini MG. **Low frequency epithelial cells in bone marrow aspirates from prostate carcinoma patients are cytogenetically aberrant.** *Cancer.* 1998;83(3):538-46.
- Müller P, Weckermann D, Riethmüller G and Schlimok G. **Detection of genetic alterations in micrometastatic cells in bone marrow of cancer patients by fluorescence *in situ* hybridization.** *Cancer Genet Cytogenet.* 1996;88(1):8-16.
- Müller V, Hayes DF and Pantel K. **Recent translational research: Circulating tumor cells in breast cancer patients.** *Breast Cancer Res.* 2006;8(5):110.
- Müller V, Stahmann N, Riethdorf S, Rau T, Zabel T, Goetz A, Jänicke F and Pantel K. **Circulating tumor cells in breast cancer: Correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity.** *Clin Cancer Res.* 2005;11(10):3678-85.
- Munzone E, Nolé F, Goldhirsch A, Botteri E, Esposito A, Zorzino L, Curigliano G, Minchella I, Adamoli L, Cassatella MC, Casadio C and Sandri MT. **Changes of HER2 status in circulating tumor cells compared with the primary tumor during treatment for advanced breast cancer.** *Clin Breast Cancer.* 2010;10(5):392-7.
- Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, Hase T and Notomi T. **Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template.** *Clin Chem.* 2001;47(9):1742-3.

- Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, Smith MR, Kwak EL, Digumarthy S, Muzikansky A, Ryan P, Balis UJ, Tompkins RG, Haber DA and Toner M. **Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology.** *Nature*. 2007;450(7173):1235-9.
- Nathanson DR, Culliford IV AT, Shia J, Chen B, D'Alessio M, Zeng ZS, Nash GM, Gerald W, Barany F and Paty PB. **HER 2/neu expression and gene amplification in colon cancer.** *Int J Cancer*. 2003;105(6):796-802.
- National Institutes of Health (NIH) Consensus Statement. **Adjuvant therapy for breast cancer** [en línea]: 2000;17(4):1-23. [Consulta: 2011].
<http://consensus.nih.gov/2000/2000AdjuvantTherapyBreastCancer114html.htm>
- Naume B, Borgen E, Kvalheim G, Karesen R, Qvist H, Sauer T, Kumar T and Nesland JM. **Detection of isolated tumor cells in bone marrow in early-stage breast carcinoma patients: Comparison with preoperative clinical parameters and primary tumor characteristics.** *Clin Cancer Res*. 2001;7(12):4122-9.
- Naume B, Borgen E, Nesland JM, Beiske K, Gilen E, Renolen A, Ravnås G, Qvist H, Kåresen R and Kvalheim G. **Increased sensitivity for detection of micrometastases in bone-marrow/peripheral-blood stem-cell products from breast-cancer patients by negative immunomagnetic separation.** *Int J Cancer*. 1998;78(5):556-60.
- Naume B, Borgen E, Tøssvik S, Pavlak N, Oates D and Nesl and JM. **Detection of isolated tumor cells in peripheral blood and in BM: Evaluation of a new enrichment method.** *Cytotherapy*. 2004b;6(3):244-52.
- Naume B, Wiedswang G, Borgen E, Kvalheim G, Kåresen R, Qvist H, Janbu J, Harbitz T and Nesland JM. **The prognostic value of isolated tumor cells in bone marrow in breast cancer patients: Evaluation of morphological categories and the number of clinically significant cells.** *Clin Cancer Res*. 2004a;10(9):3091-7.
- Negin BP and Cohen SJ. **Circulating tumor cells in colorectal cancer: Past, present, and future challenges.** *Curr Treat Options Oncol*. 2010;11(1-2):1-13.
- Newman B, Austin MA, Lee M and King MC. **Inheritance of human breast cancer: Evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families.** *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85:3044-8.

Nguyen DX, Chiang AC, Zhang XH, Kim JY, Kris MG, Ladanyi M, Gerald WL and Massagué J. **WNT/TCF signaling through LEF1 and HOXB9 mediates lung adenocarcinoma metastasis.** *Cell*. 2009;138(1):51-62.

Nicholl MB, Elashoff D, Takeuchi H, Morton DL and Hoon DS. **Molecular upstaging based on paraffin-embedded sentinel lymph nodes: Ten-year follow-up confirms prognostic utility in melanoma patients.** *Ann Surg*. 2011;253(1):116-22.

Nieuwenhuis EJ, van der Waal I, Leemans CR, Kummer A, Pijpers R, Castelijns JA, Brakenhoff RH and Snow GB. **Histopathologic validation of the sentinel node concept in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma.** *Head Neck*. 2005;27(2):150-8.

Noguchi M. **Sentinel lymph node biopsy as an alternative to routine axillary lymph node dissection in breast cancer patients.** *J Surg Oncol*. 2001;76(2):144-56.

Nolé F, Munzone E, Zorzino L, Minchella I, Salvatici M, Botteri E, Medici M, Verri E, Adamoli L, Rotmensz N, Goldhirsch A and Sandri MT. **Variation of circulating tumor cells levels during treatment of metastatic breast cancer: Prognostic and therapeutic implications.** *Ann Oncol*. 2008;19(5):891-7.

Nordgård O, Oltedal S, Kørner H, Aasprong OG, Tjensvoll K, Gilje B and Heikkilä R. **Quantitative RT-PCR detection of tumor cells in sentinel lymph nodes isolated from colon cancer patients with an ex vivo approach.** *Ann Surg*. 2009a;249(4):602-7.

Nordgård O, Oltedal S, Kørner H, Aasprong OG, Tjensvoll K, Gilje B and Heikkilä R. **The potential of cytokeratin 20 and mucin 2 mRNA as metastasis markers in regional lymph nodes of colon cancer patients investigated by quantitative RT-PCR.** *Int J Colorectal Dis*. 2009b;24(3):261-8.

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N and Hase T. **Loop-mediated isothermal amplification of DNA.** *Nucleic Acids Res*. 2000;28(12):E63.

Nowell PC. **The clonal evolution of tumor cell populations.** *Science*. 1976;194(4260):23-8.

Nylund SJ, Verbeek W, Larramendy ML, Ruutu T, Heinonen K, Hallmann H and Knuutila S.

Cell lineage involvement in four patients with myelodysplastic syndrome and t(1;7) or trisomy 8 studied by simultaneous immunophenotyping and fluorescence *in situ* hybridization. *Cancer Genet Cytogen.* 1993;70:120-4.

O'Malley FP. **Lobular neoplasia: Morphology, biological potential and management in core biopsies.** *Mod Pathol.* 2010;23:S14-S25.

O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S and Dick JE. **A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice.** *Nature.* 2007;445(7123):106-10.

Observatorio Europeo del Cáncer [European Cancer Observatory (ECO)]:

<http://eu-cancer.iarc.fr/>

Offner S, Schmaus W, Witter K, Baretton GB, Schlimok G, Passlick B, Riethmüller G and Pantel K. **p53 gene mutations are not required for early dissemination of cancer cells.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96(12):6942-6.

Okegawa T, Nutahara K and Higashihara E. **Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with hormone refractory prostate cancer.** *J Urol.* 2009;181(3):1091-7.

Organización Mundial de la Salud (OMS): <http://www.who.int/es/>

Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, Krauspe S, Malarski N, Gajda M, Kroll T, Jörke C, Hammer U, Altendorf-Hofmann A, Rabenstein C, Pachmann U, Runnebaum I and Höffken K. **Monitoring the response of circulating epithelial tumor cells to adjuvant chemotherapy in breast cancer allows detection of patients at risk of early relapse.** *J Clin Oncol.* 2008;26(8):1208-15.

Pachmann K, Camara O, Kroll T, Gajda M, Gellner AK, Wotschadlo J and Runnebaum IB. **Efficacy control of therapy using circulating epithelial tumor cells (CETC) as "liquid biopsy": Trastuzumab in HER2/neu-positive breast carcinoma.** *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011;137(9):1317-27.

Padua D, Zhang XH, Wang Q, Nadal C, Gerald WL, Gomis RR and Massagué J. **TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4.** *Cell.* 2008;133(1):66-77.

- Paget S. **Distribution of secondary growths in cancer of the breast.** *The Lancet.* 1989;8(2):98-101.
- Palmieri G, Ascierto PA, Perrone F, Satriano SM, Ottaiano A, Daponte A, Napolitano M, Caracò C, Mozzillo N, Melucci MT, Cossu A, Tanda F, Gallo C, Satriano RA and Castello G. **Prognostic value of circulating melanoma cells detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction.** *J Clin Oncol.* 2003;21(5):767-73.
- Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, Gilliland FD, Baylin SB, Herman JG and Belinsky SA. **Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum.** *Cancer Res.* 2000;60(21):5954-8.
- Pallaoro A, Braun GB and Moskovits M. **Quantitative ratiometric discrimination between noncancerous and cancerous prostate cells based on neuropilin-1 overexpression.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108(40):16559-64.
- Pantel K and Brakenhoff RH. **Dissecting the metastatic cascade.** *Nat Rev Cancer.* 2004;4(6):448-56.
- Pantel K and Braun S. **Molecular determinants of occult metastatic tumor cells in bone marrow.** *Clin Breast Cancer.* 2001;2(3):222-8.
- Pantel K and Otte M. **Occult micrometastasis: Enrichment, identification and characterization of single disseminated tumour cells.** *Semin Cancer Biol.* 2001;11(5):327-37.
- Pantel K, Izbicki JR, Angstwurm M, Braun S, Passlick B, Karg O, Thetter O and Riethmüller G. **Immunocytological detection of bone marrow micrometastasis in operable non-small cell lung cancer.** *Cancer Res.* 1993b;53:1027-31.
- Pantel K, Müller V, Auer M, Nusser N, Harbeck N and Braun S. **Detection and clinical implications of early systemic tumor cell dissemination in breast cancer.** *Clin Cancer Res.* 2003;9(17):6326-34.
- Pantel K, Schlimok G, Angstwurm M, Weckermann D, Schmaus W, Gath H, Passlick B, Izbicki JR and Riethmüller G. **Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow.** *J Hematother.* 1994;3(3):165-73.

- Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, Funke I, Izbicki JR and Riethmüller G. **Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells.** *J Natl Cancer Inst.* 1993a;85(17):1419-24.
- Pantel K, Schlimok G, Kutter D, Schaller G, Genz T, Wiebecke B, Backmann R, Funke I and Riethmüller G. **Frequent down-regulation of major histocompatibility class I antigen expression on individual micrometastatic carcinoma cells.** *Cancer Res.* 1991;51(17):4712-5.
- Pantel K. **Micrometastasis. Series: Cancer Metastasis - Biology and Treatment.** 2003. Editorial: Springer, vol. 5. ISBN: 1-4020-1155-5.
- Pargaonkar AS, Beissner RS, Snyder S and Speights VO Jr. **Evaluation of immunohistochemistry and multiple-level sectioning in sentinel lymph nodes from patients with breast cancer.** *Arch Pathol Lab Med.* 2003;127(6):701-5.
- Park D, Kang MS, Oh SJ, Kim HJ, Cho YK, Sohn CI, Jeon WK, Kim BI, Han WK, Kim H, Ryu SH and Sepulveda AR. **HER-2/neu overexpression is an independent prognostic factor in colorectal cancer.** *Int J Colorectal Dis.* 2007;22(5):491-7.
- Parkin MD, Bray F, Ferlay J and Pisani P. **Global cancer statistics, 2002.** *CA Cancer J Clin.* 2005;55:74-108.
- Parsons JT, Horwitz AR and Schwartz MA. **Cell adhesion: Integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(9):633-43.
- Partridge M, Phillips E, Francis R and Li SR. **Immunomagnetic separation for enrichment and sensitive detection of disseminated tumor cells in patients with head and neck SCC.** *J Pathol.* 1999;189(3):368-77.
- Pasche B. **Recent advances in breast cancer.** *Cancer Treat Res.* 2008;141:1-10.
- Passlick B and Pantel K. **Detection and relevance of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes.** *Recent Results Cancer Res.* 2000;157:29-37.
- Paterlini-Brechot P and Benali NL. **Circulating tumor cells (CTC) detection: Clinical impact and future directions.** *Cancer Lett.* 2007;253(2):180-204.
- Pawelek JM. **Tumour-cell fusion as a source of myeloid traits in cancer.** *Lancet Oncol.* 2005;6(12):988-93.

- Payoux P, Dekeister C, Lopez R, Lauwers F, Esquerré JP and Paoli JR. **Effectiveness of lymphoscintigraphic sentinel node detection for cervical staging of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck.** *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63(8):1091-5.
- Péley G, Tóth J, Csuka, Sinkovics I, Farkas E and Köves I. **Immunohistochemistry and reverse transcriptase polymerase chain reaction on sentinel lymph nodes can improve the accuracy of nodal staging in breast cancer patients.** *Int J Biol Markers.* 2001;16(4):227-32.
- Pelkey TJ, Frierson HF and Bruns DE. **Molecular and immunological detection of circulating tumor cells and micrometastases from solid tumors.** *Clin Chem.* 1996;42(9):1369-81.
- Pestrin M, Bessi S, Galardi F, Truglia M, Biggeri A, Biagioni C, Cappadona S, Biganzoli L, Giannini A and Di Leo A. **Correlation of HER2 status between primary tumors and corresponding circulating tumor cells in advanced breast cancer patients.** *Breast Cancer Res Treat.* 2009;118(3):523-30.
- Phipps AI, Baron J and Newcomb PA. **Prediagnostic smoking history, alcohol consumption, and colorectal cancer survival: The Seattle Colon Cancer Family Registry.** *Cancer.* 2011;117(21):4948-57.
- Pierga JY, Bidard FC, Mathiot C, Brain E, Delaloge S, Giachetti S, de Cremoux P, Salmon R, Vincent-Salomon A and Marty M. **Circulating tumor cell detection predicts early metastatic relapse after neoadjuvant chemotherapy in large operable and locally advanced breast cancer in a phase II randomized trial.** *Clin Cancer Res.* 2008;14(21):7004-10.
- Pierga JY, Bonneton C, Vincent-Salomon A, de Cremoux P, Nos C, Blin N, Pouillart P, Thierry JP and Magdelénat H. **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(4):1392-400.
- Pierga JY, Hajage D, Bachelot T, Delaloge S, Brain E, Campone M, Diéras V, Rolland E, Mignot L, Mathiot C and Bidard FC. **High independent prognostic and predictive value of circulating tumor cells compared with serum tumor markers in a large prospective trial in first-line chemotherapy for metastatic breast cancer patients.** *Ann Oncol.* 2012;23(3):618-24.

- Pinto D and Clevers H. **Wnt, stem cells and cancer in the intestine.** *Biol Cell.* 2005;97:185-96.
- Pluim D, Devriese LA, Beijnen JH and Schellens JH. **Validation of a multiparameter flow cytometry method for the determination of phosphorylated extracellular-signal-regulated kinase and DNA in circulating tumor cells.** *Cytometry A.* 2012. doi: 10.1002/cyto.a.22049.
- Polley AC, Mulholland F, Pin C, Williams EA, Bradburn DM, Mills SJ, Mathers JC and Johnson IT. **Proteomic analysis reveals field-wide changes in protein expression in the morphologically normal mucosa of patients with colorectal neoplasia.** *Cancer Res.* 2006;66(13):6553-62.
- Poste G and Fidler IJ. **The pathogenesis of cancer metastasis.** *Nature.* 1980;283:139-46.
- Pretlow TG, Schwartz S, Giaconia JM, Wright AL, Grimm HA, Edgehouse NL, Murphy JR, Markowitz SD, Jamison JM, Summers JL, Hamlin CR, MacLennan GT, Resnick MI, Pretlow TP and Connell CF. **Prostate cancer and other xenografts from cells in peripheral blood of patients.** *Cancer Res.* 2000;60(15):4033-6.
- Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, Weissman IL, Clarke MF and Ailles LE. **Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(3):973-8.
- Punnoose EA, Atwal SK, Spoerke JM, Savage H, Pandita A, Yeh RF, Pirzkall A, Fine BM, Amler LC, Chen DS and Lackner MR. **Molecular biomarker analyses using circulating tumor cells.** *PLoS One.* 2010;5(9):e12517.
- Querzoli P, Pedriali M, Rinaldi R, Lombardi AR, Biganzoli E, Boracchi P, Ferretti S, Frasson C, Zanella C, Ghisellini S, Ambrogio F, Antolini L, Piantelli M, Iacobelli S, Marubini E, Alberti S and Nenci I. **Axillary lymph node nanometastases are prognostic factors for disease-free survival and metastatic relapse in breast cancer patients.** *Clin Cancer Res.* 2006;12(22):6696-701.
- Racila E, Euhus D, Weiss AJ, Rao C, McConnell J, Terstappen LW and Uhr JW. **Detection and characterization of carcinoma cells in the blood.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95(8):4589-94.

- Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES and Golub TR. **A molecular signature of metastasis in primary solid tumors.** *Nat Genet.* 2003;33(1):49-54.
- Rao CG, Chianese D, Doyle GV, Miller MC, Russell T, Sanders RA Jr and Terstappen LW. **Expression of epithelial cell adhesion molecule in carcinoma cells present in blood and primary and metastatic tumors.** *Int J Oncol.* 2005;27(1):49-57.
- Reed J, Rosman M, Verbanac KM, Mannie A, Cheng Z and Tafrá L. **Prognostic implications of isolated tumor cells and micrometastases in sentinel nodes of patients with invasive breast cancer: 10-year analysis of patients enrolled in the prospective East Carolina University/Anne Arundel Medical Center Sentinel Node Multicenter Study.** *J Am Coll Surg.* 2009;208(3):333-40.
- Reimers N, Zafrakas K, Assmann V, Egen C, Riethdorf L, Riethdorf S, Berger J, Ebel S, Jänicke F, Sauter G and Pantel K. **Expression of extracellular matrix metalloproteases inducer on micrometastatic and primary mammary carcinoma cells.** *Clin Cancer Res.* 2004;10(10):3422-8.
- Reinhold U, Berkin C, Bosserhoff AK, Deutschmann A, Garbe C, Gläser R, Hein R, Krähn G, Peter RU, Rappl G, Schitteck B, Seiter S, Ugurel S, Volkenandt M and Tilgen W. **Interlaboratory evaluation of a new reverse transcriptase polymerase chain reaction-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of circulating melanoma cells: A multicenter study of the Dermatologic Cooperative Oncology Group.** *J Clin Oncol.* 2001;19(6):1723-7.
- Retz M, Lehmann J, Röder C, Weichert-Jacobsen K, Loch T, Romahn E, Lühl C, Kalthoff H and Stöckle M. **Cytokeratin-20 reverse-transcriptase polymerase chain reaction as a new tool for the detection of circulating tumor cells in peripheral blood and bone marrow of bladder cancer patients.** *Eur Urol.* 2001;39(5):507-17.
- Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C and De Maria R. **Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells.** *Nature.* 2007;445(7123):111-5.
- Riesenberg R, Oberneder R, Kriegmair M, Epp M, Bitzer U, Hofstetter A, Braun S, Riethmüller G and Pantel K. **Immunocytochemical double staining of cytokeratin and prostate specific antigen in individual prostatic tumour cells.** *Histochemistry.* 1993;99(1):61-6.

- Riethdorf S, Wikman H and Pantel K. **Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients.** *Int J Cancer.* 2008;123(9):1991-2006.
- Ring A, Smith IE and Dowsett M. **Circulating tumour cells in breast cancer.** *Lancet Oncol.* 2004;5(2):79-88.
- Roberts AA and Cochran AJ. **Pathologic analysis of sentinel lymph nodes in melanoma patients: current and future trends.** *J Surg Oncol.* 2004;85(3):152-61.
- Rockhill B. **The privatization of risk.** *Am J Public Health.* 2001;91(3):365-8.
- Rolle A, Günzel R, Pachmann U, Willen B, Höffken K and Pachmann K. **Increase in number of circulating disseminated epithelial cells after surgery for non-small cell lung cancer monitored by MAINTRAC(R) is a predictor for relapse: A preliminary report.** *World J Surg Oncol.* 2005;3(1):18.
- Rosenberg R, Gertler R, Friederichs J, Fuehrer K, Dahm M, Phelps R, Thorban S, Nekarda H and Siewert JR. **Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood.** *Cytometry.* 2002;49(4):150-8.
- RosetteSep (StemCell Technologies):
http://www.stemcell.com/~media/Technical%20Resources/C/6/E/4/A/28583_PIS_1_0_0.ashx
- Ross JS and Slodkowska EA. **Circulating and disseminated tumor cells in the management of breast cancer.** *Am J Clin Pathol.* 2009;132(2):237-45.
- Ross RW, Manola J, Hennessy K, Galsky M, Scher H, Small E, Kelly WK and Kantoff PW. **Prognostic significance of baseline reverse transcriptase-PCR for prostate-specific antigen in men with hormone-refractory prostate cancer treated with chemotherapy.** *Clin Cancer Res.* 2005;11(14):5195-8.
- Rubin BP, Skarin A.T, Pisick E, Rizk M and Salgia R. **Use of Cytokeratins 7 and 20 in determining the origin of metastatic carcinoma of unknown primary, with special emphasis on lung cancer.** *Eur J Cancer Prev.* 2001;10(1):77-82.
- Saha S, Dan AG, Beutler T, Wiese D, Schochet E, Badin J, Branigan T, Ng P, Bassily N and David D. **Sentinel lymph node mapping technique in colon cancer.** *Semin Oncol.* 2004;31(3):374-81.

- Saito T, Kobayashi M, Harada R, Uemura Y and Taguchi H. **Sensitive detection of small cell lung carcinoma cells by reverse transcriptase-polymerase chain reaction for prepro-gastrin-releasing peptide mRNA.** *Cancer*. 2003;97(10):2504-11.
- Sakorafas GH, Geraghty J and Pavlakis G. **The clinical significance of axillary lymph node micrometastases in breast cancer.** *Eur J Surg Oncol*. 2004;30(8):807-16.
- Salido M, Tusquet I, Corominas JM, Suarez M, Espinet B, Corzo C, Bellet M, Fabregat X, Serrano S and Solé F. **Polysomy of chromosome 17 in breast cancer tumors showing an overexpression of ERBB2: A study of 175 cases using fluorescence *in situ* hybridization and Immunohistochemistry.** *Breast Cancer Res*. 2005;7(2):R267-73.
- Samowitz WS, Slattery ML, Sweeney C, Herrick J, Wolff RK and Albertsen H. **APC mutations and other genetic and epigenetic changes in colon cancer.** *Mol Cancer Res*. 2007;5(2):165-70.
- Sastre J, Maestro ML, Puente J, Veganzones S, Alfonso R, Rafael S, García-Saenz JA, Vidaurreta M, Martín M, Arroyo M, Sanz-Casla MT and Díaz-Rubio E. **Circulating tumor cells in colorectal cancer: Correlation with clinical and pathological variables.** *Ann Oncol*. 2008;19(5):935-8.
- Satya-Prakash KL, Pathak S, Hsu TC, Olivé M and Cailleau R. **Cytogenetic analysis on eight human breast tumor cell lines: High frequencies of 1q, 11q and HeLa-like marker chromosomes.** *Cancer Genet Cytogen*. 1981;3(1):61-73.
- Sauter ER, Babb J, Daly M, Engstrom PF, Ehya H, Malick J and Diamandis E. **Prostate-specific antigen production in the female breast: Association with progesterone.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1998;7(4):315-20.
- Sauter ER, Tichansky DS, Chervoneva I and Diamandis EP. **Circulating testosterone and prostate-specific antigen in nipple aspirate fluid and tissue are associated with breast cancer.** *Environ Health Perspect*. 2002;110(3):241-6.
- Sauter ER, Wagner-Mann C, Ehya H and Klein-Szanto A. **Biologic markers of breast cancer in nipple aspirate fluid and nipple discharge are associated with clinical findings.** *Cancer Detect Prev*. 2007;31(1):50-8.
- Scabini S. **Sentinel node biopsy in colorectal cancer: Must we believe it?** *World J Gastrointest Surg*. 2010;2(1):6-8.

- Scarberry KE, Mezencev R and McDonald JF. **Targeted removal of migratory tumor cells by functionalized magnetic nanoparticles impedes metastasis and tumor progression.** *Nanomedicine (Lond)*. 2011;6(1):69-78.
- Schaller G, Fuchs I, Pritze W, Ebert A, Herbst H, Pantel K, Weitzel H and Lengyel E. **Elevated keratin 18 protein expression indicates a favorable prognosis in patients with breast cancer.** *Clin Cancer Res*. 1996;2(11):1879-85.
- Schem C, Maass N, Bauerschlag DO, Carstensen MH, Löning T, Roder C, Batic O, Jonat W and Tiemann K. **One-step nucleic acid amplification-a molecular method for the detection of lymph node metastases in breast cancer patients; results of the German study group.** *Virchows Arch*. 2009;454(2):203-10.
- Schindlbeck C, Kampik T, Janni W, Rack B, Jeschke U, Krajewski S, Sommer H and Friesen K. **Prognostic relevance of disseminated tumor cells in the bone marrow and biological factors of 265 primary breast carcinomas.** *Breast Cancer Res*. 2005;7(6):R1174-85.
- Schitteck B, Blaheta HJ, Ellwanger U and Garbe C. **Polymerase chain reaction in the detection of circulating tumour cells in peripheral blood of melanoma patients.** *Recent Res Cancer* 2001;158:93-104.
- Schlimok G and Riethmüller G. **Detection, characterization and tumorigenicity of disseminated tumor cells in human bone marrow.** *Semin Cancer Biol*. 1990;1(3):207-15.
- Schlimok G, Funke I, Holzmann B, Göttlinger G, Schmidt G, Häuser H, Swierkot S, Warnecke HH, Schneider B, Koprowski H and Riethmüller G. **Micrometastatic cancer cells in bone marrow: *In vitro* detection with anti-cytokeratin and *in vivo* labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies.** *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84(23):8672-6.
- Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, Ahr A, Blankenstein TJ, Kaufmann M, Diebold J, Arnholdt H, Müller P, Bischoff J, Harich D, Schlimok G, Riethmüller G, Eils R and Klein CA. **From latent disseminated cells to overt metastasis: Genetic analysis of systemic breast cancer progression.** *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(13):7737-42.

Schuster R, Max N, Mann B, Heufelder K, Thilo F, Gröne J, Rokos F, Buhr HJ, Thiel E and Keilholz U. **Quantitative real-time RT-PCR for detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of patients with colorectal cancer using different mRNA markers.** *Int J Cancer.* 2004;108(2):219-27.

Schwarzenbach H, Pantel K, Kemper B, Beeger C, Otterbach F, Kimmig R and Kasimir-Bauer S. **Comparative evaluation of cell-free tumor DNA in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer.** *Breast Cancer Res.* 2009;11(5):R71.

Sergeant G, Penninckx F and Topal B. **Quantitative RT-PCR detection of colorectal tumor cells in peripheral blood—A systematic review.** *J Surg Res.* 2008;150(1):144-52.

Shadeo A and Lam WL. **Comprehensive copy number profiles of breast cancer cell model genomes.** *Breast Cancer Res.* 2006;8(1):R9.

Shaw JA, Smith BM, Walsh T, Johnson S, Primrose L, Slade MJ, Walker RA and Coombes RC. **Microsatellite alterations plasma DNA of primary breast cancer patients.** *Clin Cancer Res.* 2000;6(3):1119-24.

Shiao SL and Coussens LM. **The tumor-immune microenvironment and response to radiation therapy.** *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2010;15(4):411-21.

Sienel W, Mecklenburg I, Dango S, Ehrhardt P, Kirschbaum A, Passlick B and Pantel K. **Detection of MAGE-A transcripts in bone marrow is an independent prognostic factor in operable non-small-cell lung cancer.** *Clin Cancer Res.* 2007;13(13):3840-7.

Sieri S, Krogh V, Pala V, Muti P, Micheli A, Evangelista A, Tagliabue G and Berrino F. **Dietary patterns and risk of breast cancer in the ORDET cohort.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13:567-72.

Sigma-Aldrich: http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma-Aldrich/Product_Information_Sheet/1/11191-research-use-pis.Par.0001.File.tmp/11191-research-use-pis.pdf

Silva AL, Diamond J, Silva MR and Passos-Coelho JL. **Citokeratin 20 is not a reliable molecular marker for occult breast cancer cell detection in hematological tissues.** *Breast Cancer Res Treat.* 2001;66(1):59-66.

Silverstein MJ. **Ductal carcinoma *in situ* of the breast.** *BMJ.* 1998;317:734-9.

- Simpson PT, Gale T, Fulford LG, Reis-Filho JS and Lakhani SR. **The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: Pathology of atypical lobular hyperplasia and lobular carcinoma *in situ*.** *Breast Cancer Res.* 2003;5:258-62.
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J and Dirks PB. **Identification of a cancer stem cell in human brain tumors.** *Cancer Res.* 2003;63(18):5821-8.
- Slade MJ, Singh A, Smith BM, Tripuraneni G, Hall E, Peckitt C, Fox S, Graham H, Lüchtenborg M, Sinnett HD, Cross NC and Coombes RC. **Persistence of bone marrow micrometastases in patients receiving adjuvant therapy for breast cancer: Results at 4 years.** *Int J Cancer.* 2005;114(1):94-100.
- Slamon D, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J and Norton L. **Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2.** *N Engl J Med.* 2001;344(11):783-92.
- Slattery ML. **Physical activity and colorectal cancer.** *Sports Med.* 2004;34(4):239-52.
- Smith RD, Ogden CW and Penny MA. **Exclusive amplification of cDNA template (EXACT) RT-PCR to avoid amplifying contaminating genomic pseudogenes.** *Biotechniques.* 2001;31(4):776-782.
- Sociedad American del Cáncer (American Cancer Society): <http://www.cancer.org/>
- Soeth E, Vogel I, Röder C, Juhl H, Marxsen J, Krüger U, Henne-Bruns D, Kremer B and Kalthoff H. **Comparative analysis of bone marrow and venous blood isolates from gastrointestinal cancer patients for the detection of disseminated tumor cells using reverse transcription PCR.** *Cancer Res.* 1997;57(15):3106-10.
- Solakoglu O, Maierhofer C, Lahr G, Breit E, Scheunemann P, Heumos I, Pichlmeier U, Schlimok G, Oberneder R, Kollermann MW, Kollermann J, Speicher MR and Pantel K. **Heterogeneous proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(4):2246-51.
- Solomayer EF, Becker S, Pergola-Becker G, Bachmann R, Krämer B, Vogel U, Neubauer H, Wallwiener D, Huober J and Fehm TN. **Comparison of HER2 status between primary tumor and disseminated tumor cells in primary breast cancer patients.** *Breast Cancer Res Treat.* 2006;98(2):179-84.

- Solomayer EF, Diel IJ, Salanti G, Hahn M, Gollan C, Schütz F and Bastert G. **Time independence of the prognostic impact of tumor cells detection in the bone marrow of primary breast cancer patients.** *Clin Cancer Res.* 2001;7(12):4102-8.
- Somlo G, Lau SK, Frankel P, Hsieh HB, Liu X, Yang L, Krivacic R and Bruce RH. **Multiple biomarker expression on circulating tumor cells in comparison to tumor tissues from primary and metastatic sites in patients with locally advanced/inflammatory, and stage IV breast cancer, using a novel detection technology.** *Breast Cancer Res Treat.* 2011;128(1):155-63.
- Song RX and Santen RJ. **Apoptotic action of estrogen.** *Apoptosis.* 2003;8(1):55-60.
- Spizzo G, Obrist P, Ensinger C, Theurl I, Dünser M, Ramoni A, Gunsilius E, Eibl G, Mikuz G and Gastl G. **Prognostic significance of Ep-CAM and Her-2/neu overexpression in invasive breast cancer.** *Int J Cancer.* 2002;98(6):883-8.
- Stathopoulou A, Gizi A, Perraki M, Apostolaki S, Malamos N, Mavroudis D, Georgoulas V and Lianidou ES. **Real-time quantitative of CK-19 mRNA-positive cells in peripheral blood of breast cancer patients using Lighcycler system.** *Clin Cancer Res.* 2003;9(14):5145-51.
- Steinert R, Hantschick M, Vieth M, Gastinger I, Kühnel F, Lippert H and Reymond MA. **Influence of subclinical tumor spreading on survival after curative surgery for colorectal cancer.** *Arch Surg.* 2008;143(2):122-8.
- Stojadinovic A, Mittendorf EA, Holmes JP, Amin A, Hueman MT, Ponniah S and Peoples GE. **Quantification and phenotypic characterization of circulating tumor cells for monitoring response to a preventive HER2/neu vaccine-based immunotherapy for breast cancer: A pilot study.** *Ann Surg Oncol.* 2007b;14(12):3359-68.
- Stojadinovic A, Nissan A, Protic M, Adair CF, Prus D, Usaj S, Howard RS, Radovanovic D, Breberina M, Shriver CD, Grinbaum R, Nelson JM, Brown TA, Freund HR, Potter JF, Peretz T and Peoples GE. **Prospective randomized study comparing sentinel lymph node evaluation with standard pathologic evaluation for the staging of colon carcinoma: Results from the United States Military Cancer Institute Clinical Trials Group Study GI-01.** *Ann Surg.* 2007a;245(6):846-57.
- Suchy B, Austrup F, Driesel G, Eder C, Kusiak I, Uciechowski P, Grill HJ and Giesing M. **Detection of mammaglobin expressing cells in blood of breast cancer patients.** *Cancer Lett.* 2000;158(2):171-8.

Sun TT, Shih C and Green H. **Keratin cytoskeletons in epithelial cells of internal organs.**

Proc Natl Acad Sci USA. 1979;76(6):2813-7.

Swennenhuis JF, Tibbe AG, Levink R, Sipkema RC and Terstappen LW. **Characterization of circulating tumor cells by fluorescence *in situ* hybridization.** *Cytometry A.*

2009;75(6):520-7.

Swerts K, De Moerloose B, Dhooge C, Brichard B, Benoit Y, Laureys G and Philippé J.

Detection of residual neuroblastoma cells in bone marrow: Comparison of flow cytometry with immunocytochemistry. *Cytometry B Clin Cytom.*

2004;61(1):9-19.

Szöllösi J, Balázs M, Feuerstein BG, Benz CC and Waldman FM. **ERBB-2 (HER2/neu) gene copy number, p185^{HER2} overexpression, and intratumor heterogeneity in human breast cancer.** *Cancer Res.* 1995;55(22):5400-7.

Tai KY, Shiah SG, Shieh YS, Kao YR, Chi CY, Huang E, Lee HS, Chang LC, Yang PC and Wu CW.

DNA methylation and histone modification regulate silencing of epithelial cell adhesion molecule for tumor invasion and progression regulation of Ep-CAM in tumor invasion. *Oncogene.* 2007;26(27):3989-97.

Takei H, Kurosumi M, Yoshida T, Ninomiya J, Hagiwara Y, Kamimura M, Hayashi Y, Tozuka K, Suemasu K, Inoue K and Tabei T. **Current trends of sentinel lymph node biopsy for breast cancer--a surgeon's perspective.** *Breast Cancer.*

2007;14(4):362-70.

Takenaka M, Hanagiri T, Shinohara S, Kuwata T, Chikaishi Y, Oka S, Shigematsu Y, Nagata Y, Shimokawa H, Nakagawa M, Uramoto H, So T and Tanaka F. **The prognostic significance of HER2 overexpression in Non-small cell lung cancer.**

Anticancer Res. 2011;31:4631-6.

Talmadge JE and Fidler IJ. **AACR Centennial series: The biology of cancer metastasis: Historical perspective.** *Cancer Res.* 2010;70(14):5649-69.

Talmadge JE. **Clonal selection of metastasis within the life history of a tumor.** *Cancer Res.*

2007;67(24):11471-5.

Tanis PJ, Boom RP, Koops HS, Faneyte IF, Peterse JL, Nieweg OE, Rutgers EJ, Tiebosch AT and Kroon BB. **Frozen section investigation of the sentinel node in malignant melanoma and breast cancer.** *Ann Surg Oncol.* 2001a;8(3):222-6.

