ACTAS UROLÓGICAS ESPAÑOLAS

www.elsevier.es/actasuro

Editorial

Células tumorales circulantes: aislamiento, cuantificación y relevancia de su traslación a la práctica asistencial

Circulating tumor cells: Isolation, quantification, and relevance of their translation into clinical practice

El evento de aparición de enfermedad metastática en los tumores sólidos es el responsable del 90% de las muertes relacionadas con los cánceres. El cuerpo de conocimiento actual respecto al proceso de diseminación hematogena tumoral sugiere que los clones de células cancerosas que atraviesan el endotelio circulan por el torrente circulatorio hasta que, o son eliminadas por los mecanismos de respuesta inmune, o encuentran un microambiente apropiado en el que residir en un estado latente y eventualmente adquirir la capacidad para proliferar en un momento posterior. Por tanto, implícito al concepto de metástasis se integra el proceso de generación de células tumorales circulantes (CTC) que atraviesan la circulación y colonizan los órganos distantes. Esta capacidad de metástasis de los tumores sólidos a un sitio distante ha llevado a los investigadores a proponer que estos tienen fases “leucémicas”, similares a las que se conocen en los linfomas¹.

Sin embargo, la presencia de metástasis ocultas no puede afirmarse únicamente por el hecho de encontrar CTC. Por el contrario, estas deben superar varias fases antes de estar capacitadas para la formación de colonias metastásicas; a saber: deberán primero extravasarse de la circulación a los órganos diana y, posteriormente, al tiempo que proliferan, evadir la respuesta inmunológica tisular y superar las dificultades metabólicas. De hecho, se estima que sólo una de cada 10.000 CTC está capacitada para formar una metástasis.

Las células tumorales diseminadas (DTC) reflejan el verdadero potencial metastático de los tumores y se correlacionan con el pronóstico, pero para su detección se precisa de procedimientos diagnósticos invasivos (biopsias, punciones o aspiraciones, etc.), lo que dificultaría la utilidad clínica que tienen las CTC, ya que se encuentran fácilmente disponibles en sangre periférica². Esta realidad objetiva es aplicable a los tumores de localización en órganos genitourinarios.

La detección de las CTC puede demostrar no sólo la agresividad del cáncer originario con capacidad de lanzar células tumorales a la sangre periférica y la consiguiente potenciali-

dad de desarrollar las metástasis, sino también su presencia *per se* y su facultad hipotética de iniciar la diseminación de una generación de CTC diferente desde las nuevas localizaciones metastáticas.

Las CTC dependientes de los clones del tumor primario pueden ser detectadas incluso antes que el tumor donde se originan e incluso se identifican, y a menudo persisten, después de que el tumor se ha extirpado. Por tanto, la determinación de CTC ayudaría extraordinariamente a estudiar aspectos fundamentales de la Oncología, tanto en lo referente al diagnóstico como a la estadificación y al pronóstico. Mas aún, abre nuevas expectativas en la evaluación de la respuesta de los cánceres ante las diferentes terapias —quirúrgicas, farmacológicas o radioterápicas— de forma individual, rápida y precisa, así como en su posterior modulación terapéutica si fuera necesario^{3,4}. En este contexto, evidentemente, la determinación de las CTC tienen un valor superior a los marcadores tumorales conocidos, que salvo en determinados casos, presentan una utilidad limitada, tanto en la detección del tejido canceroso como en su evolución al tratamiento, ya que la presencia de estas proteínas o antígenos es habitual también en pacientes sanos, y resulta complicado fijar el umbral de detección del cáncer. La heterogeneidad de los tumores precisaría de la utilización de diferentes marcadores para mejorar su sensibilidad y especificidad.

La determinación de CTC en los laboratorios clínicos es un anhelo insatisfecho durante muchísimo tiempo. La complejidad en su detección se debe a su escasa presencia en el torrente sanguíneo. Así, en comparación con el número de elementos formes de la sangre periférica, la concentración del CTC es extremadamente baja, de alrededor de una por 10^6 - 10^7 leucocitos, lo cual obligaría a analizar muestras entre 1.000 y 10.000 veces mayores que las extraídas habitualmente para un análisis de sangre. Por tanto, las CTC son eventos raros que sólo se han podido detectar específicamente mediante una combinación de marcadores intracelulares y de superficie en laboratorios de investigación. Afortunada-

mente, en la última década diferentes avances tecnológicos han hecho posible la optimización y la detección fiable de las CCT, y se prevé que vayan ganando relevancia clínica en breve.

Los métodos para la detección de CTC utilizan la citometría o el análisis del ácido nucleico. En ambas circunstancias es necesario para su aislamiento y optimización para incrementar su expresividad mediante análisis densitométricos, inmunomarcadores y/o reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa (RT-PCR). Los avances tecnológicos actuales han permitido desarrollar diferentes métodos para la determinación de CTC en los laboratorios clínicos, ya sean morfológicos (ISET [*Isolation by Size of Epithelial Tumor cells*], basados en gradiente de densidades; Oncoquick), o inmunomagnéticos (MACS® [*Magnetic Activated Cell Sorting system*], AdnaTest®, RARETM® [*RosetteSep-Applied imaging Rare Event*], FAST® [*Fiber-optic Array Scanning Technology*], LSC® [*Laser Scanning Cytometer*], CellSearch®). Además se dispone de microscopios automatizados que permiten una exploración más rápida (ACIS® [*Automated Cellular Imaging System*], CellSpotter y ARIOL®)⁵.

Los métodos de detección de CTC basados en el ADN libre circulante, RT-PCR, o mejor RT-PCR cuantitativa, muestran una mayor sensibilidad que los basados en la citometría, pero existe incertidumbre acerca de la vida media de células y ácidos nucleicos en la sangre periférica, lo que significa que la presencia de ADN libre circulante muestra la presencia de los ácidos nucleicos totales, y no sólo de las células tumorales. Si bien esto podría