- Tanis PJ, Nieweg OE, Valdés Olmos RA, Th Rutgers EJ and Kroon BB. **History of sentinel node and validation of the technique.** *Breast Cancer Res.* 2001b;3(2):109-12.
- Tanner M, Järvinen P and Isola J. **Amplification of *HER-2/neu* and *Topoisomerase II α* in primary and metastatic breast cancer.** *Cancer Res.* 2001;61(14):5345-8.
- Tapia C, Glatz K, Novotony H, Lugli A, Horcic M, Seemayer CA, Tornillo L, Terracciano L, Spichtin H, Mirlacher M, Simon R and Sauter G. **Close association between *HER-2* amplification and overexpression in human tumors of non-breast origin.** *Modern Pathol.* 2007;20(2):192-8.
- Temple G, Sales M, Kernohan N, Scott F, Meiklejohn D and Pratt N. **Application of combined immunofluorescence and fluorescence in situ hybridization on paraffin-embedded sections to characterize T-cell lymphoma with EBV-infected B-cell blasts.** *Gene Chromosome Canc.* 2004;41:405-9.
- Terada R, Yasutake T, Nakamura S, Hisamatsu T, Nakagoe T, Ayabe H and Tagawa Y. **Evaluation of metastatic potential of gastric tumors by staining for proliferating cell nuclear antigen and chromosome 17 numeral aberrations.** *Ann Surg Oncol.* 2000;8(6):525-32.
- Tewes M, Aktas B, Welt A, Mueller S, Hauch S, Kimmig R and Kasimir-Bauer S. **Molecular profiling and predictive value of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: an option for monitoring response to breast cancer related therapies.** *Breast Cancer Res Treat.* 2009;115(3):581-90.
- Thiery JP. **Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression.** *Nat Rev Cancer.* 2002;2(6):442-54.
- Thomas C, Wiesner C, Melchior SW, Schmidt F, Gillitzer R, Thüroff JW and Pfitzenmaier J. **Urokinase-plasminogen-activator receptor expression in disseminated tumour cells in the bone marrow and peripheral blood of patients with clinically localized prostate cancer.** *BJU Int.* 2009;104(1):29-34.
- Thompson EW and Newgreen DF. **Carcinoma invasion and metastasis: A role for epithelial-mesenchymal transition?.** *Cancer Res.* 2005;65:5991-5.
- Thorsteinsson M, Söletormos G and Jess P. **Low number of detectable Circulating Tumor Cells in non-metastatic colon cancer.** *Anticancer Res.* 2011;31:613-8.

- Tímár J, Csuka O, Orosz Z, Jeney A and Kopper L. **Molecular pathology of tumor metastasis. II. Molecular staging and differential diagnosis.** *Pathol Oncol Res.* 2002;8(3):204-19.
- Tsapralis D, Panayiotides I, Peros G, Liakakos T and Karamitopoulou E. **Human epidermal growth factor receptor-2 gene amplification in gastric cancer using tissue microarray technology.** *World J Gastroenterol.* 2012;18(2):150-5.
- Tschentscher P, Wagener C and Neumaier M. **Sensitive and specific cytokeratin 18 reverse transcription-polymerase chain reaction that excludes amplification of processed pseudogenes from contaminating genomic DNA.** *Clin Chem.* 1997;43(12):2244-50.
- Tsouma A, Aggeli C, Lembessis P, Zografos GN, Korkolis DP, Pectasides D, Skondra M, Pissimissis N, Tzonou A and Koutsilieris M. **Multiplex RT-PCR-based detections of CEA, CK20 and EGFR in colorectal cancer patients.** *World J Gastroenterol.* 2010;16(47):5965-74.
- Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, Kaneko T, Iwase T, Akiyama F, Kato Y, Tsuda H, Ueda S, Sato K, Tamaki Y, Noguchi S, Kataoka TR, Nakajima H, Komoike Y, Inaji H, Tsugawa K, Suzuki K, Nakamura S, Daitoh M, Otomo Y and Matsuura N. **One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients.** *Clin Cancer Res.* 2007;13(16):4807-16.
- Ulmer A, Schmidt-Kittler O, Fischer J, Ellwanger U, Rassner G, Riethmüller G, Fierlbeck G and Klein CA. **Immunomagnetic enrichment, genomic characterization, and prognostic impact of circulating melanoma cells.** *Clin Cancer Res.* 2004;10(2):531-7.
- Umetani N, Mori T, Koyanagi K, Shinozaki M, Kim J, Giuliano AE and Hoon DS. **Aberrant hypermethylation of ID4 gene promoter region increases risk of lymph node metastasis in T1 breast cancer.** *Oncogene.* 2005;24(29):4721-7.
- Urban E, Nemethova M, Jacob S, Vinzenz M, Müller J and Small V. **A video tour of cell motility** [en línea]: Cytoskeleton, A video tour of cell motility, 2010. Vic Small lab of the Austrian Academy of Sciences in Salzburg and Vienna (IMBA). <<http://cellix.imba.oeaw.ac.at/cytoskeleton/>> [Consultado: 2011; Revisado: Abril, 2010].

Utsumi T, Yoshimura N, Maruta M, Takeuchi S, Ando J, Mizoguchi Y and Harada N. **Correlation of cyclin D1 mRNA levels with clinicopathological parameters and clinical outcome in human breast carcinomas.** *Int J Cancer.* 2000;89(1):39-43.

Vagunda V, Landys K, Kankkunen JP, Vagundova M, Hultborn R, Kovarik J and Hugosson J. **Bone marrow micrometastases in patients with stage I-II localised prostate cancer.** *Eur J Cancer.* 2001;37(15):1847-52.

van der Gun BTF, Wasserkort R, Monami A, Jeltsch A, Raskó T, Slaska-Kiss K, Cortese R, Rots MG, de Leij LF, Ruiters MH, Kiss A, Weinhold E and McLaughlin PM. **Persistent downregulation of the pancarcinoma-associated epithelial cell adhesion molecule via active intranuclear methylation.** *Int J Cancer.* 2008;123(2):484-9.

van Duijnhoven FJ, Bueno-De-Mesquita HB, Ferrari P, Jenab M, Boshuizen HC, Ros MM, Casagrande C, Tjønneland A, Olsen A, Overvad K, Thorlacius-Ussing O, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Morois S, Kaaks R, Linseisen J, Boeing H, Nöthlings U, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Misirli G, Palli D, Sieri S, Panico S, Tumino R, Vineis P, Peeters PH, van Gils CH, Ocké MC, Lund E, Engeset D, Skeie G, Suárez LR, González CA, Sánchez MJ, Dorronsoro M, Navarro C, Barricarte A, Berglund G, Manjer J, Hallmans G, Palmqvist R, Bingham SA, Khaw KT, Key TJ, Allen NE, Boffetta P, Slimani N, Rinaldi S, Gallo V, Norat T and Riboli E. **Fruit, vegetables, and colorectal cancer risk: The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition.** *Am J Clin Nutr.* 2009;89(5):1441-52.

van Heek NT, Tascilar M, van Beekveld JL, Drillenburger P, Offerhaus GJ and Gouma DJ. **Micrometastases in bone marrow of patients with suspected pancreatic and ampullary cancer.** *Eur J Surg Oncol.* 2001;27(8):740-5.

Varadhachary GR, Abbruzzese JL and Lezi R. **Diagnostic strategies for unknown primary cancer.** *Cancer.* 2004;100(9):1776-85.

Vasen HF. **Clinical diagnosis and management of hereditary colorectal cancer syndromes.** *J Clin Oncol.* 2000;18(21 Suppl):81S-92S.

Veridex, LLC: <http://www.documents.veridex.com/DocPages/IntlDocs.aspx?C=Spain>

Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccozzi R, Luini A, Aguilar M and Marubini E.

Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med.* 2002;347(16):1227-32.

Veronesi U, Marubini E, Mariani L, Galimberti V, Luini A, Veronesi P, Salvadori B and Zucali

R. Radiotherapy after breast-conserving surgery in small breast carcinoma: Long-term results of a randomized trial. *Ann Oncol.* 2001;12(7):997-1003.

Vignery A. **Macrophage fusion: Are somatic and cancer cells possible partners?.**

Trends Cell Biol. 2005;15(4):188-93.

Vinh-Hung V and Verschraegen C. **Breast-conserving surgery with or without**

radiotherapy: Pooled-analysis for risks of ipsilateral breast tumor recurrence and mortality. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(2):115-21.

Virchow R. **Cellular pathologie.** *Arch Pathol Anat Physiol Klin Med.* 1855;8:1-39.

Virchow R. **Cellular pathologie as based upon physiological and pathological histology.**

Twenty lectures delivered in the Pathological Institute of Berlin during the months of Februarum March and April, 1858. 2nd ed. 1989.

Visser M, Jiwa M, Horstman A, Brink AA, Pol RP, van Diest P, Snijders PJ and Meijer CJ.

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.

Vlems FA, Diepstra JH, Cornelissen IM, Ruers TJ, Ligtenberg MJ, Punt CJ, van Krieken JH,

Wobbes T and van Muijen GN. **Limitations of cytokeratin 20 RT-PCR to detect disseminated tumour cells in blood and bone marrow of patients with colorectal cancer: Expression in controls and downregulation in tumour tissue.** *Mol Pathol.* 2002;55(3):156-63.

Vlems FA, Diepstra JH, Punt CJ, Ligtenberg MJ, Cornelissen IM, van Krieken JH, Wobbes T,

van Muijen GN and Ruers TJ. **Detection of disseminated tumour cells in blood and bone marrow samples of patients undergoing hepatic resection for metastasis of colorectal cancer.** *Br J Surg.* 2003;90(8):989-95.

- Vogel I, Kalthoff H, Henne-Bruns D and Kremer B. **Detection and prognostic impact of disseminated tumor cells in pancreatic carcinoma.** *Pancreatology.* 2002;2(2):79-88.
- Vogelaar FJ, Mesker WE, Rijken AM, van Pelt GW, van Leeuwen AM, Tanke HJ, Tollenaar RA and Liefers GJ. **Clinical impact of different detection methods for disseminated tumor cells in bone marrow of patients undergoing surgical resection of colorectal liver metastases: a prospective follow-up study.** *BMC Cancer.* 2010;10:153.
- Vona G, Sabile A, Louha M, Sitruk V, Romana S, Schütze K, Capron F, Franco D, Pazzagli M, Vekemans M, Lacour B, Brechot C and Paterlini-Bréchot P. **Isolation by size of epithelial tumor cells: A new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells.** *Am J Pathol.* 2000;156(1):57-63.
- Wang JY, Lin SR, Lu CY, Chen CC, Wu DC, Chai CY, Chen FM, Hsieh JS and Huang TJ. **Gastric cancer cell detection in peritoneal lavage: RT-PCR for carcinoembryonic antigen transcripts versus the combined cytology with peritoneal carcinoembryonic antigen levels.** *Cancer Lett.* 2005;223(1):129-35.
- Wang JY, Wu CH, Lu CY, Hsieh JS, Wu DC, Huang SY and Lin SR. **Molecular detection of circulating tumor cells in the peripheral blood of patients with colorectal cancer using RT-PCR: Significance or prediction of postoperative metastasis.** *World J Surg.* 2006;30(6):1007-13.
- Wang S, Liu K, Liu J, Yu ZT, Xu X, Zhao L, Lee T, Lee EK, Reiss J, Lee YK, Chung LW, Huang J, Rettig M, Seligson D, Duraiswamy KN, Shen CK and Tseng HR. **Highly efficient capture of circulating tumor cells by using nanostructured silicon substrates with integrated chaotic micromixers.** *Angew Chem Int Ed Engl.* 2011a;50(13):3084-8.
- Wang X, Qian X, Beitler JJ, Chen ZG, Khuri FR, Lewis MM, Shin HJ, Nie S and Shin DM. **Detection of circulating tumor cells in human peripheral blood using surface-enhanced Raman scattering nanoparticles.** *Cancer Res.* 2011b;71(5):1526-32.
- Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, Ueki T, Satriano R, Haller DG, Benson III AB and Hamilton SR. **Molecular predictors of survival adjuvant chemotherapy for colon cancer.** *New Engl J Med.* 2001;344(16):1196-206.

- Waterman-Storer CM and Salmon ED. **Actomyosin-based retrograde flow of microtubules in the lamella of migrating epithelial cells influences microtubule dynamic instability and turnover and is associated with microtubule breakage and treadmilling.** *J. Cell Biol.* 1997;139:417-34.
- Watts CK, Brady A, Sarcevic B, deFazio A, Musgrove EA and Sutherland RL. **Antiestrogen inhibition of cell cycle progression in breast cancer cells is associated with inhibition of cyclin-dependent kinase activity and decreased retinoblastoma protein phosphorylation.** *Mol Endocrinol.* 1995;9(12):1804-13.
- Weber-Matthiesen K, Müller-Hermelink A, Deerberg J, Sherthan H, Schlegelberg B and Grote W. **Discrimination of distinct subpopulations within a tumor with combined double immunophenotyping and interphase cytogenetics.** *J Histochem Cytochem.* 1993;41:1641-4.
- Weber-Matthiesen K, Winkemann M, Müller-Hermelink A, Schlegelberg B and Grote W. **Simultaneous fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics: A contribution to the characterization of tumor cells.** *J Histochem Cytochem.* 1992;40:171-5.
- Weckermann D, Müller P, Wawroschek F, Harzmann R, Riethmüller G and Schlimok G. **Disseminated cytokeratin positive tumor cells in the bone marrow of patients with prostate cancer: Detection and prognostic value.** *J Urol.* 2001;166(2):699-703.
- Weihrauch MR, Skibowski E, Koslowsky T, Voiss W, Re D, Kuhn-Regnier F, Bannwarth C, Siedek M, Diehl V and Bohlen H. **Immunomagnetic enrichment and detection of micrometastases in colorectal cancer: Correlation with establish clinical parameters.** *J Clin Oncol.* 2002;20(21):4338-43.
- Weitz J, Kienle P, Lacroix J, Willeke F, Benner A, Lehnert T, Herfarth C and von Knebel Doeberitz M. **Dissemination of tumor cells in patients undergoing surgery for colorectal cancer.** *Clin Cancer Res.* 1998;4(2):343-8.
- Weitz J, Kienle P, Magener A, Koch M, Schrödel A, Willeke F, Autschbach F, Lacroix J, Lehnert T, Herfarth C and von Knebel Doeberitz M. **Detection of disseminated colorectal cancer cells in lymph nodes, blood and bone marrow.** *Clin Cancer Res.* 1999;5(7):1830-6.

- Went P, Dirnhofer W, Schöpf D, Moch H and Spizzo G. **Expression and prognostic significance of EpCAM.** *J Cancer Mol.* 2008;3(6):169-74.
- Went P, Vasei M, Bubendorf L, Terracciano L, Tornillo L, Riede U, Kononen J, Simon R, Sauter G and Baeuerle PA. **Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancer.** *Brit J Cancer.* 2006;94(1):128-35.
- Wharton RA, Jonas SK, Glover C, Khan ZA, Klokouzas A, Quinn H, Henry M and Allen-Mersh TG. **Increased detection of circulating tumor cells in the blood of colorectal carcinoma patients using two reverse transcription-PCR assays and multiple blood samples.** *Clin Cancer Res.* 1999;5(12):4158-63.
- Wiedswang G, Borgen E, Kåresen R, Kvalheim G, Nesland JM, Qvist H, Schlichting E, Sauer T, Janbu J, Harbitz T and Naume B. **Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer.** *J Clin Oncol.* 2003;21(18):3469-78.
- Wiedswang G, Borgen E, Kåresen R, Qvist H, Janbu J, Kvalheim G, Nesland JM and Naume B. **Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome.** *Clin Cancer Res.* 2004;10(16):5342-8.
- Willipinski-Stapelfeldt D, Riethdorf S, Assmann V, Woelfle U, Rau T, Sauter G, Heukeshoven J and Pantel K. **Changes in cytoskeletal prrotein composition indicative of an epithelial-mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells.** *Clin Cancer Res.* 2005;11:8006-14.
- Willis L, Alarcón T, Elia G, Jones JL, Wright NA, Tomlinson IPM, Graham TA and Page KM. **Breast cancer dormancy can be maintained by small numbers of micrometastases.** *Cancer Res.* 2010;70:4310-7.
- Wind J, Tuijnman JB, Tibbe AG, Swennenhuis JF, Richel DJ, van Berge Henegouwen MI and Bemelman WA. **Circulating tumour cells during laparoscopic and open surgery for primary colonic cancer in portal and peripheral blood.** *Eur J Surg Oncol.* 2009;35(9):942-50.
- Wittmann T and Waterman-Storer CM. **Cell motility: Can Rho GTPases and microtubules point the way?.** *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 21):3795-803.

- Witzig TE, Bossy B, Kimlinger T, Roche PC, Ingle JN, Grant C, Donohue J, Suman VJ, Harrington D, Torre-Bueno J and Bauer KD. **Detection of circulating cytokeratin-positive cells in the blood of breast cancer patients using immunomagnetic enrichment and digital microscopy.** *Clin Cancer Res.* 2002;8(5):1085-91.
- Woelfle U, Breit E, Zafrakas K, Otte M, Schubert F, Müller V, Izbicki JR, Löning T and Pantel K. **Bi-specific immunomagnetic enrichment of micrometastatic tumour cell clusters from bone marrow of cancer patients.** *J Immunol Methods.* 2005;300(1-2):136-45.
- Woelfle U, Sauter G, Santjer S, Brakenhoff R and Pantel K. **Down-regulated expression of cytokeratin 18 promotes progression of human breast cancer.** *Clin Cancer Res.* 2004;10:2670-4.
- Wong SC, Chan CM, Ma BB, Hui EP, Ng SS, Lai PB, Cheung MT, Lo ES, Chan AK, Lam MY, Au TC and Chan AT. **Clinical significance of cytokeratin 20-positive circulating tumor cells detected by a refined immunomagnetic enrichment assay in colorectal cancer patients.** *Clin Cancer Res.* 2009;15(3):1005-12.
- Wülfing P, Borchard J, Buerger H, Heidl S, Zänker KS, Kiesel L and Brandt B. **HER2-positive circulating tumor cells indicate poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients.** *Clin Cancer Res.* 2006;12(6):1715-20.
- Wülfing P, Kersting C, Buerger H, B Mattsson B, Mesters R, Gustmann C, Hinrichs B, Tio J, Böcker W and Kiesel L. **Expression patterns of angiogenic and lymphangiogenic factors in ductal breast carcinoma *in situ*.** *Br J Cancer.* 2005;92:1720-8.
- Yamamoto H, Sekimoto M, Oya M, Yamamoto N, Konishi F, Sasaki J, Yamada S, Taniyama K, Tominaga H, Tsujimoto M, Akamatsu H, Yanagisawa A, Sakakura C, Kato Y and Matsuura N. **OSNA-based novel molecular testing for lymph node metastases in colorectal cancer patients: Results from a multicenter clinical performance study in Japan.** *Ann Surg Oncol.* 2011;18(7):1891-8.
- Yang L, Lang JC, Balasubramanian P, Jatana KR, Schuller D, Agrawal A, Zborowski M and Chalmers JJ. **Optimization of an enrichment process for circulating tumor cells from the blood of head and neck cancer patients through depletion of normal cells.** *Biotechnol Bioeng.* 2009;102(2):521-34.

- You F, Roberts LA, Kang SP, Nunes RA, Dias C, Iglehart JD, Solomon NA, Friedman PN and Harris LN. **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.
- Young KH, Chan WC, Fu K, Iqbal J, Sanger WG, Ratashak A, Greiner TC and Weisenbruger DD. **Mantle cell lymphoma with plasma cell differentiation.** *Am J Surg Pathol.* 2006;30:954-61.
- Yun K, Merrie AE, Gunn J, Phillips LV and McCall JL. **Keratin 20 is a specific marker of submicroscopic lymph node metastases in colorectal cancer: Validation by K-RAS mutations.** *J Pathol.* 2000;191(1):21-6.
- Zach O, Kasparu H, Krieger O, Hehenwarter W, Girschikofsky M and Lutz D. **Detection of circulating mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients via a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for mammaglobin mRNA.** *J Clin Oncol.* 1999;17(7):2015-9.
- Zach O, Kasparu H, Wagner H, Krieger O and Lutz D. **Mammaglobin as a marker for the detection of tumor cells in the peripheral blood of breast cancer patients.** *Ann NY Acad Sci.* 2000;923:343-5.
- Zach O, Kasparu H, Wagner H, Krieger O and Lutz D. **Prognostic value of tumour cell detection in peripheral blood of breast cancer patients.** *Acta Med Aust Suppl.* 2002;59:32-4.
- Zehentner BK. **Detection of disseminated tumor cells: Strategies and diagnostic implications.** *Expert Rev Mol Diagn.* 2002;2(1):41-8.
- Zeisberg M and Neilson EG. **Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions.** *J Clin Invest.* 2009;119(6):1429-37.
- Zhang XW, Yang HY, Fan P, Yang L and Chen GY. **Detection of micrometastasis in peripheral blood by multi-sampling in patients with colorectal cancer.** *World J Gastroenterol.* 2005;11(3):436-8.

Zhang Y, Siebert R, Matthiesen P, Harder S, Theile M, Scherneck S and Schlegelberger B.

Feasibility of simultaneous fluorescence immunophenotyping and fluorescence *in situ* hybridization study for the detection of estrogen receptor expression and deletions of the estrogen receptor gene in breast carcinoma cell lines. *Virchows Arch.* 2000;436(3):271-5.

Zheng S, Lin HK, Lu B, Williams A, Datar R, Cote RJ and Tai YC. **3D microfilter device for**

viable circulating tumor cell (CTC) enrichment from blood. *Biomed Microdevices.* 2011;13(1):203-13.

Zia A, Schildberg FW and Funke I. **MHC class I negative phenotype of disseminated tumor**

cells in bone marrow is associated with poor survival in R0M0 breast cancer patients. *Int J Cancer.* 2001;93(4):566-70.

ANEXOS

**ANEXO 1: CLASIFICACIÓN DE LAS REVISTAS EN LAS QUE SE HAN
PUBLICADO LOS RESULTADOS DEL TRABAJO
EXPERIMENTAL DE LA TESIS, OBTENIDO DEL JCR
SCIENCE EDITION**

En este Anexo 1 se adjuntan los resúmenes de las clasificaciones de las revistas:

- *International Journal of Cancer*;
- *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*.

Correspondientes a las publicaciones realizadas en el trabajo experimental de esta tesis, obtenidas del *Journal Citation Reports (2010 JCR Science Edition)*.

También se adjunta el resumen de la clasificación de la revista *BMC Cancer*, a la cual se ha enviado el trabajo experimental expuesto en el tercer capítulo de *Trabajo experimental y Resumen global de los resultados* de esta tesis, para su publicación.

Rank in Category: **INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER****Journal Ranking**

For **2010**, the journal **INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER** has an Impact Factor of **4.926**.

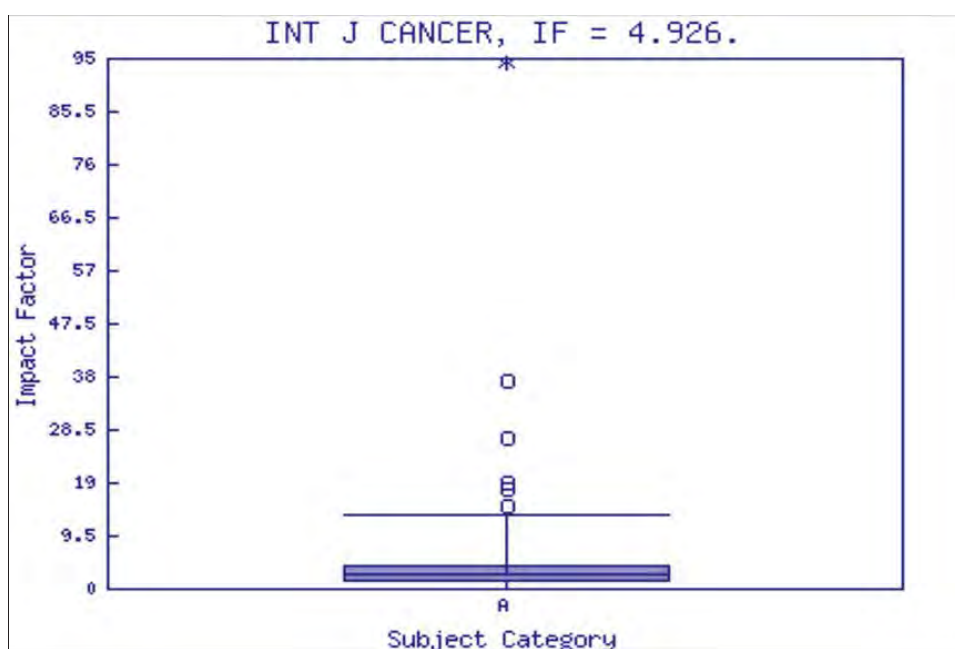
This table shows the ranking of this journal in its subject categories based on Impact Factor.

Category Name	Total Journals in Category	Journal Rank in Category	Quartile in Category
ONCOLOGY	185	32	Q1

Category Box Plot

For **2010**, the journal **INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER** has an Impact Factor of **4.926**.

This is a box plot of the subject category or categories to which the journal has been assigned. It provides information about the distribution of journals based on Impact Factor values. It shows median, 25th and 75th percentiles, and the extreme values of the distribution.



Key

A - ONCOLOGY



**Rank in Category: JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY & CYTOCHEMISTRY****Journal Ranking**

For **2010**, the journal **JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY & CYTOCHEMISTRY** has an Impact Factor of **2.381**.

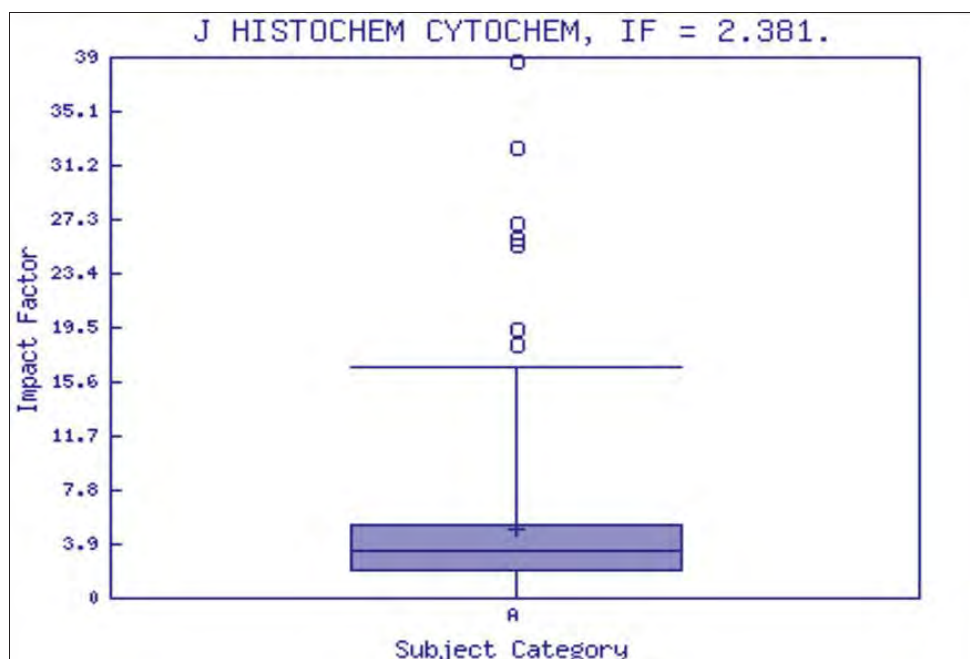
This table shows the ranking of this journal in its subject categories based on Impact Factor.

Category Name	Total Journals in Category	Journal Rank in Category	Quartile in Category
CELL BIOLOGY	178	116	Q3

Category Box Plot

For **2010**, the journal **JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY & CYTOCHEMISTRY** has an Impact Factor of **2.381**.

This is a box plot of the subject category or categories to which the journal has been assigned. It provides information about the distribution of journals based on Impact Factor values. It shows median, 25th and 75th percentiles, and the extreme values of the distribution.

**Key**

A - CELL BIOLOGY





Rank in Category: BMC CANCER

Journal Ranking

For **2010**, the journal **BMC CANCER** has an Impact Factor of **3.153**.

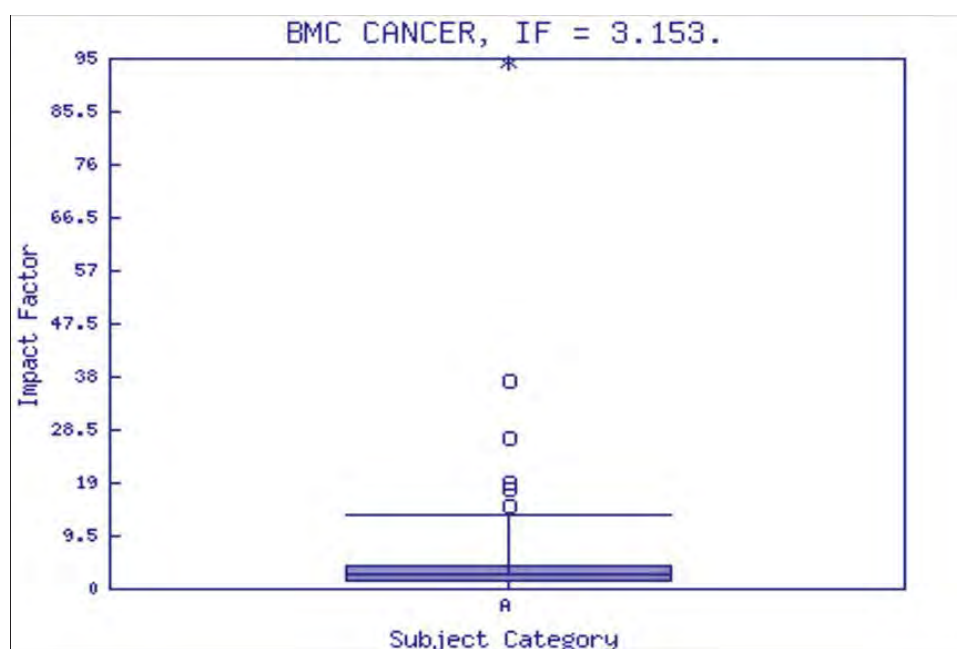
This table shows the ranking of this journal in its subject categories based on Impact Factor.

Category Name	Total Journals in Category	Journal Rank in Category	Quartile in Category
ONCOLOGY	185	66	Q2

Category Box Plot

For **2010**, the journal **BMC CANCER** has an Impact Factor of **3.153**.

This is a box plot of the subject category or categories to which the journal has been assigned. It provides information about the distribution of journals based on Impact Factor values. It shows median, 25th and 75th percentiles, and the extreme values of the distribution.



Key

A - ONCOLOGY



ANEXO 2: APORTACIÓN EXTRAORDINARIA RELEVANTE, PONENCIA EN CONGRESO INTERNACIONAL

En 2010, recibí una invitación a ser ponente en la “10th Euroconference on Clinical Cell Analysis of the European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) and the Iberian Society for Cytometry (SIC)”, congreso internacional desarrollado en Valencia. De la cual adjunto el resumen de la misma, con título **“Detection of Circulating Tumor Cells in human breast cáncer”**, publicado en la revista internacional *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)*, de la cual se adjunta el resumen de su clasificación obtenida del *Journal Citation Reports (2010 JCR Science Edition)*.

- Índice de impacto de la revista = 2,307
- Categoría a la que pertenece: Patología y Medicina Forense
- Cuartil: segundo cuartil
- Rango que ocupa: 37/76 y 12/31

ESCCA and SIC 2010 Abstracts

Abstracts from the 10th Euroconference on Clinical Cell Analysis of the European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) and the Iberian Society for Cytometry (SIC)

PLE-1-01

THE EU-FUNDED EUROFLOW PROJECT (LSHB-CT-2006-018708): BACKGROUND, CURRENT ACHIEVEMENTS AND FUTURE PERSPECTIVES

Jacques J.M. van Dongen,¹ Alberto Orfao²

¹Erasmus MC, ROTTERDAM, The Netherlands

²Cytometry Service, Dept of Medicine & Cancer Research Centre, University of Sala, SALAMANCA, Spain

Flow cytometric immunophenotyping is widely used for the diagnosis, classification, and monitoring of hematological malignancies. However, molecular techniques have a strong position for classification and monitoring of residual disease, despite several major disadvantages, such as their labor-intensive and time consuming character, limited applicability and no focus on cell populations within a sample, unless preceding purification steps are performed. These limitations can be overcome by innovations in flow cytometry immunophenotyping because this technology fulfills the requirements of high speed, accurate focusing on malignant cell population as well as broad applicability for the diagnosis and follow-up of virtually all hematological malignancies.

Consequently, the EuroFlow Consortium worked for 4 years on several Work Packages with special focus on:

- 1) the development of new antibodies for the detection of intracellular (onco)proteins,
- 2) application of a novel immunobead technology for fast and easy detection of fusion proteins for classification of acute leukemias,
- 3) the development of new software tools for easy and reproducible data analysis,
- 4) the design and evaluation of 8-color antibody panels and instrument set-up procedures for the diagnosis, classification and monitoring of patients with different types of hematological diseases.

The combination of panels and software tools allows easy evaluation of the immunophenotypic profile of a given cell population against reference data of multiple normal and pathological samples stained with the same antibody panels. This work was performed by 14 academic diagnostic teams and 2 small-sized biotech companies.

Juan Flores-Montero,¹ Julia Almeida,¹ Sebastian Bottcher,⁵ Ludovic Lhermite,⁶ Tomas Kalina,⁷ Lukas Sedek,⁸ Vincent H.J. van der Velden,⁹ Matthew Cullen,¹⁰ Paulo Lucio,¹¹ Jacques J.M. van Dongen,⁹ EuroFlow Consortium¹²

¹University of Salamanca, SALAMANCA, Spain

²Instituto de Pediatria e Puericultura Martagão

Gesteira and Departamento de Clínica, RIO DE JANEIRO, Brazil

³Faculty of Medicine and COPPE - Engineering Graduate Program, UFRJ/Federal Univ, RIO DE JANEIRO, Brazil

⁴Cytognos SL, SALAMANCA, Spain

⁵University Klinik Schleswig-Holstein, KIEL, Germany

⁶Hopital Necker, PARIS, France

⁷Charles University, PRAGUE, Czech Republic

⁸Medical University of Silesia, ZABRZE, Poland

⁹University Medical Center Rotterdam, ROTTERDAM, The Netherlands

¹⁰St James University Hospital, LEEDS, United Kingdom

¹¹Instituto Portugues de Oncologia, LISBON, Portugal

¹²Spain

In recent years, the EuroFlow Consortium has developed new and unique tools which can be applied to a more comprehensive and objective evaluation of the performance of multicolor antibody panels, for example, leukemia/lymphoma phenotyping. The new strategy is based on the transformation of a set of ≥ 2 data files containing information about the same sample into a single data file. If the merged data files correspond to different stainings of the same sample containing common backbone parameters that allow unequivocal identification of the cell populations of interest in that sample, merging of the data files can be followed by an accurate calculation of the “missing values”. As a result, all individual events from each of the original data files will contain information about each reagent in the whole panel evaluated in all aliquots stained for the same sample. Based on this strategy, one or more cell populations from one or multiple samples can now be compared with other (e.g. reference) cell populations from one, or a pool of ≥ 2 different samples. To a certain extent, this allows objective comparison of the immunophenotypic profiles

PLE-1-02

EUROFLOW DESIGN OF SOFTWARE TOOLS TO BUILD MULTICOLOR ANTIBODY PANELS FOR LEUKEMIA/LYMPHOMA PHENOTYPING

Alberto Orfao,¹ Quentin Lecomte,¹ Elaine S. Costa,²

Carlos E. Pedreira,³ Marta Martin,⁴ Juan Hernandez,⁴ Miguel Muñoz,⁴

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)
DOI: 10.1002/cyto.b.20563

CD161. In humans, two major subsets of natural killer T cells have been described. The more widely studied subset are the invariant NKT cells (or type I), which express a highly restricted T cell receptor with an invariant V α 24-J α 18 chain, preferably paired with V β 11, and are dependent on the presentation of the glycolipid antigen through CD1d, a member of class I non-polymorphic antigen presenting molecules. The second class of NKT cells (or type II), CD1d-independent cells, expresses a TCR α/β repertoire and is independent of CD1d for their activity. We recently demonstrated the expansion of pulmonary NKT cells in patients with hypersensitivity pneumonitis. The major NKT phenotype in hypersensitivity pneumonitis was non-biased CD3+CD8+CD56+. Furthermore, NKT cells might contribute to the amplified and prolonged CD4-positive Th1 response that characterizes sarcoidosis. We showed significant reduction of invariant NKT cells both in the lung and in peripheral blood of patients with sarcoidosis. Moreover, we demonstrated that this deficiency was associated with changes in SLAM/SAP signaling, which is a major pathway involved in invariant NKT cell development. Finally, we recently closely followed the progress of invariant NKT cells and SLAM/SAP signaling in the peripheral blood of patients with sarcoidosis and in control subjects over a long period.

PAR-3E-02

T CELL ACTIVATION IN EXACERBATIONS OF REFRACTORY ASTHMA

Antoine Magnan,¹ Karine Botturi-Cavaillès²

¹*l'Institut du Thorax, NANTES, France*

²*INSERM, NANTES, France*

Refractory asthma is an ultimate form of asthma defined by a high frequency of exacerbations in patients already treated with high doses of inhaled steroids, long acting beta-2 agonists and frequently oral corticosteroids. Severe exacerbations represent the main issue in refractory asthma management, inducing heavy costs, leading to emergency care requirement and, all too often, intensive care treatment and ultimately, death. It is therefore necessary to dispose of valid early markers of exacerbations, robust enough to intensify the asthma treatment before symptoms.

Asthma results from an inflammatory reaction mainly driven by Th2 cells and eosinophils. Exacerbations are triggered by allergens, pollutants and viruses.

Induced sputum is an easy and safe procedure to collect bronchial cells and can be repeated in the same subjects longitudinally.

We performed a study in induced sputum from refractory asthmatics to detect whether a change in T cell cytokine production could predict an exacerbation. Samples were obtained in stable state before, during and after 16 exacerbations in 30 patients. Blood samples were taken concomitantly.

IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-13 T cell production was detected by flow cytometry in T cells and in the CD8+ subset. A mixed Th1/Th2 activation was detected before exacerba-

tions that lasted during exacerbations but returned to baseline thereafter. A similar profile was observed in blood and induced sputum. A new study is in process to validate the blood T cell activation as a biomarker, taking viral infections into account.

This study was sponsored by the Programme Hospitalier de Recherche Clinique, INSERM, and Région Pays de La Loire.

PAR-3E-03

CELLULAR IMMUNITY AGAINST TB IN BLOOD AND BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUID

Simon Barry

University Hospital Llandough, CARDIFF,

United Kingdom

In the majority of cases tuberculosis (TB) is controlled by the human host and only approximately 10% of asymptomatic infected individuals develop active TB disease over their lifetime. The fact that HIV co-infection, which selectively depletes CD4+ T cells, increases this chance of reactivation from 10% per lifetime to 10% per annum emphasises the role of immunoregulation of TB. Furthermore, studies of knockout mice that lack the capacity to generate type-I cytokine responses, together with rare cases of humans lacking IL-12 and IFN- γ receptors, have highlighted the most important mechanisms involved in immune control. It is well appreciated that mycobacterium tuberculosis is usually acquired by inhalation and results in predominantly respiratory disease. It follows that anti-TB defences will concentrate at the site of infection and that the focus of investigation should be lung based. Flow cytometry, investigating functional lung T lymphocyte responses following short term incubation with TB antigens, is the optimum tool for studying the immune response to TB. It has been demonstrated that lung CD4+ T lymphocyte IFN- γ and TNF- α responses following incubation with purified protein derivative (PPD) were 300 fold greater than in the blood. A dominant lung CD4+ T lymphocyte response is also seen in non-pulmonary TB. Interestingly, prior BCG vaccination does not influence the lung responses to PPD, unlike in the blood where the discriminatory RD-1 antigens, ESAT-6 and CFP-10 must be used. In subjects with advanced, cavitary lung disease, there is a waning of the lung lymphocyte responses and an accompanying neutrophilia, perhaps indicative of a loss of immune control.

PAR-3S-01

DETECTION OF CIRCULATING TUMOR CELLS IN HUMAN BREAST CANCER

María Campos, José Juan Gaforio, Fernando Warleta,

Cristina Sánchez-Quesada

University of Jaén, JAÉN, Spain

Breast cancer (BC) is the most frequent type of cancer and the third highest cause of cancer death in European women because of its high incidence and good prognosis.

Frequently, death results from the development of metastases.

BC has been shown to shed tumor cells into the circulation, even at the earliest stages of primary tumor development, and these cells have been isolated in peripheral blood (PB) and in bone marrow. Pretlow et al. (2000) have demonstrated that Circulating Tumor Cells (CTCs) isolated from PB of cancer patients are able to develop metastasis. Thus, the early detection of CTCs may have important therapeutic and prognostic implications. Nowadays, it has been demonstrated that bone marrow tumor cell detection in BC is a known prognostic factor for disease-free and overall survival, and the detection of CTCs in PB has clinical relevance, not just as an indicator of overall survival, but also as disease progression, as confirmed by our group. In short, our results showed that CTCs cells in PB were identified in 62% of BC patients. There were significant differences in the presence of CTCs according to estrogen receptor expression ($p=0.049$), and lymph node status ($p=0.033$), but not to other characteristics. The median follow-up was 21 months and the detection of CTCs, before starting the chemotherapy, in these patients was significantly correlated with progression-free survival ($p=0.058$) and overall survival ($p=0.003$).

Recently, we published a novel method enabling simultaneous immunophenotyping and genetic analyses of CTCs. This could be useful for a better classification of patients according to genetic features of CTCs and for the application of specific therapies.

PAR-3S-02

MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES

Neus Villamor

Unitat d'Hematopatologia, Hospital Clinic de Barcelona, BARCELONA, Spain

Multiparametric flow cytometry (MFC) plays a major role in the diagnosis of hematological malignancies and is becoming more important in the evaluation of the response. The persistence/reappearance of submicroscopic leukemic cells is an important post-treatment prognostic factor for the outcome of patients with acute leukemia (AL), chronic lymphocytic leukemia (CLL) and multiple myeloma (MM). The MFC assay for MRD is generally less sensitive than molecular techniques, but it is also less complex. The detection of leukemic associated phenotype (LAIP) is the basis of MRD assay. The use of ≥ 4 antigenic combinations with core and specific markers allows a sensitivity of 0.01% abnormal cells in the majority of acute lymphoblastic leukemia, CLL and MM patients. This sensibility is only obtained in half the cases with acute myeloblastic leukemia. The most important source of false positive and negative results in the MRD assay in patients with AL is the presence of leukemic subpopulations at diagnosis, changes induced by therapy and phenotypic shifts during follow-up. Although MRD results are used to stratify patients with AL in post-induction therapy, the clinically relevant time-points

and cut-off values have not been clearly established. In CLL or MM, a MRD test reaching a sensitivity of at least 0.01% is required to consider a patient to be in CR MRD negative. In hematological diseases, the criteria of CR is moving from morphology to MRD, and the challenge in the future is the standardization of methodology and terminology for MRD detection in each type of disease and to provide a common base for clinicians to compare results between different clinical trials.

PAR-3S-03

POLYCHROMATIC FLOW CYTOMETRY STUDIES OF DENDRITIC CELLS AND MONOCYTES IN AUTOIMMUNE DISEASES.

Jorge Monserrat,¹ Miguel Angel Sanchez,² Ana Sanchez Atrio,³

Ana Perez,³ Maria Jose Leon,³ Luis Chara,² David Diaz,²

Hugo Barcenilla,² Zaida Moreno,² Alfredo Prieto,²

Eduardo Reyes,² Melchor Alvarez-Mon³

¹*Universidad de Alcala, ALCALA DE HENARES, Spain*

²*Lab. de enfermedades del S. Inmune. Dto. Medicina.*

F. Medicina. UAH. CSIC/IMMPA, ALCALA DE HENARES, Spain

³*Servicio de enfermedades del Sistema Inmune (ESI).*

Hospital Principe de Asturias, ALCALA DE HENARES, Spain

Dendritic cell (DCs) and monocyte studies have been demonstrated to be important for the comprehension of the different mechanisms in human pathologies. Newer markers appear in peripheral blood which study their distribution and activation stage.

Objective: By using polychromatic flow cytometry in 11 colors, we have studied the distribution and activation subsets of monocytes and DCs in peripheral blood from autoimmune diseases patients with or without biological treatments (anti-TNF α).

Methods: We have studied peripheral blood monocytes and DCs from patients with rheumatoid arthritis (RA), Crohn's Disease and healthy controls. For surface labeling antibodies against the antigens on monocytes we used: CD(3,56,19,14,16,62L,11b), Slan, HLA-DR, CX3CR1 and dead cells exclusion probe; and on DCs: CD(3,56,19,14,16,11c,1c,62L,11b), HLA-DR, CX3CR1 and dead cells probe. We acquired in a FACS Aria.

Results: We found significant differences in the number of plasmacytoid and myeloid I cells that were decreased in RA and Crohn patients with regard to healthy controls. After 12 months of anti-TNF α treatment, the levels were normalized in both groups of patients. Myeloid cells and plasmacytoid cells showed a significant decrease in the CD62L+CX3CR1+ and CD11b+CD62L+ expression respectively, with a significant increase after 12 months of treatment. In monocytes, we found that RA and Crohn patients showed a decrease of classical monocytes defined CD14Br+CD16- and showed an increase of transition subsets defined by CD14Br+CD16Br/Lw+.

Conclusions: Anti-TNF α treatment is able to normalize the distribution and activation stage of peripheral blood monocytes and DCs in RA and Crohn patients.



Rank in Category: CYTOMETRY PART B-CLINICAL CYTOMETRY

Journal Ranking ⓘ

For **2010**, the journal **CYTOMETRY PART B-CLINICAL CYTOMETRY** has an Impact Factor of **1.960**.

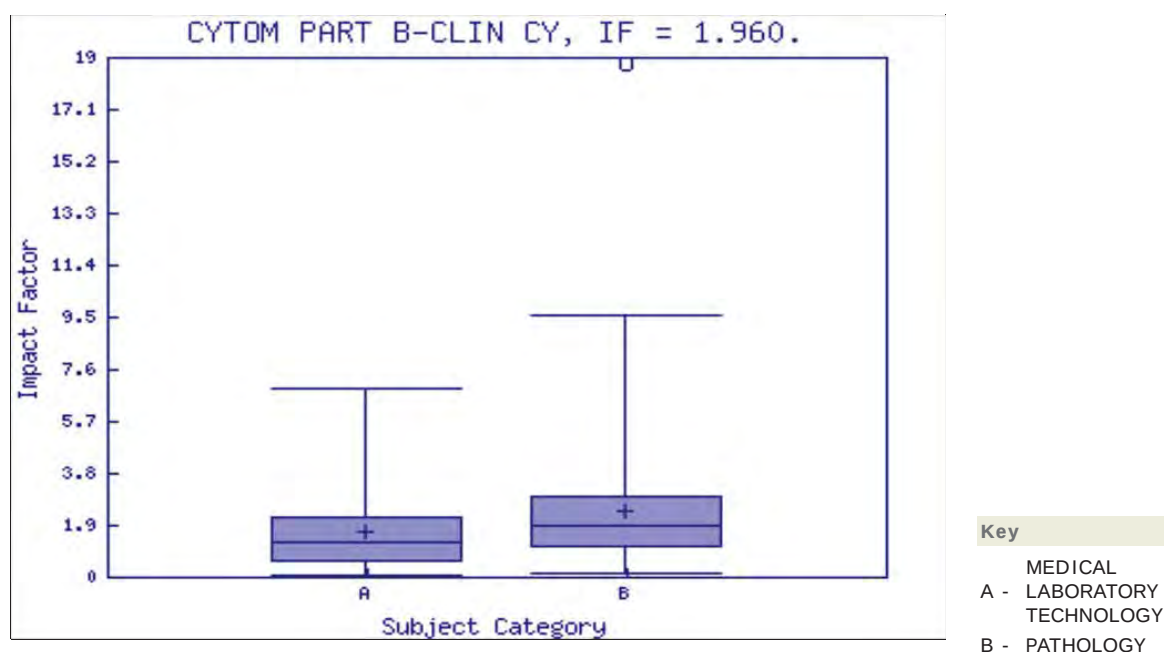
This table shows the ranking of this journal in its subject categories based on Impact Factor.

Category Name	Total Journals in Category	Journal Rank in Category	Quartile in Category
MEDICAL LABORATORY TECHNOLOGY	31	12	Q2
PATHOLOGY	76	37	Q2

Category Box Plot ⓘ

For **2010**, the journal **CYTOMETRY PART B-CLINICAL CYTOMETRY** has an Impact Factor of **1.960**.

This is a box plot of the subject category or categories to which the journal has been assigned. It provides information about the distribution of journals based on Impact Factor values. It shows median, 25th and 75th percentiles, and the extreme values of the distribution.



**ANEXO 3: APORTACIONES, REFERENTES AL TEMA DE LA TESIS,
PRESENTADAS EN CONGRESOS INTERNACIONALES
QUE CONLLEVAN PUBLICACIÓN EN REVISTAS DE
ALTO IMPACTO**

En 2007 se realizó una aportación al congreso “2007 American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting”, cuya referencia se detalla más adelante, publicada en la revista internacional *Journal of Clinical Oncology*.

- Índice de impacto de la revista = 18,970
- Categoría a la que pertenece: Oncología
- Cuartil que ocupa: primer cuartil
- Rango en la categoría (2010): 4/185

Publicación:

Serrano M, Sánchez-Rovira P, **Campos M**, Warleta F, Ruiz-Mora J, Algarra I, Delgado-Rodríguez M, Fernández M, de la Torre C, Peiró A and Gaforio JJ. **Persistence of circulating tumour cells after treatment predicts clinical outcome in breast cancer patients.** *J Clin Oncol.* (Meeting Abstracts) 2007; 25(18S, 20 Supplement):21080.

En este Anexo 3 se adjunta el resumen de la aportación al congreso y de la clasificación de la revista obtenida del *Journal Citation Reports (2010 JCR Science Edition)*.

Journal of Clinical Oncology, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition).
Vol 25, No 18S (June 20 Supplement), 2007: 21080
© 2007 American Society of Clinical Oncology

Abstract

Persistence of circulating tumour cells after treatment predicts clinical outcome in breast cancer patients

M. Serrano, P. Sánchez-Rovira, M. Campos, F. Warleta, J. Ruiz-Mora, I. Algarra, M. Delgado-Rodríguez, M. Fernández, C. de la Torre, A. Peiró and J. J. Gaforio

University of Jaén, Jaen, Spain; University Hospital, Jaen, Spain; Lilly Company, Madrid, Spain

21080

Background: The hematogenous distant metastasis is the leading cause of cancer death. This process involves the passage through the blood and lymphatic circulation of circulating tumor cells (CTC) with metastatic properties. Thus, the early detection of such cells has important implication for cancer prognosis, monitoring of treatment and to predict clinical outcome. We present the results that showed that CTC are prognostic factor after chemotherapy independently of treatment. **Methods:** A total of 59 patients with breast cancer were enrolled in this study between April 2000 and December 2002. The median follow-up was 50 months. All patients received chemotherapy as first line treatment. Results of this work included CTC detection one month after of the end of chemotherapy. After informed consent, 10ml of heparinized peripheral blood was collected from patients. For enrichment of CTC we use the Carcinoma Cell Enrichment and Detection kit using MACS technology (Miltenyi Biotec). After enrichment of epithelial tumor cells immunomagnetic labeled with a multi-cytokeratin-specific antibody, the positive cells were detected by immunocytochemical staining with alkaline phosphatase substrate. **Results:** Analysis of CTC after chemotherapy: Circulating tumor cells were detected in 32 patients (54.23%). A mean number of cells were detected 3.7 (SD 13.9; range 1–105). The number of CTC was correlated with progression free of disease (PFS) and overall survival (OS). In the univariate Cox proportional hazard regression analysis number cells were significantly associated with OS ($p = 0.020$) and PFS ($p = 0.008$). In the multivariate Cox proportional hazard regression analysis, number cells admit borderline statically significance with PFS ($p = 0.052$) and OS ($p = 0.071$). **Conclusions:** Our results suggest that the persistence of CTC after the treatment predicts clinical outcome and therefore the detection of CTC in breast cancer patients might allow monitoring of chemotherapy response.

No significant financial relationships to disclose.

Table of Contents

This Article

J Clin Oncol (Meeting Abstracts) June 2007 vol. 25 no. 18_suppl 21080

» Meeting Abstract

- Classifications

Abstract

- Services

Alert me when this article is cited

Alert me if a correction is posted

Similar articles in this journal

Request permissions

+ Citing Articles

+ Google Scholar

+ PubMed

+ Social Bookmarking

Visit Other ASCO Sites

Copyright © 2012 by the American Society of Clinical Oncology

JOURNAL OF
ONCOLOGY
PRACTICE

ASCO
American Society of Clinical Oncology

Cancer.Net

CONQUER
CANCER
FOUNDATION

ASCO University



Rank in Category: JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY

Journal Ranking

For **2010**, the journal **JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY** has an Impact Factor of **18.970**.

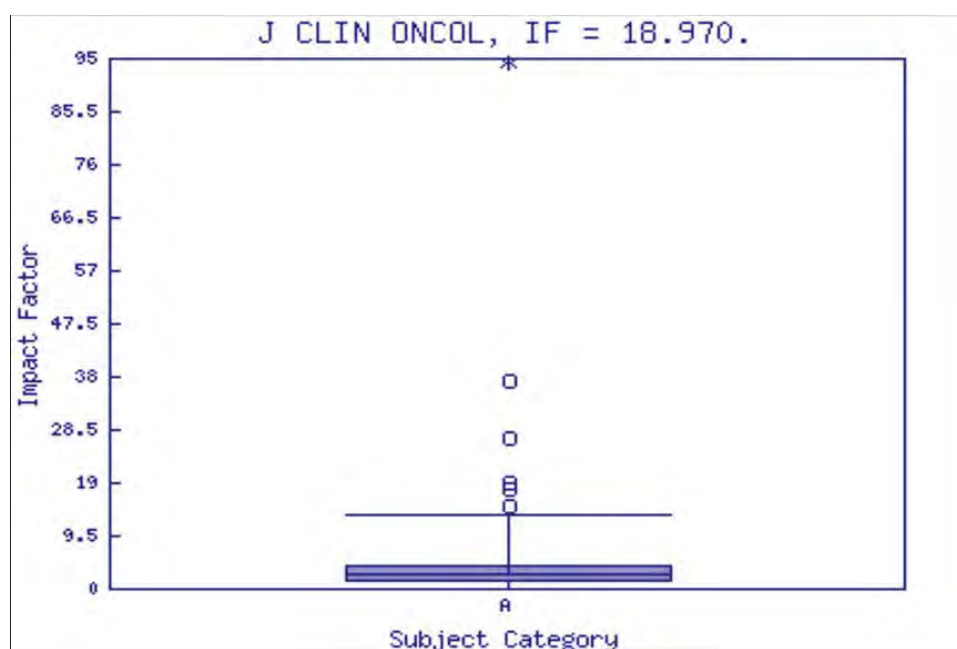
This table shows the ranking of this journal in its subject categories based on Impact Factor.

Category Name	Total Journals in Category	Journal Rank in Category	Quartile in Category
ONCOLOGY	185	4	Q1

Category Box Plot

For **2010**, the journal **JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY** has an Impact Factor of **18.970**.

This is a box plot of the subject category or categories to which the journal has been assigned. It provides information about the distribution of journals based on Impact Factor values. It shows median, 25th and 75th percentiles, and the extreme values of the distribution.



Key

A - ONCOLOGY



ANEXO 4: APORTACIÓN DE TRABAJOS PUBLICADOS NO REFERENTES AL TRABAJO DE LA TESIS

Durante mi formación como personal investigador y el desarrollo de esta tesis, he participado en otros proyectos de nuestro grupo de investigación “Inmunología Tumoral” junto con personal del Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) Centro “Venta del Llano”, de las cuales surgieron las publicaciones que se detallan a continuación.

Publicaciones:

Warleta F, Sánchez-Quesada C, **Campos M**, Allouche Y, Beltrán G and Gaforio JJ. **Hydroxytyrosol protects against oxidative DNA damage in human breast cells.** *Nutrients*. 2011;3:839-57.

Warleta F, **Campos M**, Sánchez C y Gaforio JJ. **Uso de la Electroforesis Unicelular Alcalina (Comet assay) para la identificación de componentes naturales de los alimentos con propiedades preventivas del daño oxidativo al ADN celular.** *Lifescienceslab* 2011;Mayo-Junio:72-74

Allouche Y, Warleta F, **Campos M**, Sánchez-Quesada C, Uceda M, Beltrán G and Gaforio JJ. **Antioxidant, antiproliferative, and pro-apoptotic capacities of pentacyclic triterpenes found in the skin of olives on MCF-7 human breast cancer cells and their effects on DNA damage.** *J Agric Food Chem*. 2011;59:121-30.

Warleta F, **Campos M**, Allouche Y, Sánchez-Quesada C, Ruiz-Mora J, Beltrán G and Gaforio JJ. **Squalene protects against oxidative DNA damage in MCF10A human mammary epithelial cells but not in MCF7**

and MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Food Chem Toxicol.* 2010;48:1092-100.

De estas publicaciones, dos de ellas ocupan posiciones relevantes según el *Journal Citation Reports (2010 JCR Science Edition)*:

- *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*
 - Índice de impacto = 2,816
 - Categoría a la que pertenece: Agricultura Multidisciplinar
 - Cuartil que ocupa: primer cuartil.
 - Rango en la categoría (2010): 2/55.
- *Food and Chemical Toxicology.*
 - Índice de impacto de la revista = 2,602
 - Categoría a la que pertenece: Ciencia y Tecnología de los Alimentos
 - Cuartil que ocupa: primer cuartil
 - Rango en la categoría (2010): 16/128.

Cabe destacar que la publicación **“Squalene protects against oxidative DNA damage in MCF10A human mammary epithelial cells but not in MCF7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells”**, fue catalogada por *Thomson Reuters* como **“Fast Breaking Paper”**⁽¹⁾ en Junio de 2011, en el campo de las Ciencias Agrícolas (<http://sciencewatch.com/dr/fbp/2011/11junfbp/>).

En este Anexo 4 se adjuntan las cuatro publicaciones referidas anteriormente y el resumen de la clasificación de las revistas, en las que están publicadas, obtenidas del *Journal Citation Reports (2010 JCR Science Edition)*.

⁽¹⁾ **Fast Breaking Papers:** Artículos con mayor incremento porcentual en citaciones en sus respectivas áreas de conocimiento según el **Essential Science IndicatorsSM** del *Thomson Reuters*. Representan el 1% de los principales trabajos en cada área de conocimiento por año.

Article

Hydroxytyrosol Protects against Oxidative DNA Damage in Human Breast Cells

Fernando Warleta ^{1,2}, Cristina Sánchez Quesada ^{1,2}, María Campos ^{1,2}, Yosra Allouche ^{1,2,3}, Gabriel Beltrán ^{2,3} and José J. Gaforio ^{1,2,*}

¹ Immunology Division, Department of Health Sciences, Faculty of Experimental Sciences, University of Jaén, Campus las Lagunillas s/n, 23071 Jaén, Spain;
E-Mails: fwarleta@ujaen.es (F.W.); csquesad@ujaen.es (C.S.Q.); mcampos@ujaen.es (M.C.); yosraallouche@yahoo.fr (Y.A.)

² Agrifood Campus of International Excellence, ceiA3, Spain

³ Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera y de la Producción Ecológica (IFAPA), Centro “Venta del Llano”, 23620 Mengibar, Spain;
E-Mail: gabriel.beltran@juntadeandalucia.es

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: jgaforio@ujaen.es;
Tel.: +34-953212002; Fax: +34-953211851.

Received: 27 July 2011; in revised form: 8 September 2011 / Accepted: 14 September 2011 /

Published: 13 October 2011

Abstract: Over recent years, several studies have related olive oil ingestion to a low incidence of several diseases, including breast cancer. Hydroxytyrosol and tyrosol are two of the major phenols present in virgin olive oils. Despite the fact that they have been linked to cancer prevention, there is no evidence that clarifies their effect in human breast tumor and non-tumor cells. In the present work, we present hydroxytyrosol and tyrosol's effects in human breast cell lines. Our results show that hydroxytyrosol acts as a more efficient free radical scavenger than tyrosol, but both fail to affect cell proliferation rates, cell cycle profile or cell apoptosis in human mammary epithelial cells (MCF10A) or breast cancer cells (MDA-MB-231 and MCF7). We found that hydroxytyrosol decreases the intracellular reactive oxygen species (ROS) level in MCF10A cells but not in MCF7 or MDA-MB-231 cells while very high amounts of tyrosol is needed to decrease the ROS level in MCF10A cells. Interestingly, hydroxytyrosol prevents oxidative DNA damage in the three breast cell lines. Therefore, our data suggest that simple phenol hydroxytyrosol could contribute to a lower incidence of breast cancer in populations that consume virgin

olive oil due to its antioxidant activity and its protection against oxidative DNA damage in mammary cells.

Keywords: breast cancer; Mediterranean diet; olive oil minor compounds; hydroxytyrosol; tyrosol; phenols; oxidative stress; reactive oxygen species; DNA damage

1. Introduction

Olive oil is the major source of fats in the Mediterranean diet and is considered to be responsible for the health benefits associated with this diet. In fact, it has been demonstrated that people who consume virgin olive oil (VOO) present a lower incidence of several cancers, including breast cancer [1]. This effect has previously been attributed to the high content of monounsaturated fatty acids. However, more recently, the importance of the minor constituents of olive oil has been considered [2]. Over the last five decades, several publications have firmly established that ingestion of small quantities of certain compounds isolated from plants can lower the risk of cancer in mammals exposed to carcinogens, including polyphenols [3].

VOO contains relatively high amounts of minor compounds compared to other oils (refined olive oil or seed oils). Among these, phenolic compounds are present at levels between 200 and 1500 mg/kg [4] depending on the olive tree variety, climatic and agronomic conditions, degree of maturation at harvest, and the manufacturing process [4]. At present, there are many studies reporting biological activities *in vitro*, *in vivo* and in clinical assays of phenolic compounds naturally present in VOO. Between them, anti-inflammatory, cardioprotective antioxidant and chemopreventive effects in breast and other types of cancers have been defined [5]. The major phenols identified in olive oils include the simple phenols hydroxytyrosol (HT) and tyrosol (TY), secoiridoids and lignans [2]. The concentration of TY is always higher than of HT [6]. Hydrolysis of secoiridoid during olive oil storage results in the formation of HT and TY [7].

It has been well established that HT is a potent antioxidant because of its marked antioxidant activity, its ability to scavenge oxygen and nitrogen free radicals, to inhibit Low Density Lipoprotein (LDL) oxidation, platelet aggregation and endothelial cell activation and its protection against DNA damage [2,8]. HT was able to reduce the synthesis of prostaglandin E2 blocking the transcription of COX-2 and 5-lipoxygenase, thereby reducing the chronic influence associated with diseases such as cancer [9]. TY has been described as exerting a weak antioxidant activity, although it is able to scavenge peroxynitrite and superoxide radicals, inhibit LDL oxidation in Caco2 cells and inhibit LPS-induced cytokines release from human monocytes [10,11].

It has been suggested that HT and TY compounds might have preventive activity against breast cancer, but, at present, the exact role played by these phenols in breast cancer prevention is still unknown. In this sense, despite epidemiological evidence, *in vitro* experiments have not been conducted to check if there are different effects of the simple phenols HT and TY between human breast cancer cells and human breast non-cancer cells.

The present study attempts to provide new insights into the antioxidant capacity of HT and TY and the *in vitro* effects on proliferation, cell cycle progression, apoptosis, reactive oxygen species (ROS)

production and oxidative DNA damage in the human breast epithelial MCF10A cell line and the human breast MCF7 and MDA-MB-231 cancer cell lines.

2. Experimental Section

2.1. Chemicals and Materials

The following were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA): Hepes Buffer; Sodium Pyruvate; Non-Essential Amino Acids mixture 100× (NEAA); 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA); Dimethyl sulfoxide (DMSO); 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2*H*-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt (XTT sodium salt) purity $\geq 90\%$; *N*-Methylphenazonium methyl sulfate (PMS) purity $\sim 98\%$; 2-hydroxyphenyl ethanol (Tyrosol, CAS 501-94-0 (TY)) purity 98%; DL-all-*rac*- α -Tocopherol (Vitamin E, CAS 10191-41-0 (TOC)) purity $\geq 96\%$; 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox™ CAS 53188-07-1 (TR)) purity $\geq 97\%$; 2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH) purity $\sim 97\%$; 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) purity $\sim 90\%$, (S)-(+)-camptothecin (CAS 7689-03-4 (CPT)) purity $\sim 95\%$; 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt tablets (CAS 30931-67-0 (ABTS)); PBS; HBSS. 2-(3,4-dihydroxyphenyl) ethanol (Hydroxytyrosol, CAS 10597-60-1 (HY)) purity $\geq 98\%$ was obtained from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Minimum essential medium with Eagle's salts (MEM), Fetal Bovine Serum (FBS) and Phenol-Red-free Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI) were obtained from PAA Laboratories GmbH (Pasching, Austria). TrypLE Express, HuMEC Ready Medium kit and Fluorescein (FL) were obtained from Invitrogen (Eugene, OR, USA). $K_2S_2O_8$ (CAS 7727-21-1) was obtained from Panreac Quimica S.A.U. (Barcelona, Spain). Culture plates were obtained from NUNC™ (Roskilde, Denmark). The PI/RNase Staining Buffer kit, FITC-conjugated Annexin V and Binding Buffer were obtained from BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA, USA). The Comet assay kit was obtained from Trevigen, Inc. (Helgerman CT, Gaithersburg, MD, USA).

2.2. DPPH Assay

The antioxidant activity of HT and TY against the stable radical DPPH was measured as previously reported [12] with some modifications. Briefly, 100 μ M ethanolic solution of DPPH was mixed with different ethanolic solutions of HT or TY in 96-well plates at 0.06, 0.13, 0.25, 0.5 and 1 (moles of antioxidant/moles of DPPH). ($\pm$)- α -tocopherol (TOC) was used as a positive control and a sample without antioxidant was also measured as a blank control. The decrease in absorbance at 520 nm was determined immediately and every 5 min for 2 h in a microplate reader (TECAN, GENios Plus). Measurements were performed in triplicate.

The inhibition of the DPPH radical was calculated according to the following percentage of Radical Scavenging Activity (% RSA) formula:

$$\% \text{ RSA} = [(A_{C(0)} - A_{A(t)})/A_{C(0)}] \times 100$$

where $A_{C(0)}$ is the absorbance of the control at $t = 0$ min and $A_{A(t)}$ is the absorbance of the antioxidant at $t = 50$ min.

2.3. ABTS Assay

ABTS cation radical scavenging activity was determined using a previously reported procedure [13]. ABTS radicals (ABTS^{•+}) were obtained by ABTS/H₂O 0.5 mM reaction with K₂S₂O₈ for 16 h in the dark at room temperature. ABTS^{•+} was diluted in ultrapure water until absorbance at 734 nm was 0.7 (±0.1). HT, TY and TroloxTM (TR) (as antioxidant reference) was dissolved in ethanol to yield a 10 mM stock solution and diluted with ultrapure water to the assayed concentrations. Twenty microliters of each concentration of HT, TY, standard (TR), blank (ultrapure water) or ethanol control (8%) were added to a 96-well plate. The reaction was initiated by the addition of 280 µL of ABTS^{•+}. Absorbance readings were taken every 5 min at 30 °C for 2 h in a microplate reader (TECAN, GENios Plus). All determinations were carried out in triplicate.

The inhibition of ABTS^{•+} was calculated according to the percentage of Radical Scavenging Activity (% RSA) described above (at $t = 30$ min).

2.4. ORAC Assay

Peroxyl radical scavenging activity was measured by the ORAC_{FL} assay as previously described [14]. A stock solution of HT or TY were reconstituted in DMSO and then diluted in PBS. A stock solution of TR, as antioxidant standard, was also diluted in DMSO and diluted in PBS. The assay was carried out in 96-well plates with a final volume of 160 µL. Samples were run in triplicate. Fluorescein (48 nM) was mixed with various concentrations of SQ, standard (TR) or blank (PBS) containing at final volume 1% (v/v) DMSO. Plates were incubated for 15 min at 37 °C. The assay was initiated by the addition of AAPH (100 mM) and fluorescence readings (Ex: λ_{485} /Em: λ_{520} nm) were taken every 5 min at 37 °C for 160 min in a microplate reader (TECAN GENios Plus). Final results were calculated based on the difference in the Area Under the fluorescence decay Curve (AUC) between the blank and each sample. The AUC formula was:

$$AUC = 1 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + f_3/f_0 + f_4/f_0 + \dots + f_{20}/f_0$$

Results were expressed as micromolar TR equivalents (TE) calculated using the line equation from the standard curve:

$$TE = (Y - b)/m$$

where Y is the net AUC ($AUC_{\text{sample}} - AUC_{\text{control}}$), m is the slope and b is the Y -intercept.

2.5. Cell Culture

Highly invasive MDA-MB-231 human breast cancer cells (estrogen and progesterone receptor-negative), minimally invasive MCF7 human breast cancer cells (estrogen and progesterone receptor-positive) and immortalized non-tumorigenic MCF10A human breast epithelial cells, were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Breast tumor cells were grown as a monolayer culture in Minimum Essential Medium with Eagle's salts (MEM) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 1% Hepes Buffer 1 M, 1% Sodium Pyruvate 100 mM and 1% Non-Essential Amino Acids mixture 100×. MCF10A cells were cultivated in HuMEC Ready Medium. All cell lines were maintained at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO₂. Cells were

routinely sub-cultured using TrypLE Express solution. Cells in the exponential growth phase were used for all experiments.

2.6. Cell Proliferation Assay

Cell proliferation, measured as the cellular growth of treated cells vs. untreated controls, was measured using an XTT-based assay as described by Scudiero *et al.* [15] with some modifications. Briefly, cells were seeded at 2×10^3 cells/well (MCF7) or 1×10^3 cells/well (MDA-MB-231 and MCF10A) into 96-well culture plates (flat bottom) (100 μ L of cell suspension/well). At 24 h after plating, 100 μ L of fresh culture medium, with different concentrations of HT or TY was added in triplicate to the wells. Plates were incubated for 24 h or 24 h followed by a 48 h proliferation period with fresh medium at 37 °C and 5% CO₂. At these time points, medium was removed and 200 μ L of fresh RPMI medium without phenol red that contained XTT (200 μ g/mL) and PMS (20 μ g/mL) was added. Plates were incubated for 3 h at 37 °C in 5% CO₂ and absorbance was measured at 450 nm wavelength (620 nm as reference) in a plate reader (TECAN GENios Plus). Viability was calculated using the formula:

$$\text{viable cells (\%)} = (\text{OD}_{\text{treated cells}} / \text{OD}_{\text{control}}) \times 100$$

where OD is the difference in absorbance between optical density units (OD = OD₄₅₀ – OD₆₂₀).

All measurements were performed in triplicate and each experiment was repeated at least three times.

2.7. Cell Cycle Assay

Cells were seeded in 12-well culture plates at 1×10^5 cells/well for MCF7 and MDA-MB-231 or at 5×10^4 cells/well for MCF10A for 48 h. Cells were then treated with different doses of HT or TY for 24 h. After incubation, cells were washed in cold PBS, fixed with cold 70% ethanol and stored at –20 °C for at least 24 h. At least 1×10^4 cells per sample were analyzed on an EPICS XL-MCL (Beckman Coulter, Spain) flow cytometer after propidium iodide labeling (PI/RNase Staining Buffer kit). The percentage of cells in G₀/G₁, S and G₂/M phases were calculated using FlowJo program (v5.7.2). Each experiment was repeated three independent times.

2.8. Apoptosis

The percentage of apoptosis was determined using a double staining assay with FITC-conjugated Annexin V and propidium iodide (PI). Briefly, after 24 h of cell exposure to the previously indicated doses of HT or TY in 12-well culture plates, cells were harvested, washed twice in cold PBS and resuspended in 100 μ L 1× Annexin Binding Buffer. Cells were then stained with 5 μ L Annexin V-FITC and 1 μ L PI solution, gently vortexed, and incubated for 15 min at room temperature in the dark before flow cytometric analysis. As a positive control, cells were treated with 1 μ M camptothecin (CPT). Each experiment was repeated three independent times.

2.9. Reactive Oxygen Species Detection

Intracellular reactive oxygen species (ROS) level was measured using a cell-permeable fluorescent probe, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) as we described previously [16]. In brief, cells were seeded into 96-well culture plates at 1×10^4 cells/well (MCF7, MDA-MB-231 cells) or 5.5×10^3 cells/well (MCF-10A cells). After 24 h at 37 °C and 5% CO₂, cells were treated with different doses of HT or TY for 24 h. Cells were then washed twice with Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) and incubated with fresh DCFH-DA (100 µM) in HBSS for 30 min at 37 °C in 5% CO₂. DCFH-DA stock solution (20.5 mM) was prepared in DMSO and stored at −20 °C for maximum one month. After that, cells were washed twice in HBSS, and wells were filled with 100 µL HBSS before fluorescence acquisition in a plate reader (TECAN GENios Plus) (Ex: λ_{485} /Em: λ_{535} nm, Gain 60). Intracellular ROS level percentage was calculated as follows:

$$F = [(F_{t_{30}} - F_{t_0})/F_{t_0}] \times 100$$

where F_{t_0} is the fluorescence at $t = 0$ min and $F_{t_{30}}$ the fluorescence at $t = 30$ min.

It has been reported that the addition of H₂O₂ increases oxidative stress in cultured cells [17]. Therefore, in order to evaluate the protective capacity of HT or TY against induced oxidative stress, H₂O₂ (500 µM) was added to the wells after removal of assay medium. This allows avoiding a direct reaction in the medium between these compounds and the oxidant source. After 30 min at 37 °C, fluorescence was quantified as described above.

All tests were run in triplicate for each experimental condition and each experiment was repeated at least three times. All experiments were conducted using iron-free media (MEM and HuMEC).

2.10. Alkaline Single-Cell Gel Electrophoresis (Comet Assay)

At 24 h, cells treated with HT or TY were scraped into 12-well culture plates, washed twice (300× *g* 10 min, 4 °C) with cold 1× PBS (Ca²⁺/Mg²⁺ free) and resuspended in 1 mL of cold 1× PBS. In order to evaluate the ability of HT and TY to prevent oxidative DNA damage, cell suspensions were exposed for 10 min to 50 µM H₂O₂ at 4 °C. After that, cells were washed twice and frozen in FBS-DMSO (90:10, v/v) at −80 °C until the Comet assay procedure.

DNA single strand break by alkaline microgel electrophoresis was performed according to Singh *et al.* [18] with some modifications. Cells were thawed in a bath at 37 °C, centrifuged (300× *g* 10 min, 4 °C) in cold MEM with 25% FBS and resuspended in cold 1× PBS to a density of 1.65×10^5 cells/mL. Cells were then suspended in melted and cooled (at 40 °C) low melting point agarose (LMA). Cell suspensions (50 µL) were spread over a sample area of pre-warmed 1% normal melting point agarose (NMA) precoated CometSlide™ slides. After 15 min at 4 °C in the dark, slides were immersed in cold Lysis Solution (Trevigen, Inc.) at 4 °C for 30 min to dissolve lipids and proteins. In order to separate the two DNA strands, slides were then immersed in fresh Alkaline Solution (pH > 13) for 30 min at room temperature in the dark. Electrophoresis was performed in an Ebony acrylic electrophoresis tank with a cooled platform containing cold Alkaline Electrophoresis Solution (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13) at 25V (1 V/cm) and 300 mA for 40 min. The slides were washed twice with distilled water for 10 min and neutralized with 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 for 5 min,

followed by immersion in 70% ethanol for 5 min and air-dried overnight at room temperature. Slides were stained with Sybr[®] green before scoring.

2.11. Slide Scoring and Analysis

DNA strand breaks were examined using a fluorescence microscope (Zeiss Axiovert 200) equipped with a Luca EMCCD camera (Andor Technology, Belfast, UK) under 494 nm excitation and 521 nm emission wavelength using the Komet 5.5 software package (Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK). Fifty cell images were randomly characterized per sample using 20× magnification. Relative fluorescence between head and tail through the olive tail moment (Olive_TM) was used to determine DNA damage. Olive_TM is defined as the product of the Tail Moment Length and the fraction of DNA in the tail.

$$\text{Olive_TM} = [(\text{Tail (mean)} - \text{Head (mean)}) \times \text{Tail (\% DNA)}]/100$$

2.12. Statistical Analysis

Results are presented as mean ($\pm$ SEM), except for cell proliferation results. For this assay, results are presented as mean ($\pm$ SD). Results are expressed as a percentage relative to the control, which was defined as 100%. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's least significant difference (LSD) test. Values of $p < 0.05$ were considered significant. Statgraphics Plus 5.1 statistical software (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA) was used for the statistical analysis.

3. Results

3.1. Effect of HT and TY on Radical Scavenging Activity

Radical scavenging capacity was determined using DPPH, ABTS and ORAC assays.

The antiradical activity of HT and TY, measured by scavenging activity in the DPPH radical assay, indicated that HT at up to 10 mole ratio (mole antioxidant/mole DPPH) exerts a slightly higher scavenging activity than TOC while TY does not possess a radical scavenger activity (Table 1(a)).

The ABTS antiradical assay showed that HT was more effective than TR in scavenging the ABTS cationic radical while TY exhibited a maximum 85% RSA at 800 μ M (Table 1(b)).

The peroxy radical scavenging activity of HT and TY, measured by the ORAC_{FL} assay, showed a protective effect against AAPH-induced peroxy radical activity for both phenols. Both exerted higher protection against the peroxy radical than TR for low concentrations up to 100 μ M (Table 1(c)).

3.2. Cell Proliferation

To investigate the effect of HT and TY on human breast cell growth, cells were treated with concentrations of HT or TY ranging from 1 to 100 μ M for 24 h. Neither HT nor TY had significant effects on the cell proliferation rates of MCF7, MDA-MB-231 and MCF10A cells (Figure 1(a)), even after an additional 48 h with fresh medium (Figure 1(b)). We also investigated the potential antiproliferative effect of these compounds at high, non-physiological concentrations up to 1000 or

5000 μM of HT or TY, respectively. HT showed a dose-dependent reduction of cell proliferation in the three cell lines from a concentration of 200 μM with an absence of viability observed at 1000 μM , while TY did not affect cell viability at any concentration assayed (data not shown).

No marked changes in cell morphology were observed by light microscopy in any of the cell lines tested when concentrations between 1 and 100 μM of HT or TY were used (data not shown).

Table 1. Antioxidant activity of hydroxytyrosol (HT) or tyrosol (TY) quantified as Radical Scavenging Activity (RSA) by (a) DPPH assay (% RSA at 50 min) and (b) ABTS assay (% RSA at 30 min); (c) Antioxidant activity quantified as Trolox Equivalent (TE) by ORAC_{FL} assay. TroloxTM (TR) and α -tocopherol (TOC) were used as antioxidant references.

(a)

mole AH/ mole DPPH	HT	TY	TOC
0	3.96	3.64	3.63
0.06	36.24	n.d.	23.21
0.13	71.47	5.20	48.16
0.25	96.40	4.25	75.85
0.5	97.80	3.02	90.17
1	98.07	2.59	95.98
2.5	n.d.	2.34	n.d.
5	n.d.	3.44	n.d.
10	n.d.	3.37	n.d.

n.d.: not determined.

(b)

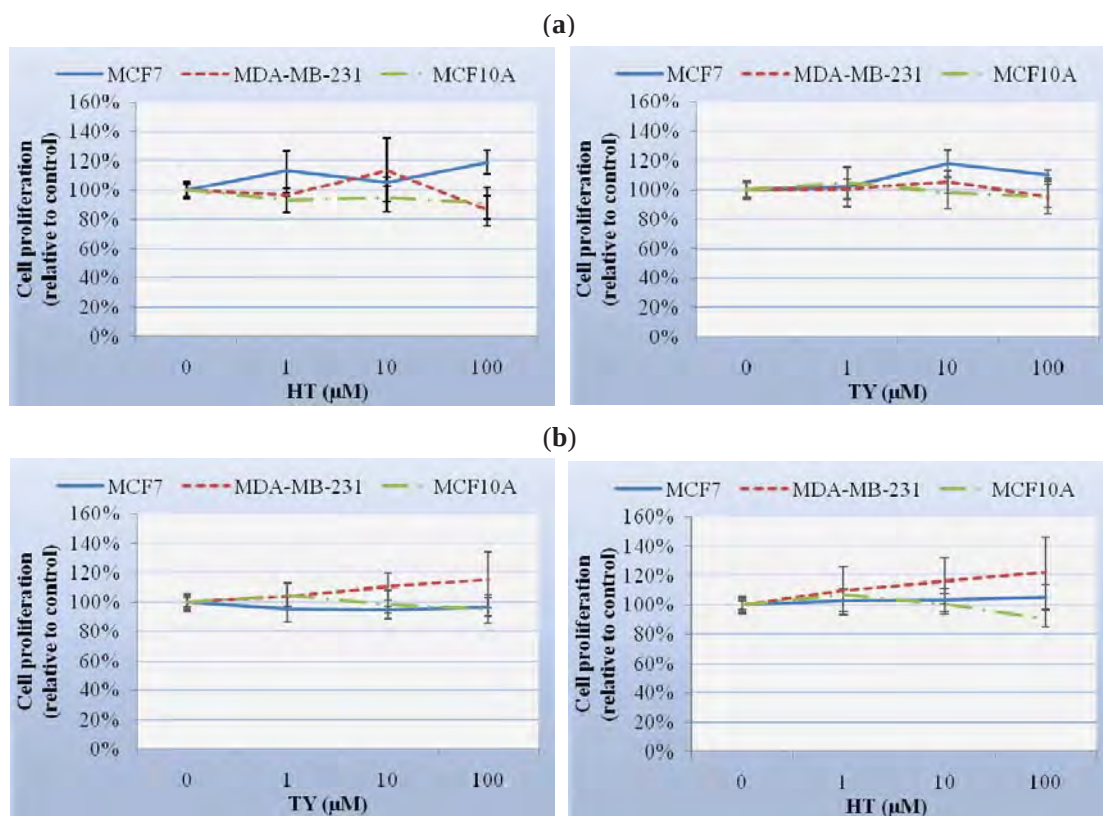
μM	HT	TY	TR
6	5.07	10.31	n.d.
12.5	5.45	14.32	n.d.
25	8.42	20.14	n.d.
50	18.09	31.81	16.21
100	36.63	44.55	29.39
200	69.53	58.25	50.07
400	96.30	73.82	88.03
800	99.47	85.04	99.48

n.d.: not determined.

(c)

TE (μM)	HT (μM)	TY (μM)
3.12	14.82	1.64
6.25	30.97	8.30
12.5	50.37	20.84
25	92.24	58.35
50	150.43	106.76
100	262.76	205.57

Figure 1. Cell proliferation assay measured with XTT tetrazolium salt (a) after 24 h of HT or TY exposure, or (b) after 24 h of HT or TY exposure followed by 48 h with fresh medium. Data are the mean ($\pm$ SD) relative to an untreated control of three independent assays carried out in triplicate.



3.3. Cell Cycle and Apoptosis

To evaluate whether HT or TY interfered with the cell cycle or the induction of apoptosis, MCF7, MDA-MB-231 and MCF10A cells were treated for 24 h with increasing concentrations of HT or TY (between 10 and 200 μ M). The results revealed that HT and TY did not alter the cell cycle in any of the cell lines studied (data not shown).

Flow cytometric analysis of apoptosis revealed that treatment with HT or TY for 24 h did not induce apoptosis in MCF10A cells or in MCF7 or MDA-MB-231 cells when compared to the controls (data not shown).

3.4. Intracellular ROS Level

Intracellular reactive oxygen species (ROS) were quantified by the dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay using a microplate reader. Results showed a dose-dependent decrease in ROS level of MCF10A cells treated for 24 h with either HT or TY. However, HT and TY failed to significantly decrease intracellular ROS level in either MCF7 or MDA-MB-231 cells (Figure 2(a)). While HT

reduced ROS level by up to 20% in MCF7 cells, this reduction was not considered statistically significant ($p = 0.34$).

H₂O₂ effectively induced oxidative stress in both, human breast cancer cells and human breast epithelial cells (Figure 2(b)). In order to investigate the *in vitro* preventive effect of HT or TY against H₂O₂-mediated oxidative stress, we measured the intracellular ROS level in cells treated with HT or TY for 24 h. As can be seen in Figure 2(c), MCF10A cells treated with HT or TY showed a significant dose-dependent decrease in ROS production compared to the control. In addition, HT was also able to decrease the ROS level in MCF7 and MDA-MB-231 cells induced by H₂O₂ exposure. It is worth mentioning that the decrease in ROS level was greater in the breast epithelial cell line than in the breast cancer cell lines. On the other hand, TY did not decrease ROS level in MCF7 or MDA-MB-231 cells at concentrations up to 5000 μ M (Figure 2(c)).

Figure 2. (a) Intracellular reactive oxygen species (ROS) in breast cells treated for 24 h with HT or TY; (b) Increase of the cellular ROS level after an oxidative burst with H₂O₂; (c) Intracellular ROS in breast cells treated for 24 h with HT or TY followed by an oxidative burst with H₂O₂. Inhibitory effects of HT and TY are shown as percent inhibition of untreated or H₂O₂-stimulated fluorescence and represented as the mean $\pm$ SEM of three independent replicates carried out in triplicate. [†] MCF7; [‡] MDA-MB-231; * MCF10A indicates significant differences.

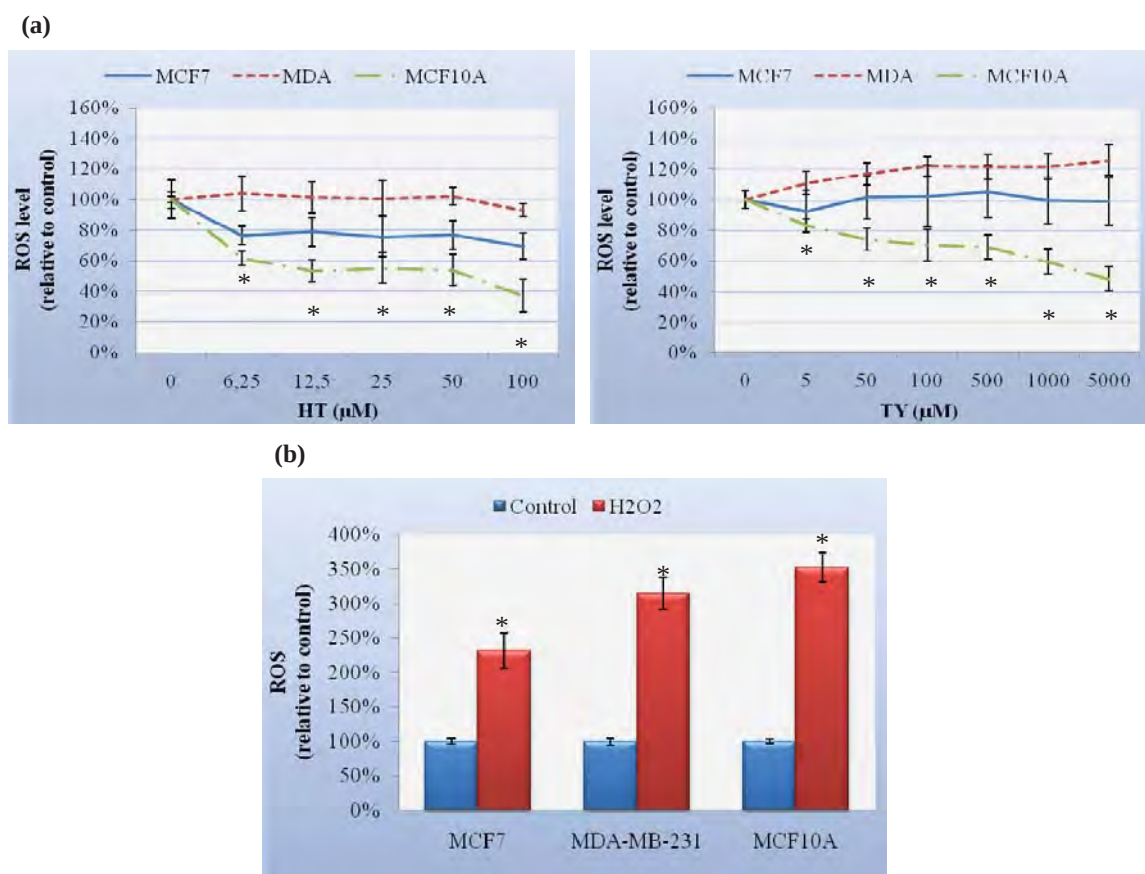
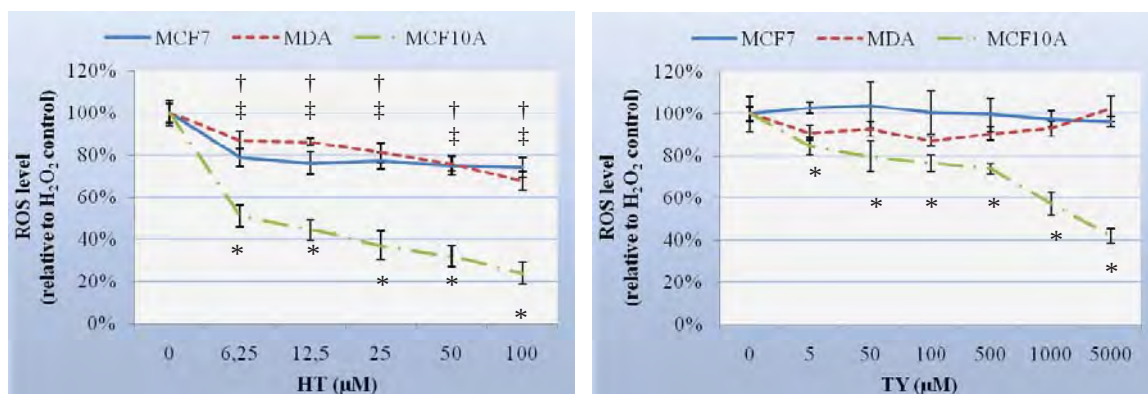


Figure 2. Cont.

(c)



IC₂₀ and IC₅₀ values were defined as the values for 20% and 50% antioxidant inhibition of basal or H₂O₂-stimulated fluorescence in DCFH-DA probes. The Relative Antioxidant Value (RAV) ratio was found to be a good parameter for the determination of oxidative inhibition profiles.

$$\text{RAV} = [(\text{IC}_{20}(\text{PH})/\text{IC}_{20}(\text{TOC})) + (\text{IC}_{50}(\text{PH})/\text{IC}_{50}(\text{TOC}))]/2$$

where PH is the compound (simple phenol) and TOC is the reference (α -tocopherol).

Our results showed that TY has a RAV about 46-fold higher than TOC for MCF10A cells whereas HT only has 1.44-fold higher. This indicated much high antioxidant activity of HT compared with TY in normal breast cells, but less than TOC (Table 2). In MCF7 and MDA-MB-231 cells, a 50% antioxidant inhibition was not observed; therefore, RAV ratios were not determined in these cell lines.

Interestingly, in H₂O₂-stimulated MCF10A cells, the RAV ratio of TY was 42-fold higher than TOC, indicating a very low antioxidant capacity in normal breast cells. The 0.67-fold difference between RAV ratio of HT and TOC is of particular interest, due to the high antioxidant activity of HT in H₂O₂-stimulated MCF10A cells (Table 2).

Table 2. Oxidative inhibition in MCF10A cells. IC₂₀ and IC₅₀ values defined as the values for antioxidant inhibition of basal or H₂O₂-stimulated fluorescence in DCFH-DA assays and the Relative Antioxidant Value (RAV) as a parameter for the relative determination of oxidative inhibition profiles compared to α -tocopherol.

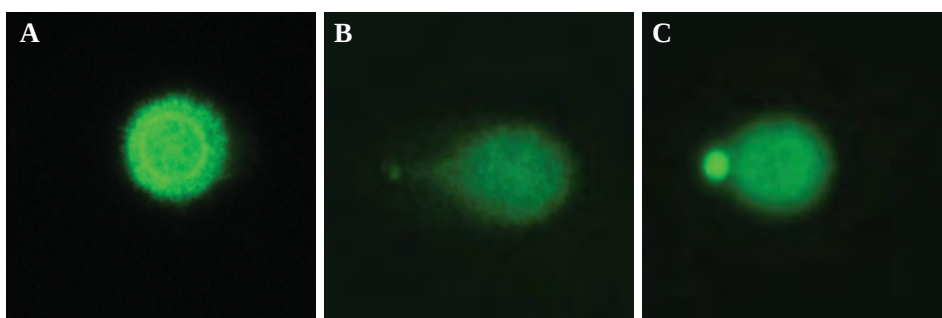
	Basal			H ₂ O ₂ -stimulated		
	HT (μM)	TY (μM)	TOC (μM)	HT (μM)	TY (μM)	TOC (μM)
IC ₂₀	3.52	4.04	4.33	2.66	65.36	2.49
IC ₅₀	65.64	2942.60	31.89	20.66	4244.40	73.50
RAV	1.44	46.60	1.00	0.67	42.00	1.00

3.5. Effect of HT and TY on Oxidative DNA Damage

The ability of H₂O₂ to induce DNA strand breaks in these human breast epithelial cell lines was examined using the Comet assay. In untreated cells, DNA does not migrate far from the origin when examined by alkaline microgel electrophoresis (Figure 3(a)). Following H₂O₂ exposure, control and

pretreated breast cells with damaged DNA have the shape of a comet, the tail length and fluorescent intensity of which are related to the number of DNA strand breaks induced by the DNA-damaging agent (Figure 3(b,c)).

Figure 3. Representative images of Comet assay analysis of MCF10A cells. (a) Untreated cell, showing a circular shape indicating absence of DNA damage; (b) 10 min. H_2O_2 exposed cell, exhibiting a long and bright tail related to DNA strand breaks, indicating DNA oxidative damage; (c) 10 min. H_2O_2 exposed cell after 24 h of 100 μM HT pretreatment, illustrating the reduction of tail length and fluorescent intensity indicative of reduced DNA damage.



Breast cells exposed to H_2O_2 were effectively DNA damaged and the mean olive tail moment (Olive_TM) was determined by the Comet assay. Breast epithelial cells were the most sensitive to the H_2O_2 -induced DNA damage (Figure 4(a)).

In unexposed cells, HT reduced DNA damage significantly in MCF7, MDA-MB-231 and MCF10A cells whereas TY only reduced it in MCF10A cells (Figure 4(b)). In H_2O_2 -exposed cells, HT showed a preventive DNA damage effect in the three cell lines whereas TY was unable to reduce Olive_TM in any of the cell lines; indeed, in MDA-MB-231 cells, TY increased Olive_TM significantly.

Figure 4. Olive Tail Moment (Olive_TM) as the mean $\pm$ SEM for three independent assays. (a) After an H_2O_2 injury; (b) after 24 h of HT or TY treatment, and (c) after 24 h of HT or TY treatment followed by an H_2O_2 injury.

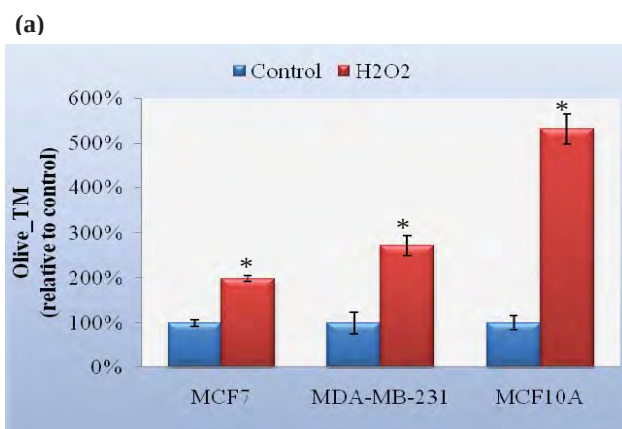
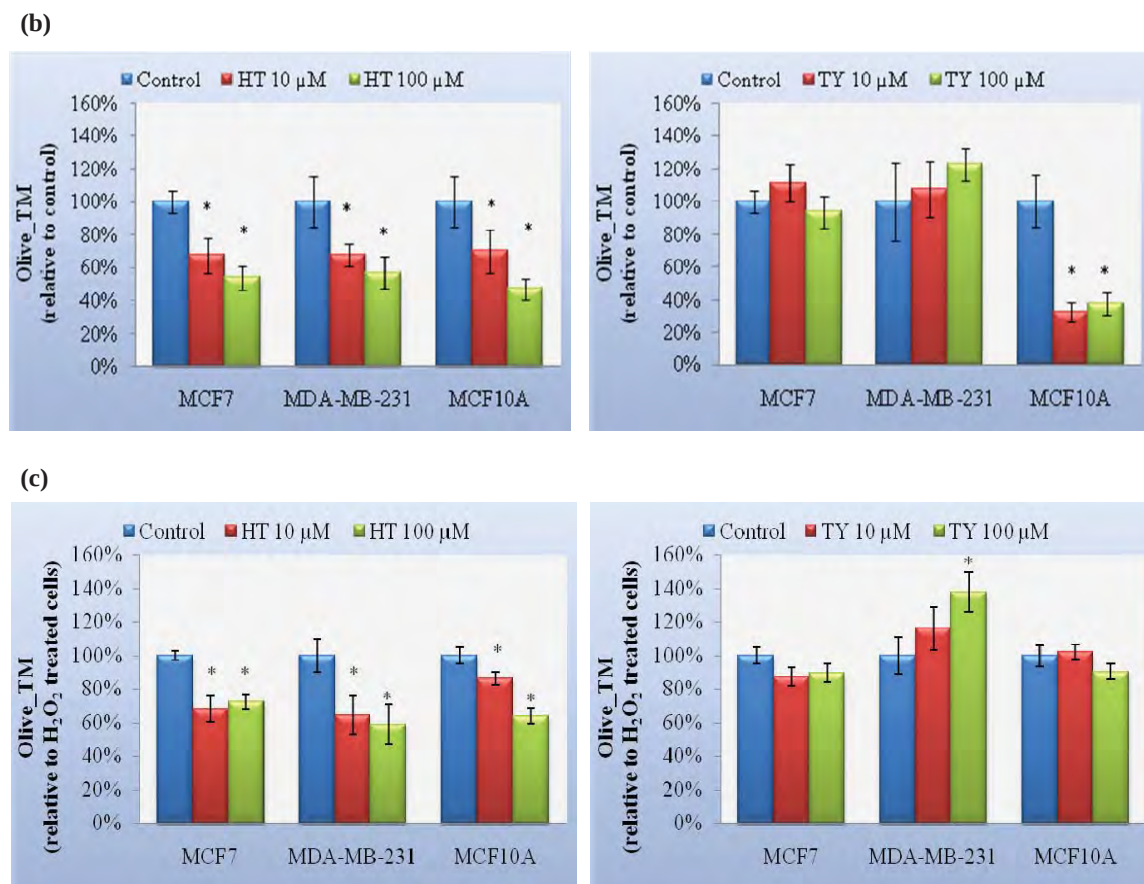


Figure 4. Cont.



4. Discussion

There is some scientific evidence relating Mediterranean dietary pattern with a lower incidence of cardiovascular diseases and cancer, among other diseases. Virgin olive oils (VOOs) represent the main source of fats in this diet and it has been demonstrated that consumption of VOOs reduces human arterial hypertension, lipid peroxidation of membranes, tumor incidence and number of tumors [19,20]. Minor compounds play a key role in VOOs' healthy properties. Among them, phenols have demonstrated healthy bioactivity properties. Interest in phenolic compounds has increased greatly, with attention being focused on finding naturally occurring antioxidants for foods or medical uses to replace synthetic antioxidants that, in some cases, have been reported to be carcinogenic [21].

HT and TY are two of the major simple phenols present in VOOs as simple form or conjugates [2]. Bioavailability studies have demonstrated that they are dose-dependently absorbed in animals and humans after olive oil ingestion [22], accumulated in the body and, finally, systemically exert biological effects [23].

The present work describes the antioxidant capacity of HT and TY molecules using chemical and cellular assays and their relationship with proliferation of human breast tumor vs. normal cells.

HT and TY are structurally identical except that HT has an extra –OH group forming a catechol group, which is considered responsible for its higher antioxidant activity. This catechol group is able to stabilize free radicals through the formation of intermolecular hydrogen bonds [8]. In our chemical analysis, the catechol phenol HT exhibited a strong antioxidant activity in DPPH, ABTS and ORAC assays, while TY, without a catechol group, showed a weak antioxidant activity in DPPH assay. Remarkably, TY acts as an efficient scavenger against ABTS and AAPH radicals, although to a lesser extent than HT, indicating the minor importance of the catechol group in cationic or peroxylic radicals' scavenging activities. These results are in agreement with those previously reported by Visioli *et al.* [8] affirming that HT and, to a lesser degree, TY are more potent scavengers of free radicals than vitamin E.

Although nowadays there is no scientific evidence relating to the physiological concentrations of HT or TY after olive oil ingestion, some authors have suggested it could be between 10 and 100 μM [24]. Cell treatment with HT or TY in the range of their possible physiological concentrations (1–100 μM) did not have any effect on cell proliferation in any of the cell lines studied, independently of the exposure times. However, HT dramatically reduced the viability of MCF7, MDA-MB-231 and MCF10A cell lines when used at concentrations from 200 μM to 1000 μM . Fabiani *et al.* described such an effect in colon adenocarcinoma HT29 cells [25]. Furthermore, HT and TY did not alter the cell cycle or induce apoptosis in these cell lines. Although these results are in agreement with those achieved in LLC-PK1 renal cells, they are in contrast with results in human promyelocytic leukaemia HL60 cells with a noticeable antiproliferative, cell cycle arrest and apoptotic effect of HT. Otherwise, TY showed no antiproliferative effect in HL60 cells [7,25].

HT or TY's inability to inhibit breast cancer cell proliferation at the assayed times and concentrations, suggests that they cannot protect against breast cancer once developed. Quiles *et al.* [24] described the lack of inhibition of HT or TY in PC3 cells treated with 10 to 250 μM , as did Menendez *et al.* [26] in SKBR3 and MCF7 cells after 5 days of HT or TY treatments in the range of 6.25 to 100 μM . Moreover, Sirianni *et al.* [27] recently described the dose-dependent inhibition of MCF7 cell proliferation by HT and oleuropein (OL) with treatments of 1 to 100 μM ; cell growth was induced by 17- β -estradiol (E_2). In addition, HT and OL are not able to interfere with estrogen action through competition with estrogen receptors (ER), which are responsible for activation of the gene expression involved in cell proliferation.

In order to clarify how nutritional antioxidants are able to prevent or treat oxidative damage, Berger [28] affirmed that nutrients cannot treat an installed disease, such as gastrointestinal cancer, but that they may prevent its promotion. Indeed, the answer to the question: "Can installed damage caused by ROS be treated by antioxidant nutrients?" is "probably not", but the answer to the question: "Can oxidative damage be treated nutritionally?" is "yes" [28].

Growing evidence supports the hypothesis that risk factors such as lifestyle, age, environment, diet, drinking, smoke, *etc.* are determinants in breast neoplastic transformation, and are closely associated with a chronic increase in the basal level of oxidative stress. A decrease in oxidative stress state could prevent the development of tumors and, potentially, cancer. In fact, serum markers for oxidative DNA damage have been shown to increase in women diagnosed with breast cancer [29]. On the other hand, it has been suggested that consumption of VOOs, which are particularly rich in phenolic antioxidants, such as HT and TY, should afford considerable protection against breast cancer by inhibiting oxidative

stress [2]. In our study we demonstrated that HT and TY reduce basal and H₂O₂-induced ROS level in breast epithelial MCF10A cells, whereas TY failed to reduce both in MCF7 or MDA-MB-231 cells and HT only reduced H₂O₂-induced ROS level slightly in breast cancer cells. These results point to a differential antioxidant activity of both compounds between normal breast and tumor cells as we described for squalene [16]. Thus, we suggest that HT and TY could prevent oxidative stress in normal breast cells, thereby preventing the initiation of a chain of reactions to transform normal cells into cancer cells. Noticeably, it is necessary to use a much larger amount of TY to obtain the same ROS reduction level as HT in MCF10A cells (Table 2). Up to 100 µM concentrations of HT and TY used in the present study are probably within the physiological range. However, 500 to 5000 µM of TY exceed this range and could be regarded as being in the pharmacological range.

Di Bendeto *et al.* [11] described differences between HT and TY in inhibiting cell-mediated oxidation of LDL (100% HT vs. 40% TY) in J774 A.1 macrophage cells due to its intracellular presence. Thus, time-dependent TY, accumulated inside the cell was effective only at later time-points (24 h) or at higher concentrations than HT, which was rapidly found inside the cells and disappeared within 18 h. Thus, we can presume a quick antioxidant defense by HT followed by a slower defense by TY upon VOO intake.

Estrogens, known human breast pro-carcinogens, exert their actions by two mechanisms; the ER-dependent mechanism, involving the activation of ER and subsequent stimulation of cell growth and proliferation [30] or the ER-independent mechanism, involving the generation of genotoxic estrogen metabolites, which are highly reactive and damage DNA by the formation of free radicals and consequently ROS [30]. In accordance with Sirianni *et al.* [27], HT inhibition of E₂-induced MCF7 proliferation does not involve the ER-dependent mechanism but points to an inhibition of the E₂ signaling pathway. Felty *et al.* [31] identified mitochondria as a major source of E₂-induced ROS (mtROS) in breast cancer cells and described mtROS as a messenger involved in signaling pathways of cell proliferation control, increasing the transcription of cell cycle genes. These authors found the same amount of mtROS in ER-negative MDA-MB-468 cells and in ER-positive MCF7 or T47D cells, suggesting that mtROS production does not depend on the presence of ER in breast cancer cells. If mtROS acts as a messenger in breast cancer proliferation, it could explain why an antioxidant such as HT reduces E₂-induced cell proliferation, as described by Sirianni *et al.*, whereas in the same concentrations without E₂ stimulation we do not detect any significant growth alteration.

Cellular protection against oxidative stress is provided by two types of antioxidants; direct antioxidants with a redox activity; and indirect antioxidants (redox active or not) which activated the Nrf2/ARE pathway resulting in transcription of phase II enzymes such as glutathione S-transferase, NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 or glutathione reductase [32]. In addition to the fact that HT and TY act as direct antioxidants, they could also be indirect antioxidants activating the nuclear factor-like 2 (Nrf2). Nrf2, considered a key factor in the cellular defense mechanisms against oxidative stress, might be induced more strongly in MCF10A cells than in MCF7 and might have little or no effect in MDA-MB-231 cells, explaining the differential protection effect of HT and TY on intracellular ROS level. To the best of our knowledge, until now, only Liu *et al.* [33] have described the protection of HT on ARPE-19 human retinal pigment epithelial cell line from oxidative stress induced by acrolein, a major component of cigarette smoke. Further studies will be necessary to

elucidate the possible Nrf2/ARE pathway intervention of HT and TY differential antioxidant activity in breast cell lines.

HT has been described as preventing DNA damage beyond its antioxidant capacity, as it can affect a range of enzymes, including cyclooxygenase and NAD(P)H oxidase while TY has no protective effect [8]. In accordance with these authors, our findings point to a protective effect of HT against basal and H₂O₂-induced DNA damage regardless of the breast cellular type, whereas TY only has a protective effect on ROS basal level in non-tumoral breast cells.

Both compounds reduce intracellular ROS level and oxidative DNA damage in normal breast cells. This could protect against cellular mutations, preventing carcinogenesis. However, when the disease has occurred, oxidative status in the malignancy place is altered. In this condition, while HT still protects non-tumor breast cells against DNA damage, TY fails to protect them at physiological concentrations. Although HT contributes to reduce DNA damage in normal breast cells, it protects breast tumor cells too. Accordingly, our results must be interpreted carefully, because a reduction of DNA damage in cancer cells might promote cell growth and might inhibit the action of anthracycline chemotherapeutic agents, such as doxorubicin, which induces apoptosis of cancer cells by the oxidative damage resulting from enhanced oxidative state of the cells or, in contrast, might reduce ROS messenger signaling of proliferation resulting in a reduction of tumor cell growth. In any case, we have not detected any modulation of the growth activity *in vitro* in breast cancer cells after HT or TY treatment at the assayed times.

In this paper, HT has been described as an antioxidant compound with higher activity than TY and related to the prevention of breast cancer, but we must not forget that VOO's minor compounds can interact with each other, potentiating or inhibiting the effects described for each component alone. Our results indicate some healthy properties of these two simple phenols which may be of interest in pharmacology or as a nutritional supplement or could even lead to establishing the ideal concentrations of each component in VOOs in order to label it as a healthy oil. However, we must be prudent about extrapolating these results regarding epidemiological olive oil health impacts. Future work is needed to investigate these synergetic or inhibitory effects.

5. Conclusions

The simple phenol HT could contribute to the preventive cancer activity attributed to VOOs due to the reduction of oxidative stress and oxidative DNA protection in normal breast cells at physiological concentrations, whereas TY is needed at pharmacological concentrations to reduce oxidative stress and fails to protect DNA damage against an oxidative burst.

Both phenols exert a selective antioxidant defense, preventing oxidation in normal breast cells but not in breast cancer cells, which could be helpful to cancer therapies that increase oxidative stress. HT also prevents induced DNA damage in cancer cells, so it might interfere with these therapies.

Although *in vitro* studies have pointed to a preventive role of HT against human breast cancer, the precise mechanisms of action remain to be clarified. Further studies are necessary to elucidate the cellular signaling events that HT and TY target in oxidative stress protection and subsequent breast cancer prevention.

Acknowledgments

This study was supported by the “Instituto Andaluz de Biotecnología” (BIOÁNDALUS 08/22/L5.3); Ministerio de Ciencia e Innovación-FEDER (RTA2008-00066-C03-03); and “Centro de Excelencia en Investigación sobre Aceite de Oliva y Salud” (CEAS).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Escrich, E.; Ramírez-Tortosa, M.C.; Sánchez-Rovira, P.; Colomer, R.; Solanas, M.; Gaforio, J.J. Olive oil in cancer prevention and progression. *Nutr. Rev.* **2006**, *64*, S40–S52.
2. Owen, R.W.; Giacosa, A.; Hull, W.E.; Haubner, R.; Würtele, G.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H. Olive-oil consumption and health: The possible role of antioxidants. *Lancet Oncol.* **2000**, *1*, 107–112.
3. Zhang, D.D. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab. Rev.* **2006**, *38*, 769–789.
4. Allouche, Y.; Jiménez, A.; Gaforio, J.J.; Uceda, M.; Beltrán, G. How heating affects extra virgin olive oil quality indexes and chemical composition. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 9646–9654.
5. Cicerale, S.; Conlan, X.A.; Sinclair, A.J.; Keast, R.S.J. Chemistry and health of olive oil phenolics. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2009**, *49*, 218–236.
6. Brenes, M.; García, A.; García, P.; Rios, J.J.; Garrido, A. Phenolic compounds in spanish olive oils. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3535–3540.
7. Loru, D.; Incani, A.; Deiana, M.; Corona, G.; Atzeri, A.; Melis, M.P.; Rosa, A.; Dessì, M.A. Protective effect of hydroxytyrosol and tyrosol against oxidative stress in kidney cells. *Toxicol. Ind. Health* **2009**, *25*, 301–310.
8. Visioli, F.; Poli, A.; Gall, C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med. Res. Rev.* **2002**, *22*, 65–75.
9. Cornwell, D.G.; Ma, J. Nutritional benefit of olive oil: The biological effects of hydroxytyrosol and its arylating quinone adducts. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 8774–8786.
10. Covas, M.-I.; Ruiz-Gutiérrez, V.; de la Torre, R.; Kafatos, A.; Lamuela-Raventós, R.M.; Osada, J.; Owen, R.W.; Visioli, F. Minor components of olive oil: Evidence to date of health benefits in humans. *Nutr. Rev.* **2006**, *64*, S20–S30.
11. Di Benedetto, R.; Vari, R.; Scazzocchio, B.; Filesi, C.; Santangelo, C.; Giovannini, C.; Matarrese, P.; D’Archivio, M.; Masella, R. Tyrosol, the major extra virgin olive oil compound, restored intracellular antioxidant defences in spite of its weak antioxidative effectiveness. *Nutr. Met. Cardiovasc. Dis.* **2007**, *17*, 535–545.
12. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25–30.

13. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237.
14. Prior, R.L.; Hoang, H.; Gu, L.; Wu, X.; Bacchiocca, M.; Howard, L.; Hampsch-Woodill, M.; Huang, D.; Ou, B.; Jacob, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3273–3279.
15. Scudiero, D.A.; Shoemaker, R.H.; Paull, K.D.; Monks, A.; Tierney, S.; Nofziger, T.H.; Currens, M.J.; Seniff, D.; Boyd, M.R. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* **1988**, *48*, 4827–4833.
16. Warleta, F.; Campos, M.; Allouche, Y.; Sanchez-Quesada, C.; Ruiz-Mora, J.; Beltran, G.; Gaforio, J.J. Squalene protects against oxidative DNA damage in MCF10A human mammary epithelial cells but not in MCF7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 1092–1100.
17. Lee, D.H.; Lim, B.-S.; Lee, Y.-K.; Yang, H.-C. Effects of hydrogen peroxide (H₂O₂) on alkaline phosphatase activity and matrix mineralization of odontoblast and osteoblast cell lines. *Cell Biol. Toxicol.* **2006**, *22*, 39–46.
18. Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **1988**, *175*, 184–191.
19. Lasekan, J.B.; Clayton, M.K.; Gendron-Fitzpatrick, A.; Ney, D.M. Dietary olive and safflower oils in promotion of DMBA-induced mammary tumorigenesis in rats. *Nutr. Cancer* **1990**, *13*, 153–163.
20. Perona, J.S.; Arcemis, C.; Ruiz-Gutierrez, V.; Catalá, A. Effect of dietary high-oleic-acid oils that are rich in antioxidants on microsomal lipid peroxidation in rats. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 730–735.
21. Leopoldini, M.; Marino, T.; Russo, N.; Toscano, M. Antioxidant properties of phenolic compounds: H-Atom versus electron transfer mechanism. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 4916–4922.
22. Visioli, F.; Galli, C.; Bornet, F.; Mattei, A.; Patelli, R.; Galli, G.; Caruso, D. Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Lett.* **2000**, *468*, 159–160.
23. Weinbrenner, T.; Fitó, M.; de la Torre, R.; Saez, G.T.; Rijken, P.; Tormos, C.; Coolen, S.; Albaladejo, M.F.; Abanades, S.; Schroder, H.; *et al.* Olive oils high in phenolic compounds modulate oxidative/antioxidative status in men. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 2314–2321.
24. Quiles, J.L.; Farquharson, A.J.; Simpson, D.K.; Grant, I.; Wahle, K.W.J. Olive oil phenolics: Effects on DNA oxidation and redox enzyme mRNA in prostate cells. *Br. J. Nutr.* **2002**, *88*, 225–234.
25. Fabiani, R.; de Bartolomeo, A.; Rosignoli, P.; Servili, M.; Montedoro, G.F.; Morozzi, G. Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through g1 cell cycle arrest and apoptosis. *Eur. J. Cancer Prev.* **2002**, *11*, 351–358.

26. Menendez, J.A.; Vazquez-Martin, A.; Colomer, R.; Brunet, J.; Carrasco-Pancorbo, A.; Garcia-Villalba, R.; Fernandez-Gutierrez, A.; Segura-Carretero, A. Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin™) in HER2-Overexpressing breast cancer cells. *BMC Cancer* **2007**, *7*, 80.
27. Sirianni, R.; Chimento, A.; de Luca, A.; Casaburi, I.; Rizza, P.; Onofrio, A.; Iacopetta, D.; Puoci, F.; Andò, S.; Maggiolini, M.; *et al.* Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation. *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**, *54*, 833–840.
28. Berger, M.M. Can oxidative damage be treated nutritionally? *Clin. Nutr.* **2005**, *24*, 172–183.
29. Musarrat, J.; Arezina-Wilson, J.; Wani, A.A. Prognostic and aetiological relevance of 8-hydroxyguanosine in human breast carcinogenesis. *Eur. J. Cancer* **1996**, *32A*, 1209–1214.
30. Yager, J.D.; Davidson, N.E. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *354*, 270–282.
31. Felty, Q.; Xiong, W.-C.; Sun, D.; Sarkar, S.; Singh, K.P.; Parkash, J.; Roy, D. Estrogen-induced mitochondrial reactive oxygen species as signal-transducing messengers. *Biochemistry* **2005**, *44*, 6900–6909.
32. Dinkova-Kostova, A.T.; Talalay, P. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, S128–S138.
33. Liu, Z.; Sun, L.; Zhu, L.; Jia, X.; Li, X.; Jia, H.; Wang, Y.; Weber, P.; Long, J.; Liu, J. Hydroxytyrosol protects retinal pigment epithelial cells from acrolein-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *J. Neurochem.* **2007**, *103*, 2690–2700.

Uso de la Electroforesis Unicelular Alcalina (Comet assay) para la identificación de componentes naturales de los alimentos con propiedades preventivas del daño oxidativo al ADN celular

- Nuestro grupo de investigación “Inmunobiología Tumoral” es grupo catalogado en el Plan Andaluz de Investigación (código: CTS-442) y adscrito al Instituto Andaluz de Biotecnología (IAB), órgano experto en Biotecnología, dentro de la Consejería de Economía, Innovación y Ciencia de la Junta de Andalucía, y cuyo principal objetivo es impulsar y potenciar el sector biotecnológico andaluz favoreciendo los vínculos entre grupos de investigación y tejido empresarial.

Fernando Warleta, María Campos, Cristina Sánchez, José Juan Gaforio, Área de Inmunología, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén

Introducción:

La idea de la electroforesis celular en microgel se introdujo por Ostling y Johanson en 1984 para ver la rotura de cadena doble de ADN por radiación ultravioleta. Como la imagen obtenida se asemejaba a un cometa con una cabeza de ADN sin dañar y una cola con fragmentos de ADN, se le dio el nombre de “Comet assay”, por el que es más conocida esta técnica. En 1988, Singh y cols. modificaron la técnica sometiéndola a condiciones muy alcalinas (pH>13) para ver

niveles muy bajos de rotura de cadena simple y lo combinaron con una marcación fluorescente para su recuento por microscopía de fluorescencia. Años más tarde, en 1990, una nueva modificación introducida por Olive y cols., consistente en suavizar las condiciones alcalinas, nos permitió detectar niveles normales de rotura de cadena simple como los producidos por la exposición de las células a radiación o a determinados productos químicos. Estos autores desarrollaron también unas herramientas para la cuantificación de los resultados mediante la relación del contenido de ADN entre la cabeza; con ADN de alto peso molecular, y la cola; con los principales fragmentos migrados,

Los radicales libres están presentes en cualquier célula aeróbica, bien originados por la propia respiración, bien por su producción por otras fuentes como las infecciones, el humo del tabaco, la radiación ultravioleta, la contaminación ambiental, el deporte extremo, el consumo de determinados alimentos ricos en grasas trans o hidrogenadas, por determinadas enfermedades etc. Este exceso de radicales libres es controlado mediante sistemas enzimáticos como la Superóxido Dismutasa (SOD), la Catalasa (CAT) o la Glutathion Peroxidasa (GPx), o no enzimáticos como el ácido ascórbico (vitamina C), alfa-tocoferol (vitamina E), glutatión (GSH), beta-caroteno, vitamina A, flavonoides y ácidos

fenólicos, así como por otros antioxidantes naturales ingeridos con la dieta. Estos sistemas son los encargados de mantener el equilibrio oxidativo intracelular evitando las consecuencias adversas que un desequilibrio oxidativo puede producir. Una elevada concentración de radicales libres en una célula, ataca a las moléculas estables para robarles un electrón, lo que las desestabiliza. Esto genera daños tanto en los lípidos de las membranas celulares (peroxidación lipídica), como en las proteínas (oxidación y nitración) y en los ácidos nucleicos (rotura de cadena simple). El ADN dañado por los radicales libres puede ser o bien reparado, o bien puede contener daños irreparables incompatibles con la supervivencia de la célula, por lo que esta moriría. Pero una tercera opción, y la más dramática, consiste en que esas roturas sean reparadas erróneamente causando mutaciones celulares que en última instancia sean precursoras de un cáncer.

Fundamento:

El fundamento del “Comet Assay” consiste en que el ADN desnaturalizado de una célula,

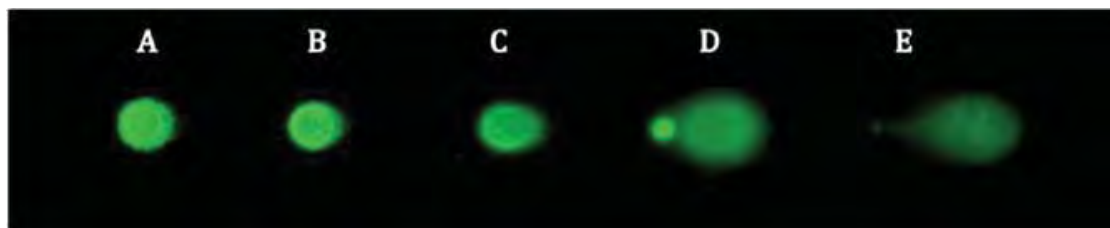


Fig. 1: Imágenes representativas del daño oxidativo al ADN analizadas mediante el Comet Assay. (A) Células de epitelio mamario humano (MCF10A) sin daño al ADN. (B-E) MCF10A expuesta a concentraciones crecientes de H_2O_2 , mostrando un incremento del daño oxidativo al ADN. Las células se marcaron con Sybr Green y se analizaron con un microscopio invertido de fluorescencia Zeiss Axiovert 200 con cámara EM-CCD Andor Luca y el software Komet 5.5.

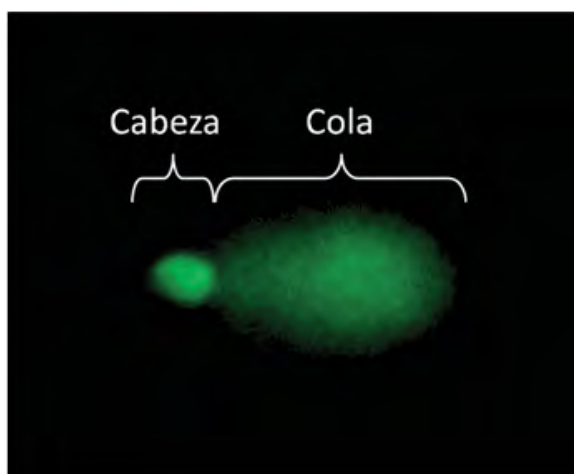


Fig. 2: Imagen del daño al ADN sufrido por una célula en el que se distingue la cabeza con el ADN no dañado y una cola con fragmentos de ADN.

Un ADN muy dañado tendrá fragmentos cortos que migrarán más

molécula con carga negativa, migrará hacia el ánodo al someterlo a un campo eléctrico en un gel de agarosa. La migración dependerá del tamaño del fragmento de ADN, de este modo, un ADN muy dañado tendrá fragmentos cortos que migrarán más que aquel ADN menos dañado, y aquella molécula de ADN sin roturas, no migrará permaneciendo en el núcleo.

La imagen de una electroforesis unicelular alcalina se asemeja a un cometa, de donde recoge su nombre más coloquial (Comet assay), en el que se distingue una cabeza que corresponde al núcleo con el ADN íntegro, y una cola formada por el ADN dañado en el que se puede apreciar una degradación del ADN según el tamaño de sus fragmentos (desde el más íntegro cercano a la cabeza, hasta el más dañado, alejado de la cabeza).

Este ensayo puede ser aplicado en células procedentes de líneas celulares establecidas y cultivadas *in vitro* como, en muestras de sangre *ex vivo* o en modelos *in vivo*, así como en moluscos, peces, aves, etc. para el control y seguimiento de

tóxicos medioambientales, y debido a que es una técnica muy poco invasiva (tan sólo se requiere una extracción de sangre) se pueden realizar ensayos en humanos de forma muy sencilla.

La diferencia entre la cantidad de ADN de la cabeza y de la cola nos dará un índice del daño oxidativo sufrido por esa célula, y nos permitirá cuantificar la potencial capacidad preventiva del daño oxidativo al ADN de los compuestos estudiados.

La técnica la podemos resumir en los siguientes pasos:

Partimos de una suspensión celular obtenida de nuestro ensayo (cultivos celulares, muestras de sangre, tejidos disgregados, etc.).

Las células se suspenden en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (low-melting point) y se depositan sobre un portaobjetos pre-cubierto con una lámina de agarosa (normal-melting point).

Se lisan las células y se eliminan las proteínas celulares dejando al ADN celular libre en la agarosa.

Sometemos a los portas a condiciones alcalinas con lo que desnaturalizamos el ADN separando las dos hebras. Las roturas previas de las cadenas simples producidas por los radicales libres dejarán separados desde este momento fragmentos de ADN de diferente longitud, siendo la cantidad de

fragmentos y su tamaño proporcional al daño al ADN sufrido por la célula.

Se realiza una electroforesis bajo unas condiciones específicas: En un medio alcalino, con un voltaje bajo y un amperaje constante (25 V y 300 mA) durante unos 30 minutos. La electroforesis debe realizarse en oscuridad y el medio de electroforesis ha de permanecer frío durante todo el proceso ya que la luz y el calor podrían dañar el ADN apareciendo falsos positivos. Los ácidos nucleicos migrarán hacia el polo positivo (ánodo) de acuerdo al tamaño de los fragmentos.

Los geles se neutralizan para su posterior marcación y, se deshidratan y fijan con etanol.

El exceso de humedad puede eliminarse manteniéndolas en una estufa a 37 °C previamente a su marcación.

Para su marcación fluorescente podemos utilizar cualquier fluoróforo intercalante en el ADN como el Bromuro de Etidio, Sybr Green, Hoechst 33258, Ioduro de Propidio, DAPI, etc., aunque si no disponemos de un microscopio fluorescente podemos marcarlo con nitrato de plata para su observación colorimétrica mediante un microscopio óptico. La marcación colorimétrica presenta la desventaja de que tan sólo nos permitirá un recuento cualitativo, asignando un valor entre el 0 y el 4 según el daño observado, y no podremos aplicar las fórmulas más empleadas en la in-

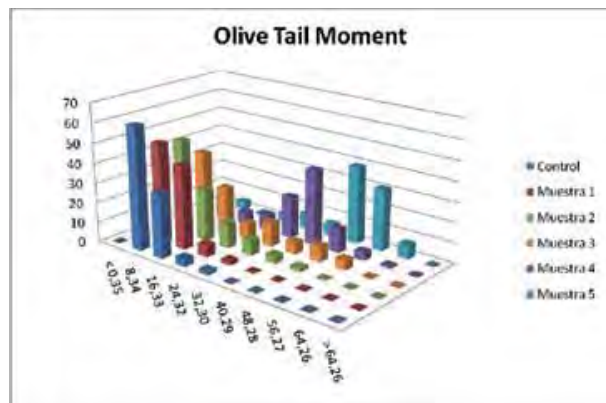


Fig. 3: Resultados expresados como valores relativos del Olive Tail Moment del daño oxidativo de una línea tumoral mamaria humana (MCF7) tratada con diferentes compuestos naturales. En el eje de ordenadas tenemos el número relativo de células expresado como porcentaje, y en el eje de abscisas los rangos de valores OTM en los que se encuentran las células.

La electroforesis unicelular alcalina es una herramienta muy útil en la determinación del daño genotóxico en general

interpretación de estos resultados en los que la intensidad de la señal es un factor determinante.

El recuento celular se realiza mediante microscopía de fluorescencia con una cámara CCD (Charge Coupled Device) acoplada para detectar la intensidad de fluorescencia o mediante microscopía óptica si se ha optado por la marcación colorimétrica. Es recomendable contar entre 50 y 100 células por cada muestra, siendo más preciso nuestro resultado cuanto mayor sea el número de células cuantificadas. Existen en el mercado software específicos optimiza-

dos para el recuento de estas células, facilitando en gran medida el trabajo en laboratorio al agilizar la recolección de la información, el análisis de los resultados y su interpretación, y la exportación a hojas de cálculo para análisis posteriores, aunque se podría utilizar cualquier programa de análisis de imágenes de fluorescencia.

La interpretación de los resultados del Comet son complicados ya que no hay una relación simple entre la cantidad de daño al ADN causado por un compuesto y el impacto biológico del daño. Los parámetros más utilizados para cuantificar los resultados por ser los que más información proporcionan son: "tail % intensity", "tail length" y "Olive tail moment", aunque existen muchos otros.

"Tail length" es la distancia hasta la que ha migrado el ADN desde la cabeza. "Tail % intensity" es la intensidad relativa de fluorescencia, y por tanto de ADN, de la cola respecto a la de la cabeza. Y por último, "Olive tail moment" (OTM) es el producto de la longitud de la cola por la cantidad relativa de ADN contenido en la cola.

$OTM = [Media(Cola) - Media(Cabeza)] \times [\% ADN(Cola)] / 100$

OTM nos permite medir tanto los fragmentos pequeños de ADN que han migrado mucho pero tienen poca fluorescencia y los grandes que casi no han migrado pero tienen mucha fluorescencia.

Aplicaciones:

Es conocido que numerosos componentes naturales presentes en alimentos y bebidas considerados saludables como frutas, verduras, aceite de oliva, vinos, infusiones, etc. poseen propiedades antioxidantes, pero son escasas las evidencias científicas que demuestren su protección al ADN ante una situación de desequilibrio oxidativo. La electroforesis unicelular alcalina puede aportar una valiosa información sobre la potencial capacidad que, un determinado componente bioactivo presente en los alimentos, tiene para prevenir el daño oxidativo en nuestra células.

Este estudio de la prevención antioxidativa se puede realizar tanto en líneas celulares concretas que nos interese estudiar, como en células tumorales de tejidos determinados, líneas monocitarias, cultivos primarios, células vegetales, etc., como en estudios del efecto genotóxico en modelos animales, ecotóxico, y pro-oxidante o antioxidante de determinadas sustancias de interés, asimismo, para estudios del efecto de determinados alimentos, suplementos alimenticios o medicamentos en pacientes con patologías concretas que cursan con inflamación y desequilibrios oxidativos, como la diabetes, artritis reumatoide, Alzheimer, enfermedades cardiovasculares, arteriosclerosis, determinados tipos de cáncer, etc. o el segui-

miento de poblaciones concretas bien con diferentes hábitos alimenticios, bien sujetos a condiciones ambientales adversas, radiaciones, fumadores, etc.

Conclusiones:

El uso de la electroforesis unicelular alcalina o "Comet Assay" es una herramienta muy útil en la determinación del daño genotóxico en general, y muy especialmente en el daño oxidativo al ADN generado en células u organismos. El creciente número de publicaciones en los que se aplica esta técnica, así como su implantación como técnica de rutina en hospitales europeos pioneros, avalan su aplicabilidad y el potencial interés de sus resultados. Esta técnica nos permite estudiar el comportamiento de determinados componentes alimenticios en la prevención del daño oxidativo al ADN, así como de alimentos completos en animales o poblaciones concretas o la monitorización del efecto preventivo de patrones dietéticos en poblaciones con un alto riesgo genotóxico.

Bibliografía:

- Cernelli E., Baumgartner A., Anderson D. Antioxidants and the Comet assay. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 2009; 681 (1): 51-67.
- Mateos S., Daza P., Domínguez I., Cárdenas J.A., Cortés F. Genotoxicity detected in wild mice living in a highly polluted wetland area in south western Spain. *Environmental Pollution* 2008; 153 (3): 590-593.
- Olive, P.L., Banath, J.P., Durand, R.E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the 'comet' assay. *Radiation Research* 1990; 122 (1): 86-94.
- Ostling O., Johanson K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123: 291-298 (1984).
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 1988; 175: 184-191.
- Warleta F., Campos M., Allouche Y., Sánchez-Quezada C., Ruiz-Mora J., Beltrán G., Gaforio J.J. Squelene protects against oxidative DNA damage in MCF10A human mammary epithelial cells but not in MCF7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* 2010; 48(4): 1092-100.

Antioxidant, Antiproliferative, and Pro-apoptotic Capacities of Pentacyclic Triterpenes Found in the Skin of Olives on MCF-7 Human Breast Cancer Cells and Their Effects on DNA Damage

YOSRA ALLOUCHE,^{†,‡} FERNANDO WARLETA,[†] MARÍA CAMPOS,[†]
 CRISTINA SÁNCHEZ-QUESADA,[†] MARINO UCEDA,[‡] GABRIEL BELTRÁN,[‡] AND
 JOSÉ JUAN GAFORIO^{*†}

[†]Immunology Division, Department of Health Sciences, Faculty of Experimental Sciences, University of Jaén, Campus Las Lagunillas s/n, 23071 Jaén, Spain, and [‡]IFAPA Centro “Venta del Llano”, Junta de Andalucía, P.O. Box 50, Mengibar, Jaén E-23620, Spain

This research aimed to investigate erythrodiol, uvaol, oleanolic acid, and maslinic acid scavenging capacities and their effects on cytotoxicity, cell proliferation, cell cycle, apoptosis, reactive oxygen species (ROS) level, and oxidative DNA damage on human MCF-7 breast cancer cell line. The results showed that erythrodiol, uvaol, and oleanolic acid have a significant cytotoxic effect and inhibit proliferation in a dose- and time-dependent manner. At 100 μ M, erythrodiol growth inhibition occurred through apoptosis, with the observation of important ROS production and DNA damage, whereas uvaol and oleanolic acid growth inhibition involved cell cycle arrest. Moreover, although all tested triterpenes did not show free radical scavenging activity using ABTS and DPPH assays, they protected against oxidative DNA damage at the concentration 10 μ M. Uvaol and oleanolic and maslinic acids, tested at 10 and 100 μ M, also reduced intracellular ROS level and prevented H₂O₂-induced oxidative injury. Overall, the results suggest that tested triterpenes may have the potential to provide significant natural defense against human breast cancer.

KEYWORDS: Pentacyclic triterpenes; *Olea europaea*; olive oil; human breast cancer; antiproliferative activity; cell cycle arrest; apoptosis; antioxidant activity; DNA damage

INTRODUCTION

Breast cancer is the leading cause of mortality in women in developing countries (1). Of all environmental factors known to influence breast cancer, diet appears to be one of the most significant (2). Table olives and olive oil constitute regular dietary components of the traditional Mediterranean diet, which has been associated with a low incidence and prevalence of certain types of cancers, including breast cancer (3, 4). This healthy property is mainly ascribed to oleic acid (5), phenolic compounds (6), and squalene (7, 8). Nonetheless, other minor components have showed relevant interesting activities. Among them, erythrodiol, uvaol, oleanolic acid, and maslinic acid (Figure 1) are the main pentacyclic triterpenes located in the skin of olive fruits (9). These constituents are present in virgin olive oil (10) with higher concentration in olive pomace oil (11, 12). Among other biological activities, including anti-inflammatory and cardioprotective (13–15), these triterpenes were reported to possess antioxidant and antitumor properties. Indeed, they were shown to prevent lipid peroxidation (16, 17), protect low-density lipoproteins (LDL) against oxidation (15, 18), and suppress superoxide anion generation (19, 20). Furthermore, these bioactive compounds were found to inhibit the growth of tumor cell lines from various human cancers (21–25). Despite

these numerous papers, to the authors' best knowledge, to date there are no available studies regarding the effects of these triterpenes on breast cancer cells. Therefore, the present study was undertaken to investigate the antioxidant capacity of erythrodiol, uvaol, oleanolic acid, and maslinic acid and its relationship to their antiproliferative capacity and oxidative DNA damage protection, using MCF-7 cells as a model for malignant breast cancer cells. For this purpose, we studied triterpenes' scavenging activity and their effects on cell growth, cell cycle profile, apoptosis, intracellular oxidative stress, and DNA oxidative damage.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Reagents. The following reagents were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO): Hepes buffer; sodium pyruvate; nonessential amino acids mixture 100 $\times$ (NEAA); 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA); 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt (XTT sodium salt); 5-methylphenazinium methyl sulfate, *N*-methylphenazonium methyl sulfate (PMS); *DL*- α -tocopherol (vitamin E); 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox); 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH); 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazole-6-sulfonic acid) diammonium salt tablets (ABTS); phosphate buffer saline (PBS); and Hank's buffered salt solution (HBSS). Minimum essential medium with Eagle's salts (MEM), fetal bovine serum (FBS), and phenol-red-free Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI) were obtained from PAA Laboratories GmbH (Pasching, Austria). TrypLE Express and propidium iodide (PI) were

*Author to whom correspondence should be addressed (e-mail: jgaforio@ujaen.es; phone 0034 953212002; fax 0034 953212943).

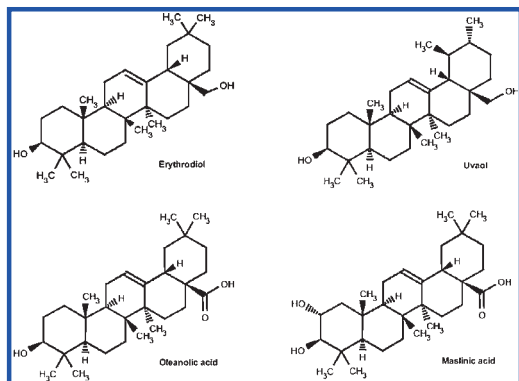


Figure 1. Chemical structures of erythrodiol, uvaol, oleanolic acid, and maslinic acid.

obtained from Invitrogen (Eugene, OR). $K_2S_2O_8$ was obtained from Panreac Quimica S.A.U (Barcelona, Spain). Culture plates were obtained from NUNC (Roskilde, Denmark). The PI/RNase Staining Buffer kit, FITC-conjugated annexin V, and binding buffer were obtained from BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA.). The comet assay kit was purchased from Trevigen, Inc. (Helgerman CT, Gaithersburg, MD).

Erythrodiol, uvaol, and oleanolic acid (purity ≥ 97 , 98.5, and 99%, respectively) were purchased from Extrasynthese (Genay, France). Maslinic acid (purity $> 80\%$) was provided by Dr. A. Garcia-Granados, Department of Organic Chemistry, University of Granada, Spain, and was obtained according to the patented method (26). Stock solutions of these compounds were prepared in ethanol and frozen at -20°C until use. For cell experiments, these stock solutions were then diluted in MEM to reach the desired concentration. The final concentration of ethanol in the medium was $< 0.6\%$ for the highest concentration tested and had no significant effect on cell viability. Controls also received the same amount of ethanol in all experiments.

ABTS Radical Scavenging Assay. ABTS cation radical scavenging activity was determined using a previously reported procedure (27). ABTS radicals ($ABTS^{+\bullet}$) were obtained by ABTS/ H_2O 0.5 mM reaction with $K_2S_2O_8$ for 16 h in the dark at room temperature. $ABTS^{+\bullet}$ was diluted in ultrapure water until the absorbance at 734 nm was $0.7 (\pm 0.1)$. Stock solutions of tested triterpenes and Trolox (as antioxidant reference) in ethanol (10 mM) were diluted with ultrapure water to reach the assayed concentrations. Triterpene concentrations ranged from 12.5 to 800 μM , whereas Trolox concentrations were from 50 to 800 μM . Twenty microliters of each concentration of triterpene, standard (Trolox), blank (ultrapure water), or ethanol control (8%) was added to a 96-well plate. The reaction was initiated by the addition of 280 μL of $ABTS^{+\bullet}$. Absorbance readings were taken every 5 min at 30°C during 120 min in a microplate reader (TECAN, GENios Plus). All determinations were carried out in triplicate. The inhibition of $ABTS^{+\bullet}$ was calculated according to the following percentage of free radical scavenging activity (% RSA) formula:

$$\% \text{ RSA} = [(A_{C(0)} - A_{A(t)})/A_{C(0)} \times 100]$$

Where $A_{C(0)}$ is the absorbance of the control (blank) at $t = 0$ and $A_{A(t)}$ is the absorbance in the presence of the triterpene or standard sample at $t = 60$ min.

DPPH Free Radical Scavenging Assay. The antioxidant activity of the tested triterpenes against the stable radical DPPH was measured as previously reported by Brand-Williams et al. (28) with some modifications. Briefly, a 100 μM ethanolic solution of DPPH was mixed with different ethanolic solutions of triterpenes in 96-well plates at 0.13, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, and 10 mol of antioxidant/mol of DPPH. α -Tocopherol was used as a standard antioxidant control in the range of concentration 0.13–1.00 mol ratio. A sample without antioxidant was also measured as a blank control. The decrease in absorbance at 520 nm was determined immediately and every 5 min during 120 min in a microplate reader (TECAN GENios plus). Measurements were performed in triplicate. The inhibition of DPPH radical was calculated according to the percentage of free radical scavenging activity (% RSA) described above (at $t = 60$ min).

Cell Lines and Culture. The MCF-7 (primary human breast cancer) cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) and was maintained at 37°C in a humidified atmosphere under $5\% \text{ CO}_2$ in MEM supplemented with $10\% \text{ FBS}$, $1\% \text{ Hepes}$ buffer, $1\% \text{ sodium pyruvate}$, and $1\% \text{ NEAA}$. Cells in the exponential growth phase were used for all experiments.

MDA-MB-231 (metastatic human breast cancer) and U937 (human histiocytic lymphoma) cell lines were used to compare the effect of triterpenes on apoptosis induction. These cell lines were cultivated using the same MCF-7 culture conditions.

Cytotoxicity Assay. The effect of the tested triterpenes on cell viability was determined by the XTT assay, which is based on the ability of live cells to cleave the tetrazolium ring, thus producing formazan, which absorbs at 570 nm (29). A total of 5×10^3 /well MCF-7 cells were grown onto 96-well plates for 24 h prior to treatment with increasing concentrations of triterpenes, from 12.5 to 100 μM , for another 24 h. Thereafter, plates were incubated with XTT in RPMI without phenol red for 3 h, and absorbance was measured at 450 nm wavelength (620 nm as reference) in a plate reader (TECAN GENios Plus). All measurements were performed in triplicate, and each experiment was repeated at least three times.

Cell Proliferation Assay. In the proliferation assay, MCF-7 cells were seeded at a density of 2×10^3 /well onto 96-well culture plates and allowed to adhere for 24 h. Thereafter, medium was replaced with fresh medium containing increasing concentrations of tested triterpenes, from 12.5 to 100 μM , and plates were incubated for 24, 48, or 120 h. After each time point, medium was substituted by a fresh culture medium and cells were allowed a proliferation period of 120, 96, or 24 h, respectively. Then, plates were incubated with XTT in RPMI without phenol red for 3 h, and absorbance was measured at 450 nm wavelength (620 nm as reference) in a plate reader (TECAN GENios Plus) (8). All measurements were done in triplicate, and each assay was made twice.

Cell Cycle Assay. MCF-7 cells were seeded in 12-well culture plates at a density of 1×10^5 /well. After 24 h, the cells were treated with or without (control) 10 and 100 μM triterpenes under study and incubated for an additional 24 h. They were then fixed with cold $70\% \text{ ethanol}$ and stored at -20°C for at least 24 h. Cells were subjected to flow cytometry analysis on an EPICS XL-MCL cytometer (Beckman Coulter, Spain) after propidium iodide labeling (PI/RNase staining buffer). The percentage of cells in sub G1, G0/G1, S, and G2/M phases was calculated using the FlowJo program (v5.7.2). The experiment was repeated at least three independent times.

Apoptosis Assay. The percentage of apoptotic cells was determined using a double staining assay with FITC-conjugated annexin V and propidium iodide (PI). MCF-7 cells (1×10^5 /well) in 12-well culture plates were treated after 24 h with or without 10 and 100 μM triterpenes for another 24 h. Subsequently, cells were harvested, washed twice in cold PBS, and resuspended in 100 μL of annexin binding buffer. Cells were stained with 5 μL of annexin V–FITC and 1 μL of PI solution, gently vortexed, and incubated for 15 min at room temperature in the dark before flow cytometric analysis. The experiment was repeated at least three independent times.

Detection of Intracellular Reactive Oxygen Species. The generation of intracellular reactive oxygen species (ROS) was evaluated on the basis of the intracellular peroxide-dependent oxidation of DCFH-DA to form a fluorescent compound, DCF, as described by Warleta et al. (8). Briefly, MCF-7 cells were seeded at a density of 1×10^4 /well on 96-well plates and grown for 24 h to allow adhesion. Subsequently, the medium was substituted with a fresh one containing 1, 10, or 100 μM tested triterpenes, and cells were incubated for another 24 h. Thereafter, cells were washed two times with HBSS and incubated with fresh DCFH-DA (100 μM) for 30 min at 37°C in $5\% \text{ CO}_2$. Cells were then washed twice and read in a plate reader for 30 min (Ex λ_{485} /Em λ_{535} , gain 60). The intracellular ROS level percentage was calculated as

$$F = [(F_{t=30} - F_{t=0})/F_{t=0} \times 100]$$

where $F_{t=0}$ is the fluorescence at $t = 0$ min and $F_{t=30}$ the fluorescence at $t = 30$ min.

Hydrogen peroxide (H_2O_2), a widely used model of in vitro oxidative stress, can directly damage DNA, lipids, and other macromolecules, causing oxidative injury to the cell (30). To evaluate whether erythrodiol, uvaol, oleanolic acid, or maslinic acid is able to reduce induced oxidative

Table 1. Percentage of Free Radical Scavenging Activity of Erythrodiol, Uvaol, Oleanolic Acid and Maslinic Acid Measured by Decolorization of ABTS^{•+} (A) and Reduction of the DPPH Radical (B)^a

(A)					
	Trolox	erythrodiol	uvaol	oleanolic acid	maslinic acid
12.5 μ M	ne	3.49 $\pm$ 0.34	4.08 $\pm$ 0.55	3.69 $\pm$ 0.43	4.39 $\pm$ 0.36
25 μ M	ne	2.61 $\pm$ 0.39	3.59 $\pm$ 0.36	3.19 $\pm$ 0.39	3.91 $\pm$ 0.24
50 μ M	17.61 $\pm$ 0.38	2.74 $\pm$ 0.26	3.57 $\pm$ 0.63	3.19 $\pm$ 0.43	4.83 $\pm$ 0.49
100 μ M	32.77 $\pm$ 0.77	2.30 $\pm$ 0.41	5.02 $\pm$ 0.86	2.66 $\pm$ 0.66	4.34 $\pm$ 0.37
200 μ M	58.70 $\pm$ 1.32	2.83 $\pm$ 0.56	5.25 $\pm$ 1.04	3.62 $\pm$ 1.09	5.86 $\pm$ 0.46
400 μ M	94.99 $\pm$ 0.77	2.08 $\pm$ 0.64	4.37 $\pm$ 1.05	5.92 $\pm$ 1.76	10.03 $\pm$ 0.68
800 μ M	99.06 $\pm$ 0.24	2.28 $\pm$ 0.16	4.60 $\pm$ 1.36	5.60 $\pm$ 1.67	18.32 $\pm$ 0.86

(B)					
mol AH/mol/DPPH	α -tocopherol	erythrodiol	uvaol	oleanolic acid	maslinic acid
0.13	44.33 $\pm$ 1.71	—	2.86 $\pm$ 0.63	—	0.20 $\pm$ 0.07
0.25	71.64 $\pm$ 2.10	—	1.69 $\pm$ 0.65	—	0.33 $\pm$ 0.11
0.50	81.50 $\pm$ 1.25	—	1.46 $\pm$ 0.61	—	0.75 $\pm$ 0.22
1.00	81.24 $\pm$ 1.19	—	2.26 $\pm$ 0.57	0.60 $\pm$ 0.35	2.08 $\pm$ 0.11
2.50	ne	3.47 $\pm$ 1.14	4.40 $\pm$ 0.64	3.42 $\pm$ 0.29	24.45 $\pm$ 0.23
5.00	ne	3.35 $\pm$ 0.69	3.42 $\pm$ 0.69	2.61 $\pm$ 0.61	42.37 $\pm$ 0.44
10.00	ne	8.24 $\pm$ 0.63	12.51 $\pm$ 1.19	10.48 $\pm$ 1.08	71.93 $\pm$ 0.38

^a Trolox and α -tocopherol were used as standard antioxidants control. Values represent the mean $\pm$ SEM of three independent experiments at $t = 60$ min. ne, not estimated. —, free radical scavenging capacity was not detected.

stress, cells were challenged with 500 μ M H₂O₂ 30 min before fluorescence quantification.

All measurements were performed in triplicate, and each experiment was repeated at least three times.

Alkaline Single-Cell Gel Electrophoresis (Comet Assay). MCF-7 cells were seeded at the density of 1×10^5 /well into 12-well plate cultures. After 24 h, they were treated with or without 10 and 100 μ M triterpenes for an additional 24 h. They were then scraped, washed twice (300g, 10 min, 4 °C) with cold $1 \times$ PBS (Ca²⁺/Mg²⁺ free), and resuspended in 1 mL of cold $1 \times$ PBS. After that, the comet assay was performed according to the method of Warleta et al. (8).

To assess whether triterpenes are able to protect against oxidative DNA damage, cell suspensions were exposed for 10 min to 50 μ M H₂O₂ at 4 °C. Cells washed twice with cold $1 \times$ PBS and resuspended in 1 mL of cold $1 \times$ PBS were then subjected to the comet assay procedure.

Slide Scoring and Analysis. DNA strand breaks were examined in a fluorescence microscope (Zeiss Axiovert 200) equipped with a Luca EMCCD camera (Andor Technology, Belfast, U.K.) under 494 nm excitation and 521 nm emission wavelength using the Comet 5.5 software package (Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, U.K.). Fifty cell images were randomly characterized per sample using $20\times$ magnification. Relative fluorescence between head and tail through the Olive tail moment (Olive_{TM}) was used to determine DNA damage.

Statistical Analysis. The results of free radical scavenging activity of tested triterpenes (% RSA) are presented as the mean of three independent experiments $\pm$ the standard error of the mean (SEM).

For cell assays, data are displayed as the mean of at least three independent experiments $\pm$ SEM, and results are expressed as a percentage relative to the untreated control cells, which was defined as 100%. A general variance analysis (ANOVA) was carried out on all data followed by Fisher's LSD test. A p value of < 0.05 was considered to be statistically significant. These statistical analyses were performed using Statgraphics Plus 5.1 statistical software (Statpoint Technologies, Inc., Warranton, VA).

RESULTS

Antioxidant Activity. The free radical scavenging capacity of triterpenes under study was evaluated by means of ABTS and DPPH assays. As shown in Table 1, erythrodiol, uvaol, and oleanolic acid have shown a weak free radical scavenging activity in both tests. Maslinic acid also exhibited a weak antiradical

activity up to 800 μ M and 2.50 mol ratio; however, from 5.00 mol ratio, a high DPPH scavenging activity was observed (RSA $> 70\%$ at 10.00 mol ratio).

Effects of Triterpenes on Cell Survival. MCF-7 cells were exposed to increasing concentrations, from 12.5 to 100 μ M, of erythrodiol, uvaol, oleanolic acid, and maslinic acid for 24 h, and then cell survival, compared with untreated controls, was evaluated using the XTT assay. As shown in Figure 2, the percentage of living cells decreased in a dose-dependent manner, respectively, from 25 and 50 μ M erythrodiol and uvaol. It is worth noting that at the same concentration of 100 μ M, the cytotoxic effect induced by erythrodiol was significantly stronger than that induced by uvaol (respectively, 12 and 64% of the cells still viable). Related to triterpenic acids, cell survival dropped slightly by 50 or 100 μ M oleanolic acid (89% of the cells still viable), whereas it was unaffected by the presence of maslinic acid.

Effects of Triterpenes on Cell Proliferation. The effects of tested triterpenes on MCF-7 cell proliferation was evaluated with concentrations ranging from 12.5 to 100 μ M after 24, 48, and 120 h of exposure (Figure 3). A dose- and time-dependent decrease in cell proliferation rate was achieved by erythrodiol and oleanolic acid. Cell proliferation was almost completely inhibited 24 h after MCF-7 exposure to 50 μ M erythrodiol and 100 μ M oleanolic acid (Figure 3A,C). Uvaol, however, showed a biphasic behavior; an increase in proliferation rate was observed at the concentration of 12.5 μ M, followed by a dose- and time-dependent proliferation inhibition from 25 μ M (Figure 3B). Finally, maslinic acid increased the MCF-7 cell proliferation rate (Figure 3D).

Effects of Triterpenes on Cell Cycle and Apoptosis. Figure 4 shows the effects of triterpenes on the different phases of the cell cycle. MCF-7 treatment with 10 μ M erythrodiol induced a significant increase in the population in G0/G1 phase (8%), whereas a 100 μ M concentration of this compound caused a marked decrease in the percentage of cells in G0/G1 (33%) and an increase in the percentage of cells in sub G1 phase (10-fold higher than untreated control cells) (Figure 4A). This sub G1 is normally associated with apoptosis. When cells were treated with a 10 μ M

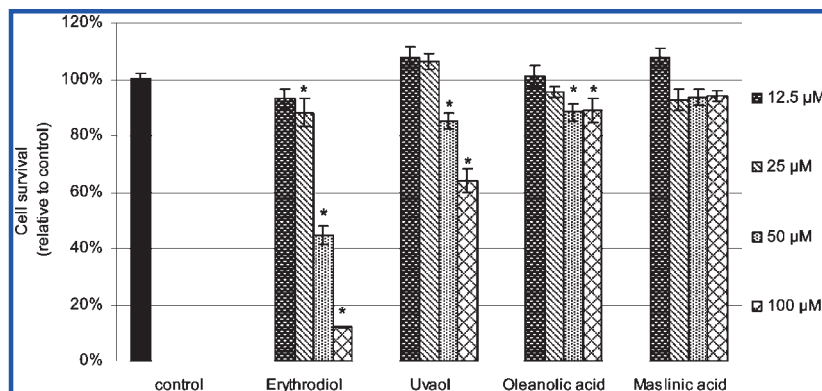


Figure 2. Effects of triterpenes on MCF-7 cell survival. Cells were treated with different concentrations of erythrodiol, uvaol, oleanolic acid, and maslinic acid for 24 h, and then cell survival was determined by the XTT assay. The results represent the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. * denotes statistically significant difference compared with control, which was considered to be 100% ($p < 0.05$).

concentration of either uvaol or oleanolic acid, no changes on cell cycle profiles were detected with respect to untreated controls. At the concentration of 100 μ M, uvaol induced a significant increase in G0/G1 phase (8%) and a decrease in S phase (41%) (Figure 4B). Similarly, 100 μ M oleanolic acid caused an increase in the population in G0/G1 (18%), with a concomitant decrease in the percentage of cells in the S phase (50%) and G2/M phase (34%) (Figure 4C). At both concentrations tested, maslinic acid did not induce significant change in the cell cycle profile (Figure 4D).

Assessment of apoptosis was performed by flow cytometry using annexin V-FITC and PI labeling, and the percentage of apoptotic cells was calculated from the ratio of the sum of early plus late apoptotic cells. Consistent with cell cycle analysis, 100 μ M erythrodiol strongly induced apoptosis (the apoptotic rate increased from 12% in control untreated cells to 64%), whereas no effect on apoptosis induction was observed by the rest of the triterpenes (Figure 5A).

In the same way, 100 μ M erythrodiol strongly induced apoptosis in MDA-MB-231 and U937 cells (the apoptotic rate increased from 7 to 83% and from 1 to 80%, respectively). The rest of the triterpenes did not induce apoptosis in MDA-MB-231, but they did in U937 cells (Figure 5B).

Effects of Triterpenes on Intracellular ROS Level. Measurement of intracellular ROS level using the DCFH-DA probe showed a significant decrease in ROS level in MCF-7 cells after 24 h of treatment with uvaol, oleanolic acid, and maslinic acid. However, in the case of erythrodiol, a marked increase in intracellular ROS level was observed at the concentration of 100 μ M, whereas no significant effect was observed at a 1 or 10 μ M concentration of this triterpene (Figure 6A).

To induce intracellular oxidative stress, H_2O_2 was added before fluorescence measurement. As shown in Figure 6B, H_2O_2 induced oxidative injury on MCF-7 cells. Thereafter, to investigate the in vitro preventive effect of triterpenes against H_2O_2 oxidative injury, the intracellular ROS level was measured in MCF-7 cells previously treated with 1, 10, and 100 μ M triterpenes. Our results revealed that uvaol, oleanolic acid, and maslinic acid protected against oxidative injury as compared to H_2O_2 control cells in the range of concentrations tested, whereas, as expected, 100 μ M erythrodiol did not show any protective effect, showing again an important increase in intracellular ROS level.

Effects of Triterpenes on DNA Integrity and H_2O_2 -Induced DNA Damage. The effects of triterpenes under study on DNA integrity and H_2O_2 -induced DNA damage in MCF-7 cells was evaluated using alkaline single-cell gel electrophoresis (comet assay),

and results were expressed as Olive_T_M. Olive_T_M incorporates a measure of both the smallest detectable size of migrating DNA (reflected in the comet tail length) and the number of relaxed/broken pieces (represented by the intensity of DNA in the tail) (31). Results showed that neither uvaol, oleanolic acid, or maslinic acid, at both doses tested, nor erythrodiol, at the lowest dose, affected DNA integrity. However, significant DNA damage was produced by 100 μ M erythrodiol as compared with control (Figure 7A).

MCF-7 treatment with 50 μ M H_2O_2 alone for 10 min (control H_2O_2) significantly increased Olive_T_M when compared with control (Figure 7B). Preincubation of MCF-7 cells with a 10 μ M concentration of either erythrodiol, uvaol, or oleanolic acid exerted a preventive effect against H_2O_2 -induced DNA damage (respectively, 63, 43, and 26% reduction), whereas at 100 μ M no longer was a preventive effect observed. Otherwise, MCF-7 cells treated with maslinic acid significantly decreased the formation of single-strand breaks (up to 76% reduction at 100 μ M) (Figure 7B).

DISCUSSION

In the present study, we have focused on erythrodiol, uvaol, oleanolic acid, and maslinic acid, four pentacyclic triterpenes found in *Olea europaea* (9–12). Previous papers have described the antiproliferative properties of these triterpenes against various cancer cells (21–25). However, their antitumor capacity against breast cancer has not yet been studied. Here, we report on the antiproliferative and antioxidant capacities of these triterpenes in the MCF-7 human breast cancer cell line, the first such study to date. Our results suggest that tested triterpenes may have the potential to provide significant natural defense against human breast cancer. This conclusion is based on the following findings: antiproliferative and cytotoxic effects, cell cycle arrest and/or induction of apoptosis, reduction of intracellular ROS level, and prevention against oxidative DNA damage, all depending on dose and chemical structure.

Cytotoxicity, a common preliminary method, is helpful to determine whether tested compounds have potential antineoplastic properties (32). Furthermore, increased proliferation and decreased cell death (apoptosis) are two major processes that contribute to the progression of tumor cell growth. The cytotoxic effect of oleanolic and maslinic acids has been previously reported on several tumor cell lines such as A549 (non-small-cell lung cells), SK-OV-3 (ovary), SK-MEL-2 (melanoma), XF-498 (central nervous system), HCT-15 (colon), HSC-2 (oral squamous cell carcinoma), and

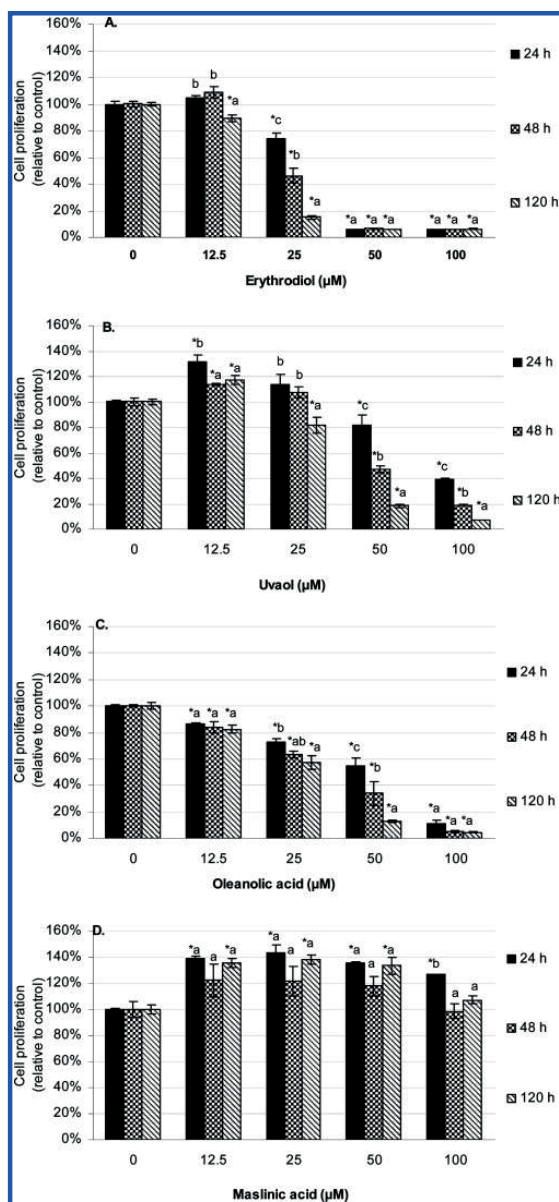


Figure 3. Effects of triterpenes on MCF-7 cell proliferation. Cells were treated with different concentrations of erythrodiol (A), uvaol (B), oleanolic acid (C), and maslinic acid (D) for 24, 48, and 120 h, and then cell proliferation, using the XTT assay, was determined after a proliferation period of up to 6 days. The results represent the mean $\pm$ SEM of two independent experiments and are expressed as percentage of the control, which was defined as 100%. * denotes statistically significant difference between concentrations for each time ($p < 0.05$). Different letters denote statistically significant difference between times for each concentration ($p < 0.05$).

HSG (salivary gland tumor) (33, 34). In addition, the antiproliferative capacity of erythrodiol, uvaol, oleanolic, and maslinic acids was described in Caco-2 and HT-29 colon cancer cell lines (21–23) and in 1321N1 astrocytoma cell line (24, 25). In this study, our results showed that erythrodiol, uvaol, and oleanolic acid significantly inhibited cell growth and proliferation in a dose- and

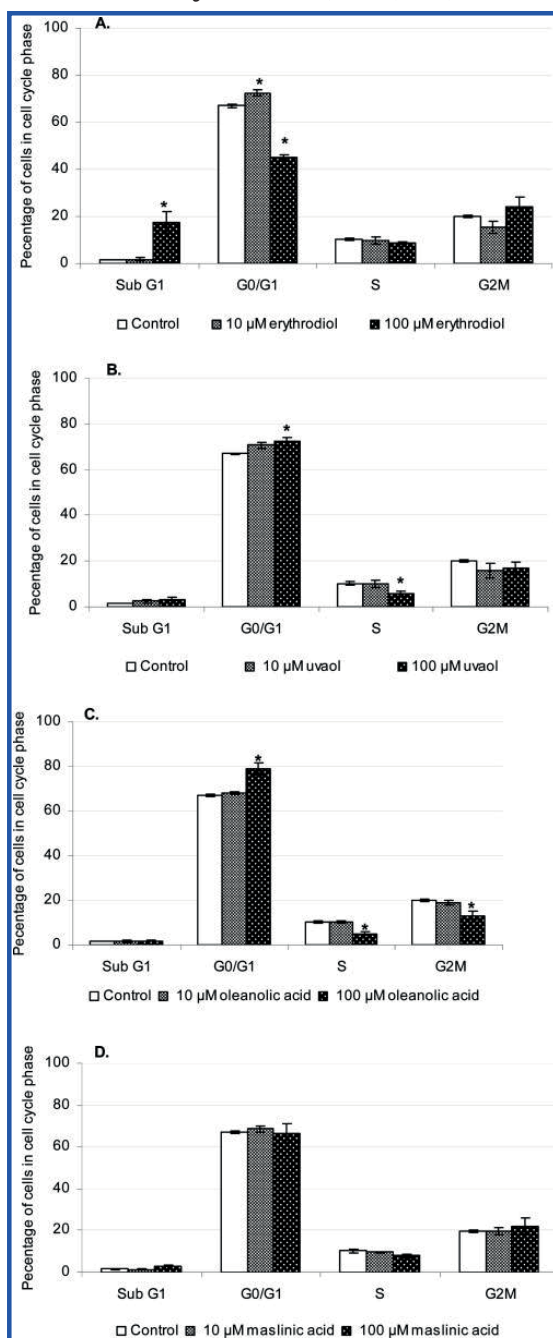


Figure 4. Effects of triterpenes on MCF-7 cell cycle distribution. Cells treated with 10 and 100 μ M erythrodiol (A), uvaol (B), oleanolic acid (C), and maslinic acid (D) for 24 h were collected and stained with PI after fixation by 70% ethanol. Following flow cytometry, cell cycle distribution was analyzed using the FlowJo program. The results represent the mean $\pm$ SEM of four independent experiments. * denotes statistically significant difference compared with control ($p < 0.05$).

time-dependent manner, the effect of erythrodiol being more pronounced. Hence, these data suggest that these triterpenes effectively reduced the malignancy and suppressed the generation

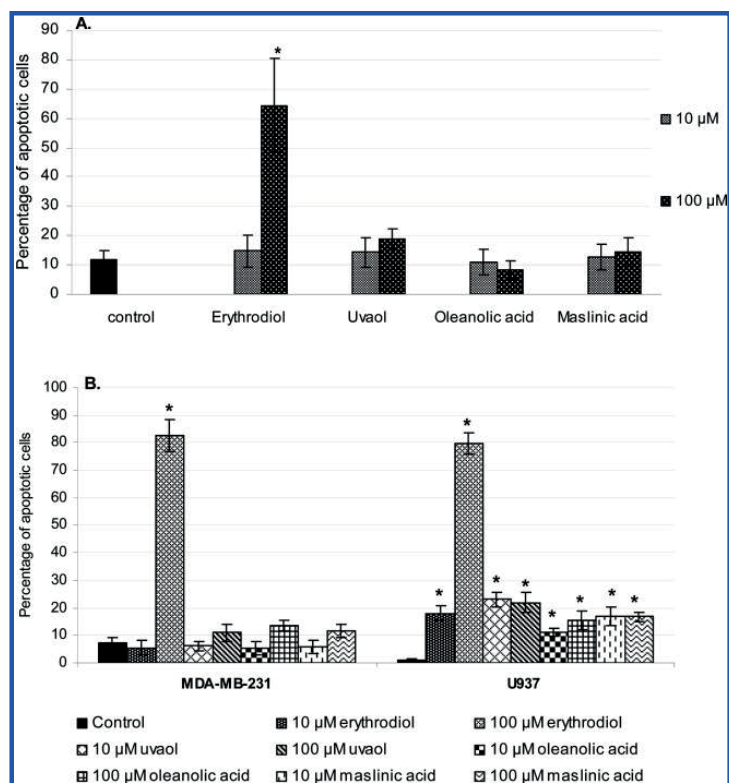


Figure 5. Effects of triterpenes on apoptosis induction on MCF-7 (A) and MDA-MB-231 and U937 cells (B). Cells treated with 10 and 100 μ M erythrodiol, uvaol, oleanolic acid, and maslinic acid for 24 h were collected and stained with FITC-conjugated annexin V and PI. Following flow cytometry, the percentage of apoptotic cells was calculated from the ratio of the sum of early plus late apoptotic cells using the FlowJo program. The results represent the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. * denotes statistically significant difference compared with control ($p < 0.05$).

potential of cancer cells. Uvaol showed a significant proliferative effect at the lowest dose of 12.5 μ M. It has been reported that at low doses, certain antioxidants can stimulate the growth of some types of cancer. For instance, vitamin C was found to stimulate the growth of both human parotid carcinoma cells and human leukemic cells in vitro (35), and vitamin E was found to enhance the growth of various prostate cancer cell lines (36). Future work is needed to clarify the mechanism of stimulation of cancer cell growth by some antioxidants.

It has been reported that some anticancer agents cause growth inhibition through interfering with the processes of cell cycle (37) and some others cause cell death by apoptosis (38). On the one hand, cell cycle is under strict regulation in the cell with numerous control points that allow correct progression of the different phases. In this sense, a delay in progression of the G0/G1, S, or G2/M cell cycle phases would constitute a cellular defense mechanism to allow action of the DNA repair systems (39). On the other hand, apoptosis is considered to be a physiologically important process that functions to eliminate undesired cells during development and homeostasis of multicellular organisms. Therefore, to determine whether cell cycle arrest or apoptosis is involved in growth inhibition, we examined cell cycle phase distribution and induction of apoptosis of the triterpene-treated cells by flow cytometry. Our results indicated that at the concentration of 100 μ M, uvaol and oleanolic acid inhibition of proliferation appeared to result from inhibition of cell cycle progression, because these compounds were found to be involved in the action of the G0/G1 checkpoint and inhibition of DNA replication. The

literature lacks studies on the potential antiproliferative capacity of uvaol. Nonetheless, recently Martin et al. (25) reported that uvaol growth-inhibiting activity is associated with the induction of apoptosis in 1321N1 astrocytoma cells. These authors observed that exposure of 1321N1 cells to 50 and 100 μ M uvaol for 18 h induces apoptosis around 40–60%. Instead, and in agreement with our results, Li et al. (40) and Cipak et al. (41) reported that oleanolic acid, at the concentration of 60 μ M, inhibition of proliferation occurred through G0/G1 phase arrest, respectively, after 72 and 24 h of exposure in HCT-15 colon adenocarcinoma cell line and HL-60 leukemic cell line. By contrast, in another study it was found that oleanolic acid inhibition of proliferation is mediated via apoptosis in 1321N1 astrocytoma cells treated for 18 h with a 25 μ M concentration of this triterpenic acid (24). Differences in uvaol and oleanolic acid responses are therefore most likely due to the specific cell type and concentration and treatment time used. Moreover, in our study, it was found that uvaol and oleanolic acid did not induce apoptosis in MDA-MB-231 human breast adenocarcinoma cell line but did in U937 human leukemic cell line, and it was not dose-dependent. Otherwise, our results suggest that 100 μ M erythrodiol inhibition of MCF-7 cell proliferation appeared to result from the occurrence of apoptosis. Erythrodiol was also found to strongly induce apoptosis in MDA-MB-231 and U937 cells. Our findings are in agreement with others previously reported (23, 25) describing that erythrodiol antiproliferative activity is associated with the induction of apoptosis and that erythrodiol apoptotic potential appears to be a generalized event.

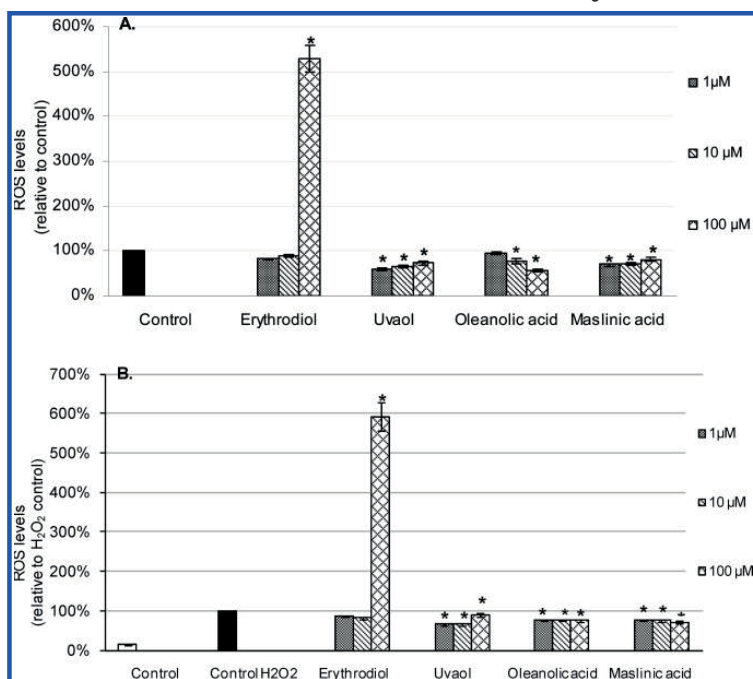


Figure 6. (A) Intracellular ROS level in MCF-7 cells after triterpene treatment. Cells were treated with different concentrations of erythrodiol, uvaol, oleanolic acid, and maslinic acid for 24 h, and then intracellular ROS level was measured by DCFH-DA probe. The results represent the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. * denotes statistically significant difference compared with control, which was considered to be 100% ($p < 0.05$). (B) Capacity of triterpenes to reduce MCF-7 oxidative stress induced by H₂O₂ addition measured by DCFH-DA probe. The results represent the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. * denotes statistically significant difference compared with positive control (control H₂O₂), which was considered to be 100% ($p < 0.05$).

Under our experimental conditions, incubation of MCF-7 cells for 24 h with maslinic acid did not exert any signs of cytotoxicity or alter cell cycle parameters, nor did it induce apoptosis. However, it increased proliferation rate. Our results are in contrast with others reported previously describing the antiproliferative and apoptosis-inducing effect of maslinic acid on colon and brain cancers (21, 22, 24, 42, 43). On the other hand, it was observed that maslinic acid induces apoptosis in U937 leukemic cells. Differences in susceptibility to maslinic acid may be therefore due to differences in the nature of the cell line. Further studies should be done to understand the mechanism by which maslinic acid stimulates MCF-7 cells proliferation.

It has been reported that many anticancer compounds exert antitumor activity including antioxidant mechanism (44). The triterpenes under study have been previously reported to possess antioxidant properties in a variety of experimental systems (15–20). However, to the authors' best knowledge, very little is known about the triterpenes' free radical scavenging activity. Using ABTS and DPPH chemical assays, our results indicated that the tested triterpenes lack free radical scavenging capacity. Accordingly, Yang et al. (45) reported that oleanolic and maslinic acids did not possess DPPH scavenging capacity up to the concentration of 200 μ M. Nonetheless, in our study it was found that at very high mole ratio (up to 5.00 mol), maslinic acid exhibited a high DPPH scavenging capacity. Furthermore, we recently reported that maslinic acid, unlike the rest of the triterpenes, acts as an efficient peroxyl radical scavenger as assessed by the ORAC assay (15).

On the other hand, at present, overwhelming evidence indicates that ROS are involved in both the initiation and progression of cancer (46). In this sense, the cancer chemopreventive properties of antioxidants are generally believed to be due to their ability to

scavenge endogenous ROS (47). Furthermore, oxidative stress may result in an increase in oxidative damage and can be caused either by an overproduction of free radicals and ROS or by an impairment of the endogenous antioxidant system. In this paper, DCFH-DA assay results showed that uvaol and oleanolic and maslinic acids decreased significantly the steady-state generation of ROS by MCF-7 in culture. In addition, it was found that increased levels of ROS generated during the oxidative stress period (30 min of H₂O₂ exposure) were quenched in cells pre-treated with these triterpenes. Overall, our data indicate that in the cellular system, uvaol and oleanolic and maslinic acids behaved as antioxidants, reducing both endogenous and exogenous ROS levels.

On the other hand, ROS levels have been shown to play an important role in the initiation and execution of apoptosis of many anticancer compounds (48). In this sense, erythrodiol, uvaol, oleanolic acid, and maslinic acid induction of apoptosis was found to be preceded by ROS generation in astrocytoma cells (24, 25). The same effect was observed by maslinic acid in HT-29 cells (42). On basis of these observations, in our study the increase in intracellular ROS level in MCF-7 cells treated with 100 μ M erythrodiol may be related to apoptosis induction. Further experiments should be performed to study the detailed mechanism of apoptosis.

The comet assay provides a simple and effective method for evaluating DNA damage at the single-cell level. As expected, MCF-7 cell treatment with uvaol, oleanolic acid, or maslinic acid showed no genotoxicity at both doses tested. Similarly, 10 μ M erythrodiol did not induce DNA damage. By contrast, and consistent with apoptosis and ROS results, 100 μ M erythrodiol was found to produce high DNA damage.

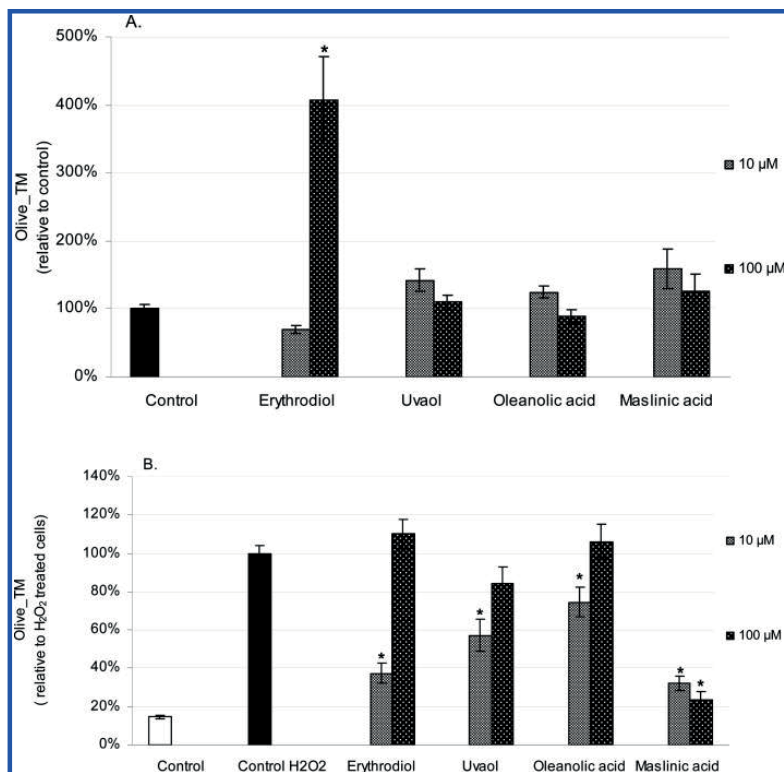


Figure 7. (A) Effects of triterpenes on DNA integrity assessed by the comet assay. MCF-7 cells treated with 10 and 100 μ M erythrodiol, uvaol, oleanolic acid, and maslinic acid for 24 h were subjected to comet assay. Olive_TM values represent the mean $\pm$ SEM. * denotes statistically significant difference compared with control, which was considered to be 100% ($p < 0.05$). (B) Effects of triterpenes on DNA oxidative damage induced by H₂O₂ addition evaluated by the comet assay. Olive_TM values represent the mean $\pm$ SEM. * denotes statistically significant difference compared with positive control (control H₂O₂), which was considered to be 100% ($p < 0.05$).

H₂O₂ is suggested to cause DNA strand breakage by the generation of hydroxyl radicals (OH $\cdot$) through the Fenton or Fenton-like reactions (49). In fact, in our study it was found that preincubation of MCF-7 cells with H₂O₂ for 10 min caused marked DNA damage. Very little is known regarding the effect of the tested triterpenes against DNA-induced oxidative injury, and only Ovesná et al. (50) have previously reported the effect of oleanolic acid against H₂O₂-induced DNA damage. These authors concluded that this triterpene significantly reduced DNA-induced oxidative injury in leukemic L1210, K562, and HL-60 cells in the concentration range from 2.5 to 10 μ M. In agreement, in our experiment it was found that at 10 μ M, oleanolic acid, as well as erythrodiol and uvaol, exhibited a protective effect against DNA damage caused by H₂O₂. However, no longer was a protective capacity observed when tested at 100 μ M. By contrast, maslinic acid displayed a protective capacity at both doses tested.

According to Iliakis et al. (51), the DNA damage response is a hierarchical process; to allow time for DNA repair, the cells activate checkpoint pathways that delay the normal progression of the cell cycle. Checkpoints, together with repair and apoptosis, are integrated in a circuitry that determines the ultimate response of a cell to DNA damage. Therefore, our results, taken together, suggest that at low dose (10 μ M), erythrodiol, uvaol, oleanolic acid, and maslinic acid in a dose-independent manner act as antioxidants scavenging superoxide and hydroxyl radicals produced by H₂O₂, thus preventing the impairment of mitochondrial function and consequently avoiding MCF-7 cell death. However,

the absence of protective activity against DNA-induced damage in MCF-7 cells pretreated with high doses (100 μ M) of erythrodiol, uvaol, and oleanolic acid may be linked to their capacity to activate other signaling pathways, resulting in cell cycle arrest and/or apoptosis and, thus, proliferation inhibition. Additional experiments to get a better understanding of the triterpenes' mechanisms of action are in progress.

In relation to the chemical structures, these pentacyclic triterpenes can be classified as alcoholic or acid (Figure 1). Although the structure and activity relationships of these pentacyclic triterpenes are far from clear, it seems that the $-\text{CH}_2\text{OH}$ group at C-28 enhances the cytotoxic capacity of the triterpenic diols as compared to triterpenic acids ($-\text{COOH}$ at C-28). In addition, the pro-apoptotic capacity of erythrodiol may be related to the presence of two methyl groups at C-20. Maslinic acid differs from the other triterpenes by the presence of an additional $-\text{OH}$ group at C-2, which appears to suppress the cytotoxic effect and confer it antioxidant activity.

To the authors' best knowledge, to date, there are no studies reporting the bioavailability of these triterpenes. Therefore, it is difficult to predict the presence of these compounds or their derived metabolites in the blood after consumption of a triterpene-rich diet. In any case, the concentrations used in the present study are similar to those previously reported (21–25).

In conclusion, our results provide new insight into the anti-carcinogenic action of erythrodiol, uvaol, oleanolic acid, and maslinic acid in human breast cancer. Moreover, our findings

support the hypothesis that these triterpenes, isolated in appreciable higher amounts from the non-glyceride fraction of pomace olive oil, may be considered as valuable molecules for use as cancer chemotherapeutic or chemopreventive agents.

LITERATURE CITED

- (1) Coughlin, S. S.; Ekweme, D. U. Breast cancer as a global health concern. *Cancer Epidemiol.* **2009**, *33*, 315–318.
- (2) Michels, K. B. The contribution of the environment (especially diet) to breast cancer risk. *Breast Cancer Res.* **2002**, *4*, 58–61.
- (3) Escribá, E.; Ramírez-Tortosa, M. C.; Sánchez-Rovira, P.; Colomer, R.; Solanas, M.; Gaforio, J. J. Olive oil in cancer prevention and progression. *Nutr. Rev.* **2006**, *64*, S40–S52.
- (4) Martín-Moreno, J. M.; Willett, W. C.; Gorgojo, L.; Banegas, J. R.; Rodríguez-Artalejo, F.; Fernández-Rodríguez, J. C.; Maisonneuve, P.; Boyle, P. Dietary fat, olive oil intake and breast cancer risk. *Int. J. Cancer* **1994**, *58*, 774–780.
- (5) Binukumar, B.; Mathew, A. Dietary fat and risk of breast cancer. *World J. Surg. Oncol.* **2005**, *3*, 45.
- (6) Menéndez, J. A.; Vázquez-Martín, A.; Oliveras-Ferreras, C.; García-Villalaba, R.; Carrasco-Pancorbo, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; Segura-Carretero, A. Extra-virgin olive oil polyphenols inhibit HER2 (erb-2)-induced malignant transformation in human breast epithelial cells: relationship between the chemical structures of extra-virgin olive oil secoiridoids and lignans and their inhibitory activities on the tyrosine kinase activity of HER2. *Int. J. Oncol.* **2009**, *34*, 43–51.
- (7) Newmark, H. L. Squalene, olive oil, and cancer risk: a review and hypothesis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **1997**, *6*, 1101–1103.
- (8) Warleta, F.; Campos, M.; Allouche, Y.; Sánchez-Quesada, C.; Ruiz-Mora, J.; Beltrán, G.; Gaforio, J. J. Squalene protects against oxidative DNA damage in MCF10A human mammary epithelial cells but not in MCF7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 1092–1100.
- (9) Bianchi, G.; Murelli, C.; Vlahov, G. Surface waxes from olive fruits. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3503–3506.
- (10) Allouche, Y.; Jiménez, A.; Uceda, M.; Aguilera, M. P.; Gaforio, J. J.; Beltrán, G. Triterpenic content and chemometric analysis of virgin olive oils from forty olive cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 3604–3610.
- (11) Pérez-Camino, M. C.; Cert, A. Quantitative determination of hydroxy pentacyclic triterpene acids in vegetable oils. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1558–1562.
- (12) Cañabate-Díaz, B.; Segura Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; Belmonte Vega, A.; Garrido Frenich, A.; Martínez Vidal, J. L.; Duran Martos, J. Separation and determination of sterols in olive oil by HPLC-MS. *Food Chem.* **2007**, *102*, 593–598.
- (13) Márquez-Martín, A.; De La Puerta, R.; Fernández-Arche, A.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Yaqoob, P. Modulation of cytokine secretion by pentacyclic triterpenes from olive pomace oil in human mononuclear cells. *Cytokine* **2007**, *36*, 211–217.
- (14) Rodríguez-Rodríguez, R.; Perona, J. S.; Herrera, M. D.; Ruiz-Gutiérrez, V. Triterpenic compounds from orujo olive oil elicit vasorelaxation in aorta from spontaneously hypertensive rats. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 2096–2102.
- (15) Allouche, Y.; Beltrán, G.; Gaforio, J. J.; Uceda, M.; Mesa, M. D. Antioxidant and antiatherogenic activities of pentacyclic triterpene diols and acids. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 2885–2890.
- (16) Montilla, M. P.; Agil, A.; Navarro, M. C.; Jimenez, M. I.; García-Granados, A.; Parra, A.; Cabo, M. M. Antioxidant activity of maslinic acid, a triterpene derivative obtained from *Olea europaea*. *Planta Med.* **2003**, *69*, 472–474.
- (17) Perona, J. S.; Arcemis, C.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Catalá, A. Effect of dietary high oleic acid oils that are rich in antioxidants on microsomal lipid peroxidation in rats. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 730–735.
- (18) Andrikopoulos, N. K.; Kaliora, A. C.; Assimopoulou, A. N.; Papageorgiou, V. P. Inhibitory activity of minor polyphenolic and nonpolyphenolic constituents of olive oil against *in vitro* low-density lipoprotein oxidation. *J. Med. Food* **2002**, *5*, 1–7.
- (19) Chen, G.; Lu, H.; Wang, C.; Yamashita, K.; Manabe, M.; Xu, S.; Kodama, H. Effect of five triterpenoid compounds isolated from leaves of *Diospyros kaki* on stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation in human polymorphonuclear leukocytes. *Clin. Chim. Acta* **2002**, *320*, 11–16.
- (20) Leu, Y. L.; Kuo, S. M.; Hwang, T. S.; Chu, S. H. The inhibition of superoxide anions generations by neutrophils from *Viscum articulatum*. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *2*, 58–60.
- (21) Juan, M. E.; Wenzel, U.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Daniel, H.; Planas, J. M. Olive fruits extracts inhibit proliferation and induce apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. *J. Nutr.* **2006**, *136*, 2553–2557.
- (22) Reyes, F. J.; Centelles, J. J.; Lupiáñez, J. A.; Cascante, A. (2 α ,3 β)-2,3-Dihydroxyolean-12-en-28-oic acid, a new natural triterpene from *Olea europaea*, induces caspase dependent apoptosis selectively in colon adenocarcinoma cells. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 6302–6310.
- (23) Juan, M. E.; Wenzel, U.; Daniel, H.; Planas, J. M. Erythrodilol, a natural triterpenoid from olives, has antiproliferative and apoptotic activity in HT-29 human adenocarcinoma cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, 595–599.
- (24) Martín, R.; Carvalho, J.; Ibeas, E.; Hernández, M.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Nieto, M. L. Acidic triterpenes compromise growth and survival of astrocytoma cell lines by regulating reactive oxygen species accumulation. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 3741–3751.
- (25) Martín, R.; Ibeas, E.; Carvalho-Tavares, J.; Hernández, M.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Nieto, M. L. Natural triterpene diols promote apoptosis in astrocytoma cells through ROS-mediated mitochondrial depolarization and JNK activation. *PLoS One* **2009**, *4*, e5975.
- (26) García-Granados, A. Process for the industrial recovery of oleanolic and maslinic acids contained in the olive milling byproducts. Patent PCT/ES97/00190, 1997.
- (27) Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237.
- (28) Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* **1995**, *28*, 25–30.
- (29) Scudiero, D. A.; Shoemaker, R. H.; Paull, K. D.; Monks, A.; Tierney, S.; Nofziger, T. H.; Currens, M. J.; Seniff, D.; Boyd, M. R. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* **1988**, *48*, 4827–4833.
- (30) Lee, D. H.; Lim, B. S.; Lee, Y. K.; Yang, H. C. Effects of hydrogen peroxide (H₂O₂) on alkaline phosphatase activity and matrix mineralization of odontoblast and osteoblast cell lines. *Cell Biol. Toxicol.* **2006**, *22*, 39–46.
- (31) Singh, N. P.; McCoy, M. T.; Tice, R. R.; Schneider, E. L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **1988**, *175*, 184–191.
- (32) Arunporn, I.; Peter, J.; Houghton, E.; Amooquaye, E. *In vitro* cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *90*, 33–38.
- (33) Kim, Y. K.; Yoon, S. K.; Ryu, S. Y. Cytotoxic triterpenes from stem bark of *Physocarpus intermedius*. *Planta Med.* **2000**, *66*, 485–486.
- (34) Taniguchi, S.; Imayoshi, Y.; Kobayashi, E.; Takamatsu, Y.; Ito, H.; Hatano, T.; Sakagami, H.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Sugita, D.; Shimura, S.; Yoshida, T. Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica* calli. *Phytochemistry* **2002**, *59*, 315–323.
- (35) Prasad, K. N.; Cole, W. C.; Kumar, B.; Prasad, C. Scientific rationale for using high-dose multiple micronutrients as an adjunct to standard and experimental cancer therapies. *J. Am. Coll. Nutr.* **2001**, *20*, 450S–463S.
- (36) Bureyko, T.; Hurdle, H.; Metcalfe, J. B.; Clandinin, M. T.; Mazurak, V. C. Reduced growth and integrin expression of prostate cells cultured with lycopene, vitamin E and fish oil *in vitro*. *Br. J. Nutr.* **2009**, *101*, 990–997.
- (37) Schwartz, G. K.; Shah, M. A. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 9408–9421.
- (38) Thompson, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **1995**, *267*, 1456–1462.
- (39) Houtgraaf, J. H.; Versmissen, J.; van der Giessen, W. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovasc. Revasc. Med.* **2006**, *7*, 165–172.

- (40) Li, J.; Guo, W. J.; Yang, Q. Y. Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15. *World J. Gastroenterol.* **2002**, *8*, 493–495.
- (41) Cipak, L.; Grausova, L.; Miadokova, E.; Novotny, L.; Rauko, P. Dual activity of triterpenoids: apoptotic versus antidiifferentiation effects. *Arch. Toxicol.* **2006**, *80*, 429–435.
- (42) Juan, M. E.; Planas, J. M.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Daniel, H.; Wenzel, U. Antiproliferative and apoptosis-inducing effects of maslinic and oleanolic acids, two pentacyclic triterpenes from olives, on HT-29 colon cancer cells. *Br. J. Nutr.* **2008**, *100*, 36–43.
- (43) Reyes-Zurita, F. J.; Rufino-Palomares, E. R.; Lupiáñez, J. A.; Cascante, M. Maslinic acid, a natural triterpenes from *Olea europaea* L., induces apoptosis in HT29 human colon-cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway. *Cancer Lett.* **2009**, *273*, 44–54.
- (44) Pan, M. H.; Ghai, G.; Ho, C. T. Food bioactives, apoptosis, and cancer. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, 43–52.
- (45) Yang, Z. G.; Li, H. R.; Wang, L. Y.; Li, Y. H.; Lu, S. G.; Wen, X. F.; Wang, J.; Daikonoya, A.; Kitanaka, S. Triterpenoids from *Hippophae rhamnoides* L. and their nitric oxide production-inhibitory and DPPH radical-scavenging activities. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 15–18.
- (46) Waris, G.; Ahsan, H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J. Carcinog.* **2006**, *5*, 14.
- (47) Qian, Y. P.; Cai, Y. J.; Fan, G. J.; Wei, Q. Y.; Yang, J.; Zheng, L. F.; Li, X. Z.; Fang, J. G.; Zhou, B. Antioxidant-based lead discovery for cancer chemoprevention: the case of resveratrol. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1963–1974.
- (48) Kroemer, G.; Galluzzi, L.; Brenner, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* **2007**, *87*, 99–163.
- (49) Deutsch, J. C. Ascorbic acid oxidation by hydrogen peroxide. *Anal. Biochem.* **1998**, *255*, 1–7.
- (50) Ovesná, Z.; Kozics, K.; Slameňová, D. Protective effects of ursolic and oleanolic acid in leukemic cells. *Mutat. Res.* **2006**, *600*, 131–137.
- (51) Iliakis, G.; Wang, Y.; Guan, J.; Wang, H. DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene* **2003**, *22*, 5834–5847.

Received for review June 16, 2010. Revised manuscript received November 16, 2010. Accepted November 23, 2010. This study was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación e INIA (RTA2008-00066-C03-03), Instituto Andaluz de Biotecnología (BIOÁNDALUS 08/22/L5.3), and Centro de Excelencia en Investigación sobre Aceite de Oliva y Salud (CEAS).

**Rank in Category: JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY****Journal Ranking** ⓘ

For **2010**, the journal **JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY** has an Impact Factor of **2.816**.

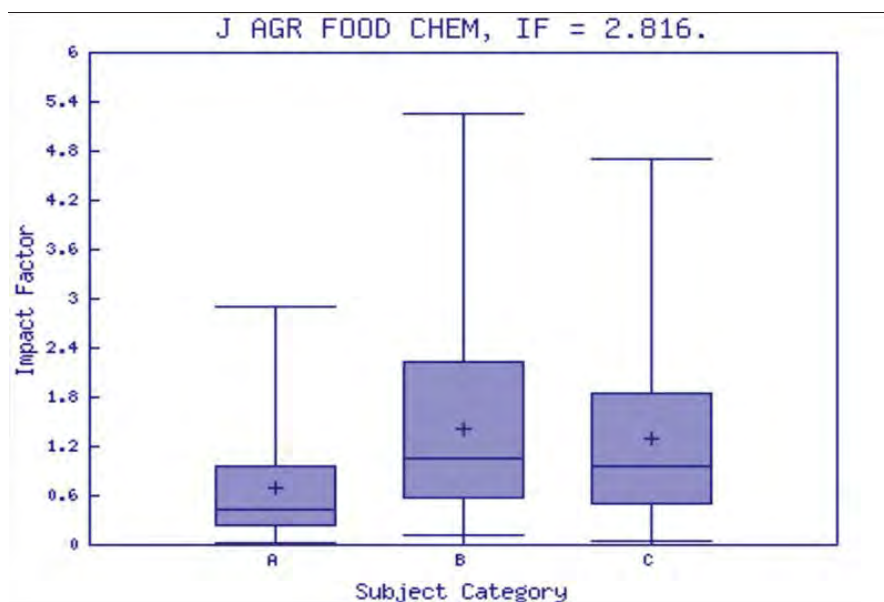
This table shows the ranking of this journal in its subject categories based on Impact Factor.

Category Name	Total Journals in Category	Journal Rank in Category	Quartile in Category
AGRICULTURE, MULTIDISCIPLINARY	55	2	Q1
CHEMISTRY, APPLIED	70	8	Q1
FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY	128	10	Q1

Category Box Plot ⓘ

For **2010**, the journal **JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY** has an Impact Factor of **2.816**.

This is a box plot of the subject category or categories to which the journal has been assigned. It provides information about the distribution of journals based on Impact Factor values. It shows median, 25th and 75th percentiles, and the extreme values of the distribution.

**Key**

- A - AGRICULTURE, MULTIDISCIPLINARY
- B - CHEMISTRY, APPLIED
- C - FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY





Contents lists available at ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchemtox

Squalene protects against oxidative DNA damage in MCF10A human mammary epithelial cells but not in MCF7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells

Fernando Warleta^a, María Campos^a, Yosra Allouche^{a,b}, Cristina Sánchez-Quesada^a, Jesús Ruiz-Mora^a, Gabriel Beltrán^b, José J. Gaforio^{a,*}

^aImmunology Division, Department of Health Sciences, Faculty of Experimental Sciences, University of Jaén, Campus las Lagunillas s/n, 23071 Jaén, Spain

^bInstituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera y de la Producción Ecológica (IFAPA), Centro "Venta del Llano", 23620 Mengibar, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 October 2009

Accepted 28 January 2010

Keywords:

Squalene

Human breast cancer

Comet assay

Virgin olive oil

Cancer prevention

ABSTRACT

Until now, very little has been known about the antioxidant capacity of squalene and its effect on human breast tumorigenesis. In the present work, we investigated squalene's scavenging properties and its effect on cell proliferation, cell cycle profile, apoptosis, reactive oxygen species (ROS) level and oxidative DNA damage, using human breast cell lines. Our results showed that squalene neither possesses scavenging activity nor significantly alters cell proliferation rates, the cell cycle profile or cell apoptosis in human mammary epithelial cells (MCF10A), minimally invasive (MDA-MB-231) breast cancer cells, and highly invasive (MCF7) breast cancer cells. However, we found that squalene did exert the following effects on MCF10A epithelial cells in a dose-dependent manner: (a) it decreased intracellular ROS level, (b) it prevented H₂O₂-induced oxidative injury, and (c) it protected against oxidative DNA damage. Interestingly, squalene did not exert these effects on MCF7 and MDA-MB-231 cancer cells. Therefore, our data suggest that squalene, found in high amounts in virgin olive oils, could be partially responsible for the lower incidence of breast cancer in populations that consume the Mediterranean diet due to its protective activity against oxidative DNA damage in normal mammary cells.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Olive oil is the principal source of fat in the Mediterranean diet (Pérez-Jiménez et al., 2005). Consumption of olive oil has been associated with a low incidence and prevalence of cancer, including breast cancer (Escrib et al., 2006; Owen et al., 2000a). It has been suggested that the lower risk of breast cancer associated with high olive oil consumption may be due to the presence of squalene (Newmark, 1997).

Abbreviations: AAPH, 2,2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride; ABTS, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid); CPT, camptothecin; DCFH-DA, 2,2',7,7'-dichlorofluorescein diacetate; DMSO, dimethyl sulfoxide; DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EMCCD, electron-multiplying charge coupled device; FBS, foetal bovine serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; FL, fluorescein; HBSS, Hank's balanced salt solution; HuMEC, human mammary epithelial cells medium; LMA, low melting point agarose; MEM, minimum essential medium; NEAA, non-essential amino acids; NMA, normal melting point agarose; ORAC, oxygen radical absorbance capacity; PBS, phosphate buffer saline; PI, propidium iodide; PMS, phenazine methosulphate; ROS, reactive oxygen species; RPMI, Roswell park memorial institute 1640 medium; TOC, α -tocopherol; XTT, (3'-[1-[(phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate).

* Corresponding author. Tel.: +34 953212002; fax: +34 953211851.

E-mail address: jgaforio@ujaen.es (J.J. Gaforio).

0278-6915/\$ - see front matter © 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.fct.2010.01.031

Squalene (2,6,10,15,19,23-hexamethyl-2,6,10,14,18,20-tetracosahexane) is a triterpenic hydrocarbon present at high concentrations in shark liver and virgin olive oils. In virgin olive oil, it is the major hydrocarbon (more than 90%), with content ranging from 0.8 to 13 g/kg (Allouche et al., 2007; Cert et al., 2000; Owen et al., 2000b). Squalene, an intermediate metabolite in cholesterol metabolism, is considered a remarkable bioactive substance, with several interesting biological activities, including antioxidant and antitumour properties (Owen et al., 2000a). Indeed, *in vitro* experimental evidence indicates that this compound is a highly effective singlet oxygen scavenging agent (Saint-Leger et al., 1986) and a chemopreventive agent against chemically-induced cancer (Smith, 2000; Sotiroudis and Kyrtopoulos, 2008). Moreover, squalene is able to inhibit aberrant hyperproliferation, an event that precedes mammary tumorigenesis *in vivo* (Katdare et al., 1997), and to play a tumour-inhibiting role in animal models (Murakoshi et al., 1992; Newmark, 1997; Rao et al., 1998).

Despite evidence suggesting its anticarcinogenic and antitumour properties, there are no available studies on the effects of squalene either on human breast tumour or human mammary epithelial cells. Therefore, the aim of this paper was to investigate squalene's possible antioxidant effects and their relation to its anti-proliferative capacity and oxidative DNA damage protection in both human breast cancer cell lines (MCF7 and MDA-MB-231).

and an immortalized non-tumorigenic human mammalian epithelial cell line (MCF10A). For this purpose, we studied squalene's scavenging activity and its effects on cell proliferation, cell cycle profile, apoptosis, intracellular oxidative stress and DNA oxidative damage.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The following were purchased from Sigma–Aldrich Co. (St Louis, MO): Hepes Buffer; Sodium Pyruvate; non-essential amino acids mixture 100× (NEAA); 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA); dimethyl sulfoxide (DMSO); 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt (XTT sodium salt) purity ≥90%; 5-methylphenazinium methyl sulfate; N-methylphenazonium methyl sulfate (PMS) purity ~98%; 2,6,10,15,19,23-hexamethyl-2,6,10,14,18,20-tetracosahexane (squalene CAS 111-02-4) purity ≥98%; DL-all-rac- α -tocopherol (Vitamin E CAS 10191-41-0 (TOC)) purity ≥96%; 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox™ CAS 53188-07-1 (TR)) purity ≥97%; 2,2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH) purity ~97%; 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) purity ~90%; (S)-(+)-camptothecin (CAS 7689-03-4 (CPT)) purity ~95%; 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt tablets (CAS 30931-67-0 (ABTS)); PBS; HBSS. Minimum essential medium with Eagle's salts (MEM), foetal bovine serum (FBS) and phenol-red-free Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI) were obtained from PAA Laboratories GmbH (Pasching, Austria). TrypLE Express, HuMEC ready medium kit, fluorescein (FL) and propidium iodide (PI) were obtained from Invitrogen (Eugene, OR). K₂S₂O₈ (CAS 7727-21-1) was obtained from Panreac Quimica S.A.U. (Barcelona, Spain). Culture plates were obtained from NUNC™ (Roskilde, Denmark). The PI/RNase Staining Buffer kit, FITC-conjugated Annexin V and Binding Buffer were obtained from BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA.). The comet assay kit was obtained from Trevigen, Inc. (Helgerman CT, Gaithersburg, MD).

2.2. Estimation of radical scavenging activity by the DPPH test

The antioxidant activity of squalene against the stable radical DPPH was measured as previously reported (Brand-Williams et al., 1995) with some modifications. Briefly, 100 μ M ethanolic solution of DPPH was mixed with different ethanolic solutions of squalene in 96-well plates at 0.06, 0.13, 0.25, 0.5 and 1 mol of antioxidant/ moles of DPPH. α -Tocopherol (TOC) was used as a standard antioxidant control and a sample without antioxidant was also measured as a blank control. The decrease in absorbance at 520 nm was determined immediately and every 5 min for 2 h in a microplate reader (TECAN, GENios Plus). Measurements were performed in triplicate.

The inhibition of the DPPH radical was calculated according to the following percentage of radical scavenging activity (% RSA) formula:

$$\% \text{ RSA} = [(A_{C(0)} - A_{A(t)})/A_{C(0)}] \times 100$$

where $A_{C(0)}$ is the absorbance of the control at $t = 0$ min and $A_{A(t)}$ is the absorbance of the antioxidant at $t = 50$ min.

2.3. ABTS radical scavenging assay

ABTS cation radical scavenging activity was determined using a previously reported procedure (Re et al., 1999). ABTS radicals (ABTS^{•+}) were obtained by ABTS/H₂O 0.5 mM reaction with K₂S₂O₈ for 16 h in the dark at room temperature. ABTS^{•+} was diluted in ultrapure water until absorbance at 734 nm was 0.7 (± 0.1). Squalene and Trolox™ (as antioxidant reference) were dissolved in ethanol to yield a 10 mM stock solution and diluted with ultrapure water to the assayed concentrations. Twenty microliters of each concentration of squalene, standard (Trolox™), blank (ultrapure water) or ethanol control (8%) were added to a 96-well plate. The reaction was initiated by the addition of 280 μ L of ABTS^{•+}. Absorbance readings were taken every 5 min at 30 °C for 2 h in a microplate reader (TECAN, GENios Plus). All determinations were carried out in triplicate.

The inhibition of ABTS^{•+} was calculated according to the percentage of radical scavenging activity (% RSA) described above (at $t = 30$ min).

2.4. ORAC assay

Squalene's peroxyl radical scavenging activity was measured by the ORAC_{FL} assay as previously described (Prior et al., 2003). A stock solution of squalene was reconstituted in DMSO and then diluted in PBS. A stock solution of Trolox™, as reference antioxidant control, was also diluted in DMSO and diluted in PBS. The assay was carried out in 96-well plates with a final volume of 160 μ L. Samples were run in triplicate. Fluorescein (48 nM) was mixed with various concentrations of squalene, standard (Trolox) or blank (PBS) containing at final volume 1% DMSO (v/v). Plates were incubated for 15 min at 37 °C. The assay was initiated by the addition of AAPH (100 mM), and fluorescence readings (Ex. λ_{485} /Em. λ_{520} nm) were taken every 5 min

at 37 °C for 160 min in a microplate reader (TECAN GENios Plus). Final results were calculated based on the difference in the area under the fluorescence decay curve (AUC) between the blank and each sample. The AUC formula was:

$$\text{AUC} = 1 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + f_3/f_0 + f_4/f_0 + \dots + f_{20}/f_0.$$

Results were expressed as micromolar Trolox™ equivalents (TE) calculated using the line equation from the standard curve:

$$\text{TE} = (Y - b)/m$$

where Y is the net AUC ($\text{AUC}_{\text{sample}} - \text{AUC}_{\text{control}}$), m is the slope and b is the Y -intercept.

2.5. Cell culture

Highly invasive MDA-MB-231 human breast cancer cells (oestrogen and progesterone receptor-negative), minimally invasive MCF7 human breast cancer cells (oestrogen and progesterone receptor-positive), and immortalized non-tumorigenic human breast epithelial cells (MCF10A), were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Breast tumour cells (MCF7 and MDA-MB-231) were grown as monolayer cultures in MEM supplemented with 10% FBS, 1% Hepes Buffer, 1% Sodium Pyruvate and 1% NEAA. Human mammary epithelial cells (MCF10A) were cultivated in HuMEC Ready Medium. All cell lines were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Cells were routinely subcultured using TrypLE Express solution (Invitrogen). Cells in the exponential growth phase were used for all experiments.

2.6. XTT cell proliferation assay

Cell proliferation, measured as the cellular growth of treated cells versus untreated controls, was carried out using an XTT-based assay according to Scudiero et al. (1988) with some modifications. Briefly, cells were seeded into 96-well culture plates. After overnight incubation to allow cell attachment, medium was removed and replaced with fresh medium containing squalene at a series of concentrations and plates were incubated for 24, 48 or 120 h followed by a 6 day proliferation period (incubation with fresh medium). At these three time points, plates were incubated with XTT in RPMI without Phenol-Red for 3 h and absorbance was measured at 450 nm wavelength (620 nm as reference) in a plate reader (TECAN GENios Plus). Viability was calculated using the formula:

$$\% \text{ viable cells} = [(A_{\text{treated cells}})/(A_{\text{control}})] \times 100$$

where A is the difference in absorbance between optical density units ($A = \text{OD}_{450} - \text{OD}_{620}$).

All measurements were performed in triplicate and each experiment was repeated at least three times.

2.7. Cell cycle assay

Cells were seeded in 12-well culture plates and treated with different doses of squalene for 24 h. After incubation, cells were fixed with cold 70% ethanol and stored at -20 °C for at least 24 h. Subsequent to propidium iodide labeling (PI/RNase Staining Buffer), cells were analyzed by flow cytometry (EPICS XL-MCL, Beckman Coulter, Spain). The FlowJo program (v5.7.2) was used to calculate the percentage of cells in G₀/G₁, S and G₂/M phases. Each experiment was repeated at least three independent times.

2.8. Analysis of apoptosis

The percentage of apoptotic cells was determined using a double staining assay with FITC-conjugated Annexin V and propidium iodide (PI). Briefly, after cell exposure to squalene for 24 h, cells were harvested, washed twice in cold PBS and resuspended in 100 μ L Annexin Binding Buffer. Cells were stained with 5 μ L Annexin V-FITC and 1 μ L PI solution, gently vortexed and incubated for 15 min at room temperature in the dark before flow cytometric analysis. As a positive control, cells were treated with 1 μ M camptothecin (CPT). Each experiment was repeated at least three independent times.

2.9. Detection of intracellular reactive oxygen species

Intracellular reactive oxygen species (ROS) levels were measured after 24 h of treatment with different doses of squalene, or TOC as a positive control, using the cell-permeable fluorescent probe, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), as previously described (Wang and Joseph, 1999) with some modifications. In brief, after incubation, cells were washed two times with Hank's buffered salt solution (HBSS) and incubated with fresh DCFH-DA (100 μ M) for 30 min at 37 °C in 5% CO₂. Cells were then washed twice and read in a plate reader for 30 min (Ex. λ_{485} /Em. λ_{535} , Gain 60). The intracellular ROS level percentage was calculated as follows:

$$F = [(F_{t30} - F_{t0})/F_{t0}] \times 100$$

where F_{t0} is the fluorescence at $t = 0$ min and F_{t30} the fluorescence at $t = 30$ min.

It has been reported that the addition of H_2O_2 increases oxidative stress in cultured cells (Lee et al., 2006). Therefore, in order to evaluate the protective capacity of squalene against induced oxidative stress, H_2O_2 at 500 μM was added 30 min before the fluorescence quantification.

All tests were run in triplicate for each experimental condition and each experiment was repeated at least three times. All experiments were conducted using iron-free mediums (MEM and HuMEC).

2.10. Alkaline single-cell gel electrophoresis (comet assay)

At 24 h, cells treated with squalene were scraped into 12-well culture plates, washed twice (300g 10 min, 4 °C) with cold 1X PBS (Ca^{2+}/Mg^{2+} free) and then resuspended in 1 ml of cold 1X PBS. In order to evaluate squalene's ability to protect against oxidative DNA damage, cell suspensions were exposed for 10 min to 50 μM H_2O_2 at 4 °C. After that, cells were washed twice and frozen in FBS-DMSO (90:10, v/v) at –80 °C until the comet assay procedure.

DNA single strand break by alkaline microgel electrophoresis was performed according to Singh et al. (1988) with some modifications. Cells were thawed in a bath at 37 °C, centrifuged (300g 10 min, 4 °C) in cold MEM with 25% FBS and resuspended in cold 1X PBS to a density of 1.65×10^5 cells/ml. Cells were then suspended in melted and cooled (at 40 °C) low melting point agarose (LMA). Cell suspensions (50 μL) were spread over a sample area of pre-warmed 1% normal melting point agarose (NMA) precoated CometSlide™ slides (Trevigen, Inc.). After 15 min at 4 °C in the dark, slides were immersed in cold Lysis Solution (Trevigen, Inc.) at 4 °C for 30 min to dissolve lipids and proteins. In order to separate the two DNA strands, slides were then immersed in fresh Alkaline Solution (pH > 13) for 30 min at room temperature in the dark. Electrophoresis was performed in a refrigerated black electrophoresis tank containing cold Alkaline Electrophoresis Solution (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13) at 25 V (1 V/cm) and 300 mA for 40 min. The slides were washed twice with distilled water for 10 min and neutralized with 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 for 5 min, followed by immersion in 70% ethanol for 5 min, and air-dried overnight at room temperature. Slides were stained with Sybr green before scoring.

2.11. Slide scoring and analysis

DNA strand breaks were examined in a fluorescence microscope (Zeiss Axiovert 200) equipped with Luca EMCCD camera (Andor Technology, Belfast, UK) under 494 nm excitation and 521 nm emission wavelength using the Komet 5.5 software package (Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK). Fifty cell images were randomly characterized per sample using 20 $\times$ magnification. Relative fluorescence between head and tail through the olive tail moment (Olive_TM) was used to determine DNA damage. Olive_TM is defined as the product of the Tail Moment Length and the fraction of DNA in the tail.

$$\text{Olive_TM} = [(\text{tail}(\text{mean}) - \text{head}(\text{mean})) \times \text{tail}(\% \text{ DNA})] / 100.$$

2.12. Statistical analysis

Results are presented as mean ($\pm$ SEM), except for cell proliferation results. For this assay, results are presented as mean ($\pm$ SD). Results are expressed as a percentage relative to the control, which was defined as 100%. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's LSD test. Values of $p < 0.05$ were considered significant. STATGRAPHICS Plus 5.1 statistical software (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, Virginia, USA) was used for the statistical analysis.

3. Results

3.1. Antioxidant activity

Radical scavenging capacity was determined using DPPH, ABTS and ORAC assays.

The antiradical activity of squalene, as measured by scavenging activity in the DPPH radical assay (Fig. 1A) or in the ABTS cationic radical assay (Fig. 2A), indicates that squalene at up to 10 mol ratio [mole antioxidant/mole DPPH] does not possess antiradical activity, nor does it possess such activity at up to 800 μM . TOC

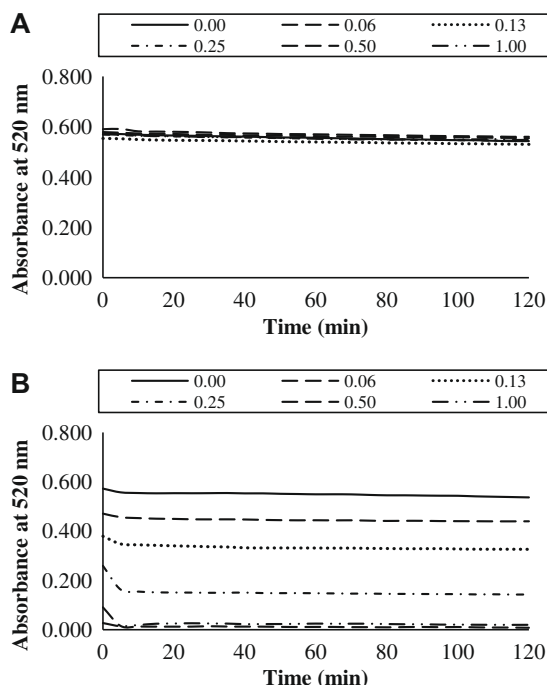


Fig. 1. Radical scavenging activity was measured by the reduction of the DPPH radical (100 μM) by ethanolic solutions of squalene (A) or α -tocopherol (TOC) (B) for a period of 120 min. The mole ratios [mole antioxidant/mole DPPH] assayed were between 0.06 and 1. The relative radical scavenging activity (RSA) of squalene at 50 min was $\leq 5\%$ even at higher ratios (2.50, 5.00 and 10.00) (data not shown) while the RSA of Trolox™ was 50% at 0.16 mol ratio.

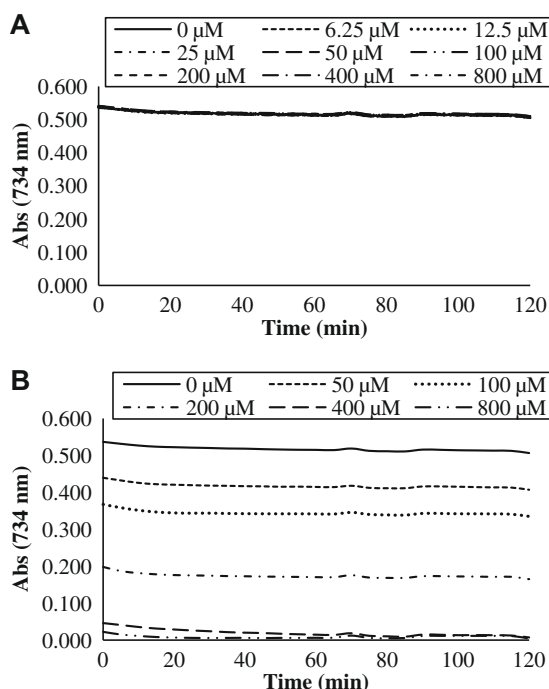


Fig. 2. ABTS radical cation ($ABTS^{\bullet+}$) antioxidant activity of ethanolic solutions of squalene (A) or Trolox™ (B) up to 800 μM were measured by decolorization of $ABTS^{\bullet+}$ for 120 min. Relative radical scavenging activity (RSA) for all assayed concentrations of squalene at 30 min was $<4\%$ while the RSA of Trolox™ reached 50% at 143.57 μM .

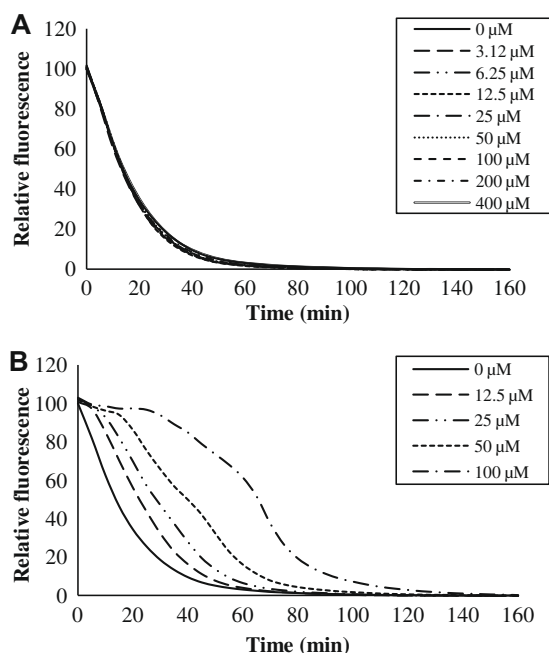


Fig. 3. Peroxyl antiradical activity was performed by the ORACFL assay on a range of concentrations of squalene from 3.12 to 400 µM (A) or Trolox™ from 12.5 to 100 µM (B) for 160 min. Results show how squalene failed to reduce the AAPH-induced peroxyl radical at all assayed concentrations compared with Trolox™. TE for any one of the squalene concentrations assayed was close to zero, indicating the absence of peroxyl scavenging activity (data not shown).

and Trolox were used as antioxidant standard controls for the DPPH (Fig. 1B) and ABTS (Fig. 2B) assays, respectively.

Squalene's peroxyl radical scavenging activity, measured by the ORAC_{FL} assay, shows the absence of a protective effect against AAPH-induced peroxyl radical activity (Fig. 3A), as compared with Trolox's antiradical activity (Fig. 3B).

3.2. Effect of squalene on cell proliferation

To observe the effect of squalene on both human breast cancer cell lines (MCF7 and MDA-MB-231) and on the immortalized non-tumorigenic human mammary epithelial cell line (MCF10A), cells were treated with various concentrations of squalene ranging from 3.12 to 50 µM for 24, 48 and 120 h. Squalene had no significant effect on the cell proliferation rates of both MCF7 and MCF10A cells (Fig. 4A and C). Unexpectedly, a slight increase in MDA-MB-231 cell proliferation was observed, although it was not statistically significant (Fig. 4B).

3.3. Effect of squalene on the cell cycle

A flow cytometry assay after PI staining allows cell cycle analysis. MCF7, MDA-MB-231 and MCF10A cells were treated with 12.5, 50 and 200 µM squalene to evaluate interference with the cell cycle. The results revealed that after 24 h of squalene treatment, no significant effect was observed on the cell cycle in any one of the three cell lines tested (data not shown).

3.4. Effect of squalene on apoptosis

The extent of apoptosis was assessed by flow cytometry analysis following 24 h exposure of cells to different doses of squalene

(12.5, 50 and 200 µM). Apoptosis was detected using Annexin-V-FITC (AV) and PI labeling. The percentage of apoptotic cells was calculated from the ratio of the sum of early plus late apoptotic cells to all cells (apoptotic and whole cells). Flow cytometric analysis revealed that treatment with squalene for 24 h did not induce apoptosis in human breast epithelial cells (MCF10A), nor did it induce apoptosis in human breast cancer cells (MCF7, MDA-MB-231), when compared with controls (data not shown).

3.5. Effect of squalene on intracellular ROS production

Measurement of intracellular ROS levels using the DCFH-DA probe showed a significant and dose-dependent decrease in ROS levels in MCF10A cells after 24 h treatment with increasing concentrations of squalene from 3.12 to 50 µM. At the highest concentration (50 µM), squalene reduced ROS production by more

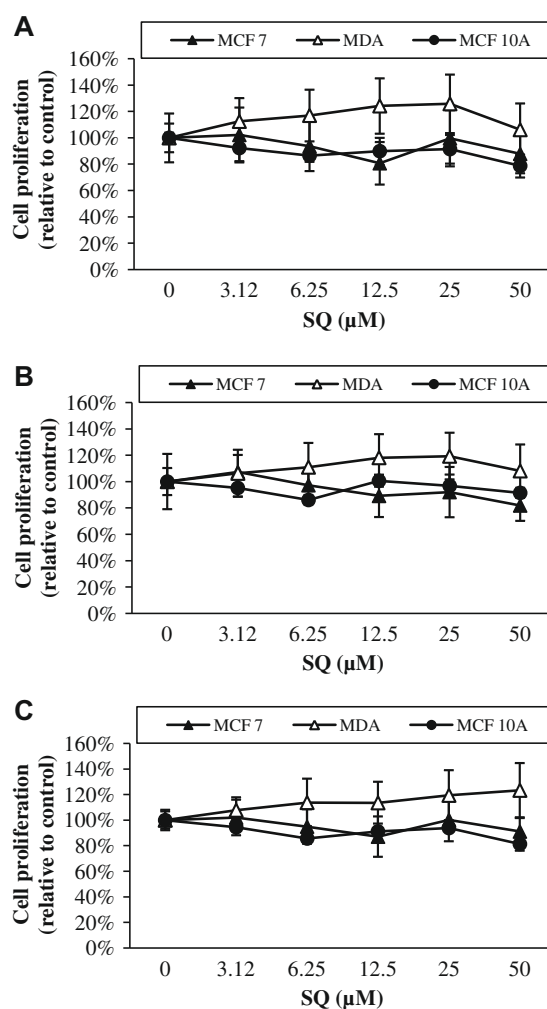


Fig. 4. *In vitro* cell proliferation of MCF7, MDAMB-231 and MCF10A cell lines after squalene (SQ) treatment was determined by colorimetric XTT-based assay at 24 h (A), 48 h (B) and 120 h (C). Although MDA-MB-231 showed a slight increase in cell proliferation, no difference at $p < 0.05$ was detected in any cell line. Higher concentrations of squalene up to 400 µM showed similar effects (data not shown). Values represent the mean $\pm$ SD of three independent experiments and are expressed as a percentage of the control, which was defined as 100%.

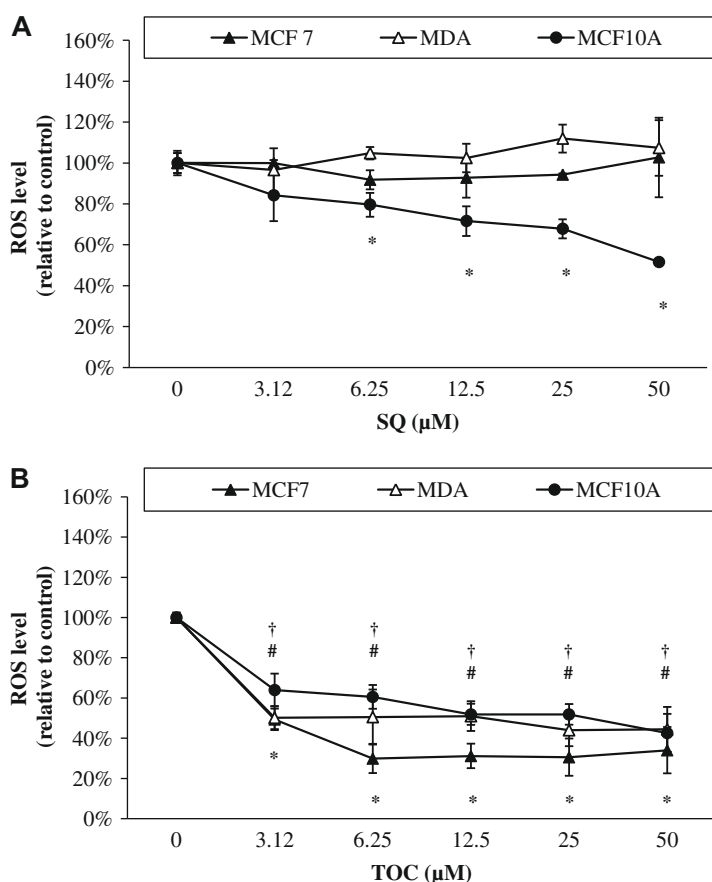


Fig. 5. Intracellular ROS levels were measured by DCFH-DA probe in MCF7, MDA-MB-231 and MCF10A cell lines after treatment with squalene (SQ) (A) or α -tocopherol (TOC) (B) for 24 h. Squalene significantly decreased intracellular ROS levels, in a dose-dependent manner, in MCF10A cells but not in MCF7 and MDA-MB-231 cells. TOC significantly decreased the intracellular ROS level in a dose-dependent manner in both breast cancer and mammary epithelial cell lines. Results are displayed as mean $\pm$ SEM for three independent experiments. Significant differences were determined relative to the control, which was considered to be 100%, at $p < 0.05$ († MCF7, # MDA-MB-231, * MCF10A) using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's LSD test.

than 50% compared with the untreated control. Interestingly, squalene did not change intracellular ROS levels for either of the human breast cancer cell lines tested (MCF7, MDA-MB-231) (Fig. 5A).

TOC, used as an antioxidant reference compound, exhibited a significant decrease in ROS levels, with a greater than 50% reduction compared with untreated cells in each of the cell lines assayed (MCF10A, MCF7 and MDA-MB-231) (Fig. 5B).

To induce intracellular oxidative stress, H_2O_2 was added before fluorescence measurement. H_2O_2 induces oxidative injury on MCF7, MDA-MB-231 and MCF-10A cells *in vitro* (data not shown). In order to investigate the *in vitro* preventive effect of squalene against H_2O_2 oxidative injury, intracellular ROS levels were measured in cells previously treated with squalene for 24 h at increasing concentrations from 3.12 to 50 μ M. Interestingly, whereas squalene did not prevent oxidative stress injury in MCF7 and MDA-MB-231 breast tumour cells, MCF10A epithelial cells showed a significant decrease (up to 60% reduction) in intracellular ROS levels, in a dose-dependent manner (Fig. 6A). In contrast, at even the lowest concentration (3.12 μ M), TOC was able to reduce oxidative injury in both the tumour cells and the epithelial cells (Fig. 6B). However, squalene was more effective at reducing oxidative injury to MCF10A epithelial cells than TOC.

3.6. Preventive effect of squalene against oxidative DNA damage

We measured the preventive effect of squalene against H_2O_2 -induced DNA damage in MCF10A, MCF7 and MDA-MB-231 cells using alkaline single-cell gel electrophoresis (comet assay). Squalene's potential to reduce oxidative DNA damage was expressed as Olive_{TM}. Olive_{TM} incorporates a measure of both the smallest detectable size of migrating DNA (reflected in the comet tail length) and the number of relaxed/broken pieces (represented by the intensity of DNA in the tail) (Singh et al., 1988).

Pre-incubation of MCF10A cells with increasing concentrations of squalene for 24 h exerted a significant, dose-dependent preventive effect against H_2O_2 -induced DNA damage ($p < 0.001$) (Fig. 7A). However, squalene did not show any preventive effect against the formation of single-strand breaks in MCF7 and MDA-MB-231 tumour cells. An increase in oxidative DNA damage was observed in the MDA-MB-231 cell line, but this increase was not statistically significant ($p = 0.23$) (Fig. 7B).

4. Discussion

Case control studies have shown an inverse correlation between olive oil consumption and the incidence of breast cancer (Escrib

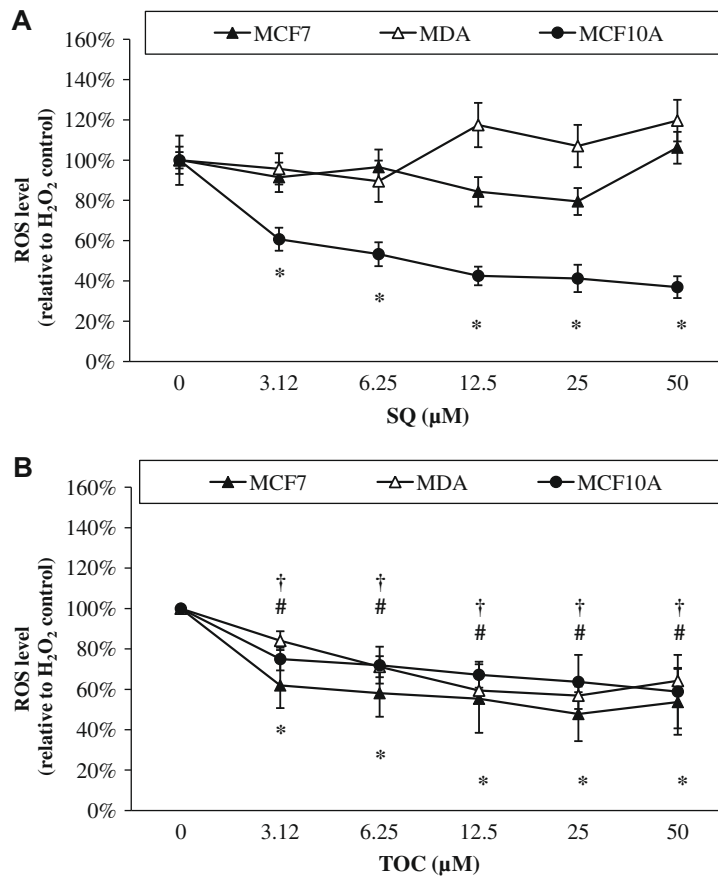


Fig. 6. The capacity of squalene (SQ) (A) or α -tocopherol (TOC), as antioxidant control (B), to reduce an oxidative burst induced by the addition of H₂O₂ (500 μ M) on MCF7, MDA-MB-231 or MCF10A cell lines was measured by DCFH-DA probe. Squalene prevented the oxidative injury induced in MCF10A cells, in a dose-dependent manner, but this preventive effect was not observed in MCF7 and MDA-MB-231 cells. Interestingly, TOC significantly reduced oxidative injury in all three cell lines, even at the lowest concentration (3.12 μ M). Results are expressed as mean $\pm$ SEM for three independent assays. Significant differences were determined relative to the positive control (treated with H₂O₂), which was defined as 100%, at $p < 0.05$ († MCF7, # MDA-MB-231, * MCF10A) using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's LSD test.

et al., 2006; Owen et al., 2000a). It has been suggested that the lower risk of breast cancer associated with olive oil consumption may be due to squalene (Newmark, 1997), a minor compound present in virgin olive oil in quantities as high as 13,000 mg/kg (Allouche et al., 2007). The average daily dietary intake of squalene in Mediterranean countries is in the range of 200–400 mg/day (Sotirioudis and Kyrtopoulos, 2008).

Experiments in rodents suggest that squalene exhibits antitumour activity against skin, colon, sarcoma and lung cancer (Murakoshi et al., 1992; Ohkuma et al., 1983; Rao et al., 1998; Smith et al., 1998). It has also been shown that squalene inhibits the *in vitro* growth of neuroblastoma cells (Das et al., 2003). The mechanism proposed to explain the activity of squalene is based on its strong inhibitory action on beta-hydroxy-beta-methylglutaryl-CoA reductase catalytic activity *in vivo*. This activity affects Ras p21 farnesylation, signal transduction and cellular proliferation (Newmark, 1997). Nevertheless, very little is known about the effect of squalene on human breast tumourigenesis.

Our data suggest that squalene treatment did not exert any significant influence on MCF10A, MCF7 and MDA-MB-231 cell proliferation. (We did observe a slight increase in MDA-MB-231 cell proliferation, but the increase was not statistically significant.) Das et al. (2008) have hypothesized that squalene might support

the growth of a small fraction of tumour stem cell-like cells having a very high tumourigenic capacity after cisplatin treatment. In addition, it has been reported that at low-doses, certain antioxidants can stimulate the growth of some types of cancer. For example, vitamin C was found to stimulate the growth of both human parotid carcinoma cells and human leukemic cells *in vitro* (Prasad et al., 2001), and vitamin E was found to enhance the growth of various prostate cancer cell lines (Bureyko et al., 2009). Beta-carotene, an antioxidant structurally similar to squalene, increased the incidence of lung cancer among male heavy cigarette smokers (Paolini et al., 2003). Future work is needed to clarify the mechanisms of stimulation of cancer cell growth by some antioxidants.

In the present study, the effect of squalene on the cell cycle profile and cell apoptosis was also studied. Incubation of MCF10A, MCF7 and MDA-MB-231 cells for 24 h with squalene did not alter the cell cycle parameters, nor did it induce cell apoptosis. Overall, these results suggest that squalene does not induce breast tumour cell death and may be ineffective once a breast tumour is established.

Squalene has long been considered to be an antioxidant exerting anticarcinogenic activity by enhancing cellular antioxidant status (Hashim et al., 2005; Murakoshi et al., 1992; Smith, 2000). However, very little is known about its scavenging capacity. Our

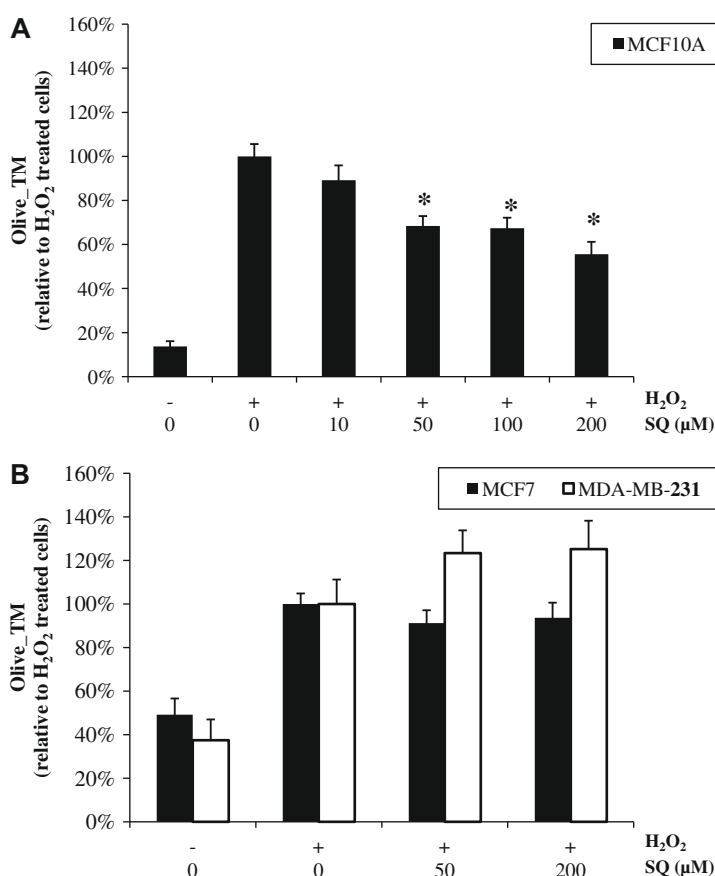


Fig. 7. A comet assay was performed in order to determine the preventive effect of squalene (SQ) in DNA oxidative damage in the MCF10 cell line (A) or MCF7 and MDA-MB-231 cell lines (B). Squalene reduces single-strand breaks, in a dose-dependent manner, in MCF10A cells, but not in MCF7 and MDA-MB-231 cells. Olive_{TM} values are represented by mean $\pm$ SEM for three independent assays. Significant differences were determined relative to the positive control (treated only with H₂O₂), which was defined as 100%, at $p < 0.05$ using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's LSD test.

results showed that squalene did not exert antioxidant activity against DPPH stable radicals, ABTS cation radicals or APBH-induced peroxy radicals, even at high concentration (10.00 mol ratio, 800 μ M and 400 μ M, respectively) (Figs. 1–3). Concomitantly, it has also been reported that squalene reacts very poorly with DPPH (EC₅₀ at 980 mol ratio) (Psomiadou and Tsimidou, 1999), and has a very low ORAC value (0.00062), suggesting that squalene's antioxidant activity is extremely low (Tikekar et al., 2008). Squalene's lack of ABTS scavenging capacity has not been described previously. In contrast, Kohno et al. (1995) reported squalene to be a singlet oxygen quencher capable of protecting the skin from UV radiation. The plasma membrane is permeable to squalene, enabling squalene to move inside the lipid bilayer and act as a quencher barrier for singlet oxygen, consequently preventing intracellular oxidative damage. Differential squalene permeability between tumour and non-tumour mammary cells could provide a possible explanation for these contrasting results, but the evidence at this point is inconclusive.

Squalene has been found to exert protective activity against several cancers associated with specific carcinogens, including azoxymethane-induced colon cancer (Rao et al., 1998) and nicotine-derived nitrosaminoketone-induced lung carcinogenesis (Smith et al., 1998). In the present study, the DCFH-DA assay indicated that squalene has differential antioxidant activity in human

breast cells, since it significantly decreased, in a dose-dependent manner, intracellular ROS levels in MCF10A cells (57.71% at 50 μ M) but not in MCF7 or MDA-MB-231 cells (104.87% and 99.92% at 50 μ M, respectively). This selective effect of squalene was also described by Das et al. (2008), although in other cell types. These authors found that squalene decreased ROS levels in bone marrow cells but not in neuroblastoma cells (SK-N-BE tumour cell line). In contrast, the well-known antioxidant TOC, used as the reference in the present study, did not show this selective effect; it reduced the oxidative stress by 58.84%, 53.78% and 64.20% at 50 μ M in MCF10A, MCF7 and MDA-MB-231 cells, respectively.

Consequently, our results suggest that breast cancer cells and breast epithelial cells have the same response to TOC treatment, but that squalene acts as an antioxidant only on mammary epithelial cells. Taking into account that the mechanism of such selective antioxidant sensitivity is unknown, we may consider the following possibilities: (i) it is possible that squalene selectively increases glutathione (GSH) level in normal cells but not in breast cancer cells, a phenomenon described as the "GSH paradox" (Das et al., 2003); (ii) the selective sensitivity might be related to differences in cellular uptake and accumulation of squalene, or the status of the mevalonate pathway (Das et al., 2008); (iii) the selective sensitivity might be related to the differential regulation of antioxidant systems in normal *versus* tumour cells (Klaunig and Kamendulis,

2004). Tumour cells may be in an environment of continuous oxidative stress, in which antioxidants may act as pro-oxidants. In fact, in the present study we found that breast cancer cells have higher intracellular ROS levels than non-tumourigenic mammary epithelial cells (data not shown). Further studies should be done to address these topics.

Oxidative stress may result in an increase in oxidative damage and can be caused either by an overproduction of free radicals and ROS or by an impairment of the endogenous antioxidant system. It is known that a chronic increase in ROS and oxidant stress may induce cancer (Ambrosone, 2000). Reactive oxygen species can damage cellular macromolecules, including DNA, and this damage is directly responsible for carcinogenesis. Thus, it has been shown that neoplastic transformation is associated with an increase in the basal oxidant level. In fact, serum markers for oxidative DNA damage have been shown to increase in women diagnosed with breast cancer (Musarrat et al., 1996). Considering that oxidative stress is involved in the pathophysiology of all cancers (Visioli et al., 2004), the prevention of oxidative stress on mammary cells could be a suitable way to prevent breast cancer development.

In the present work, we found that H₂O₂-induced oxidative injury increases ROS levels in both human mammary epithelial cells and breast cancer cells as measured by the DCFH-DA assay (data not shown). Interestingly, squalene was able to prevent, in a dose-dependent manner, induced oxidative injury in human breast epithelial cells but not in human breast cancer cells. It has been postulated that neoplastic transformation is associated with an increase in the basal level of oxidant stress; therefore, it may be presumed that squalene might help to prevent human breast cancer by reducing oxidative stress on mammary epithelial cells.

The comet assay provides information about DNA damage through quantification of single-strand breaks. We used this technique to determine the protective effect of squalene against DNA damage induced by H₂O₂ oxidative injury. As observed in the DCFH-DA assay, squalene exhibited selective activity according to the cell line. It reduced oxidative DNA damage in a dose-dependent manner in MCF10A mammary epithelial cells, but failed to reduce oxidative injury in MCF7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. In the latter, injury was even slightly increased after squalene treatment.

Therefore, these results suggest that squalene might be helpful in human breast cancer prevention, but not treatment, based on two hypotheses: (i) it reduces oxidative stress by decreasing ROS levels in mammary epithelial cells, and (ii) it selectively protects against oxidative DNA damage in mammary epithelial cells. In addition, these findings could support the hypothesis that high squalene intake could contribute to the lower incidence of breast cancer in Mediterranean populations. It is important to note that adipose tissue contains exceptionally high concentrations of squalene relative to other tissues (Tilvis et al., 1982). Considering that mammary glands include much adipose tissue, it may be presumed that squalene levels could also be high in breast tissues.

In summary, we found that mammary epithelial cells and breast tumour cells differed in their responses to squalene treatment. Our results indicated that squalene reduces *in vitro* ROS levels and protects against oxidative DNA damage in human mammary epithelial cells but not in breast tumour cells. Therefore, squalene, present at high concentrations in virgin olive oil, might contribute to the preventive effect of olive oil against human breast cancer by inhibiting oxidative stress. Moreover, our *in vitro* results suggest that squalene may play a role in the prevention of human breast cancer, but is probably ineffective once breast tumours are established. Nevertheless, extreme caution should be applied in the extrapolation of *in vitro* results to potential human effects. Further studies are needed to confirm both the *in vivo* protective capacity of squalene

and the differential mechanism of action on normal *versus* breast cancer cells suggested by the present study.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This study was supported by the “Ministerio de Ciencia e Innovación” (RTA2008-00066-C03-03); “Instituto Andaluz de Biotecnología” (BIOÁNDALUS 08/22/L5.3); and; “Centro de Excelencia en Investigación sobre Aceite de Oliva y Salud” (CEAS).

References

- Allouche, Y., Jiménez, A., Gaforio, J.J., Uceda, M., Beltrán, G., 2007. How heating affects extra virgin olive oil quality indexes and chemical composition. *J. Agric. Food Chem.* 55, 9646–9654.
- Ambrosone, C.B., 2000. Oxidants and antioxidants in breast cancer. *Antioxid. Redox Signal.* 2, 903–917.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 28, 25–30.
- Bureyko, T., Hurdle, H., Metcalfe, J.B., Clandinin, M.T., Mazurak, V.C., 2009. Reduced growth and integrin expression of prostate cells cultured with lycopene, vitamin E and fish oil *in vitro*. *Br. J. Nutr.* 101, 990–997.
- Cert, A., Moreda, W., Pérez-Camino, M.C., 2000. Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils. *J. Chromatogr. A* 881, 131–148.
- Das, B., Yeger, H., Baruchel, H., Freedman, M.H., Koren, G., Baruchel, S., 2003. *In vitro* cytoprotective activity of squalene on a bone marrow versus neuroblastoma model of cisplatin-induced toxicity: implications in cancer chemotherapy. *Eur. J. Cancer* 39, 2556–2565.
- Das, B., Antoon, R., Tsuchida, R., Lofti, S., Morozova, O., Farhat, W., Malkin, D., Koren, G., Yeger, H., Baruchel, S., 2008. Squalene selectively protects mouse bone marrow progenitors against cisplatin and carboplatin-induced cytotoxicity *in vivo* without protecting tumor growth. *Neoplasia* 10, 1105–1119.
- Escrib, E., Ramírez-Tortosa, M.C., Sánchez-Rovira, P., Colomer, R., Solanas, M., Gaforio, J.J., 2006. Olive oil in cancer prevention and progression. *Nutr. Rev.* 64, S40–S52.
- Hashim, Y.Z.H., Gill, C.I.R., McGlynn, H., Rowland, I.R., 2005. Components of olive oil and chemoprevention of colorectal cancer. *Nutr. Rev.* 63, 374–386.
- Katdare, M., Singhal, H., Newmark, H., Osborne, M.P., Telang, N.T., 1997. Prevention of mammary preneoplastic transformation by naturally-occurring tumor inhibitors. *Cancer Lett.* 111, 141–147.
- Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M., 2004. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44, 239–267.
- Kohno, Y., Egawa, Y., Itoh, S., Nagaoka, S., Takahashi, M., Mukai, K., 1995. Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in n-butanol. *Biochim. Biophys. Acta* 28, 52–56.
- Lee, D.H., Lim, B.S., Lee, Y.K., Yang, H.C., 2006. Effects of hydrogen peroxide (H₂O₂) on alkaline phosphatase activity and matrix mineralization of odontoblast and osteoblast cell lines. *Cell Biol. Toxicol.* 22, 39–46.
- Murakoshi, M., Nishino, H., Tokuda, H., Iwashima, A., Okuzumi, J., Kitano, H., Iwasaki, R., 1992. Inhibition by squalene of the tumor-promoting activity of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in mouse-skin carcinogenesis. *Int. J. Cancer* 52, 950–952.
- Musarrat, J., Azzolina-Wilson, J., Wani, A.A., 1996. Prognostic and etiological relevance of 8-hydroxyguanosine in human breast carcinogenesis. *Eur. J. Cancer* 32, 1209–1214.
- Newmark, H.L., 1997. Squalene, olive oil, and cancer risk: a review and hypothesis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 6, 1101–1103.
- Ohkuma, T., Otogiri, K., Tanaka, S., Ikekawa, T., 1983. Intensification of host's immunity by squalene in sarcoma 180 bearing ICR mice. *J. Pharmacobiodyn.* 6, 148–151.
- Owen, R.W., Giacosa, A., Hull, W.E., Haubner, R., Würtele, G., Spiegelhalter, B., Bartsch, H., 2000a. Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncol.* 1, 107–112.
- Owen, R.W., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W.E., Spiegelhalter, B., Bartsch, H., 2000b. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem. Toxicol.* 38, 647–659.
- Paolini, M., Abdel-Rahman, S.Z., Sapone, A., Pedullì, G.F., Perocco, P., Cantelli-Forti, G., Legator, M.S., 2003. Beta-carotene: a cancer chemopreventive agent or a co-carcinogen? *Mutat. Res.* 543, 195–200.
- Pérez-Jiménez, F., Álvarez de Cienfuegos, G., Badimon, L., et al., 2005. In: International Conference on the Healthy Effect of Virgin Olive Oil. Consensus Report. Jaén 2004. *Eur. J. Clin. Invest.* 35, 421–424.
- Prasad, K.N., Cole, W.C., Kumar, B., Prasad, C., 2001. Scientific rationale for using high-dose multiple micronutrients as an adjunct to standard and experimental cancer therapies. *J. Am. Coll. Nutr.* 20, 450S–463S.

- Prior, R.L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., Jacob, R., 2003. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL)) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.* 51, 3273–3279.
- Psomiadou, E., Tsimidou, M., 1999. On the role of squalene in olive oil stability. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4025–4032.
- Rao, C.V., Newmark, H.L., Reddy, B.S., 1998. Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. *Carcinogenesis* 19, 287–290.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231–1237.
- Saint-Leger, D., Bague, A., Lefebvre, E., Cohen, E., Chivot, M., 1986. A possible role for squalene in the pathogenesis of acne. II. In vivo study of squalene oxides in skin surface and intra-comedonal lipids of acne patients. *Br. J. Dermatol.* 114, 543–552.
- Scudiero, D.A., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T.H., Currens, M.J., Seniff, D., Boyd, M.R., 1988. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 48, 4827–4833.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191.
- Smith, T.J., 2000. Squalene: potential chemopreventive agent. *Expert Opin. Investig. Drugs* 9, 1841–1848.
- Smith, T.J., Yang, G.Y., Seril, D.N., Liao, J., Kim, S., 1998. Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis by dietary olive oil and squalene. *Carcinogenesis* 19, 703–706.
- Sotiroidis, T.G., Kyrtopoulos, S.A., 2008. Anticarcinogenic compounds of olive oil and related biomarkers. *Eur. J. Nutr.* 47, 69–72.
- Tikekar, R.V., Ludescher, R.D., Karwe, M.V., 2008. Processing stability of squalene in amaranth and antioxidant potential of amaranth extract. *J. Agric. Food Chem.* 56, 10675–10678.
- Tilvis, R., Kovanen, P.T., Miettinen, T.A., 1982. Metabolism of squalene in human fat cells. Demonstration of a two-pool system. *J. Biol. Chem.* 10, 10300–10305.
- Visioli, F., Grande, S., Bogani, P., Galli, C., 2004. The role of antioxidants in the Mediterranean diets: focus on cancer. *Eur. J. Cancer Prev.* 13, 337–343.
- Wang, H., Joseph, J., 1999. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 612–616.

**Rank in Category: FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY****Journal Ranking** ⓘ

For **2010**, the journal **FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY** has an Impact Factor of **2.602**.

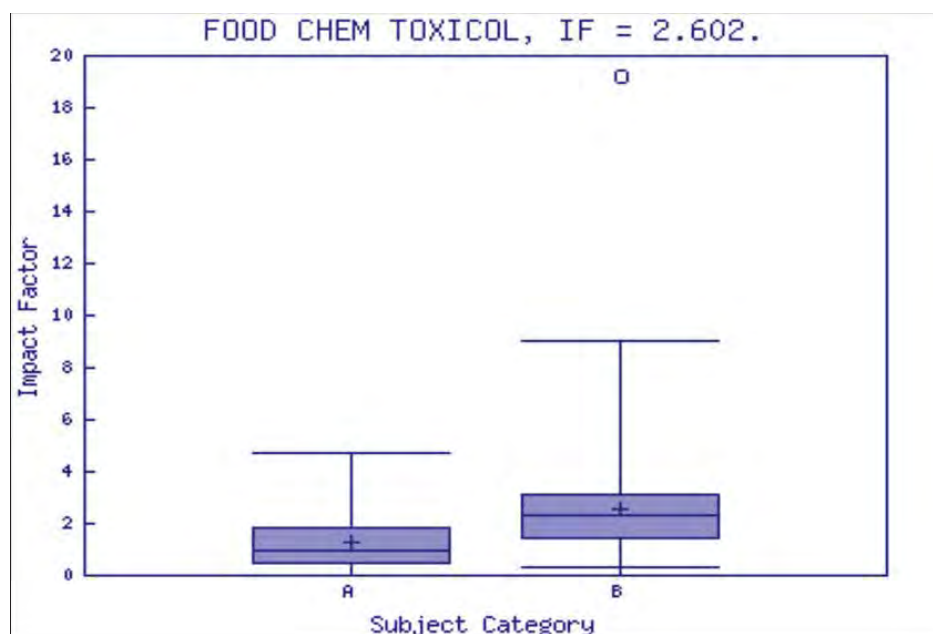
This table shows the ranking of this journal in its subject categories based on Impact Factor.

Category Name	Total Journals in Category	Journal Rank in Category	Quartile in Category
FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY	128	16	Q1
TOXICOLOGY	83	32	Q2

Category Box Plot ⓘ

For **2010**, the journal **FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY** has an Impact Factor of **2.602**.

This is a box plot of the subject category or categories to which the journal has been assigned. It provides information about the distribution of journals based on Impact Factor values. It shows median, 25th and 75th percentiles, and the extreme values of the distribution.



Las células tumorales circulantes (CTCs) son células que se han desprendido del tumor primario y circulan por el torrente sanguíneo.

La existencia de estas células se conoce desde 1869, cuando fueron detectadas por primera vez en un paciente con cáncer de próstata metastásico, y a principios del s. XXI se demostró su carácter maligno y que tienen capacidad metastásica.

Actualmente se está evaluando el valor pronóstico que tiene la detección de las CTCs en sangre periférica de pacientes con cáncer, y si sería recomendable utilizarla como un marcador pronóstico independiente de la enfermedad.

En esta tesis presento el desarrollo de una metodología que inicialmente solo permitió el aislamiento y cuantificación de las CTCs en sangre periférica de pacientes con tumores sólidos epiteliales, y que posteriormente fue modificada y permitió analizar estas células tumorales tanto genética como fenotípicamente.

Además expongo el valor pronóstico que tiene la detección de CTCs en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama, tanto sobre el tiempo libre de enfermedad como en la supervivencia, y cómo la detección de estas células tumorales señala a una población de pacientes con un mal pronóstico de la enfermedad en los que se incluyen pacientes cuyo tumor primario es ER+. También incluyo los resultados preliminares de un estudio realizado en pacientes con cáncer de colon no metastásico donde, aunque parece que este marcador no tiene un valor predictivo, el hecho de emplear una técnica tan versátil como la desarrollada en 2008 me ha permitido comprobar que las CTCs aportan una información diferente y complementaria a la que ofrece el estudio anatomopatológico del tumor primario.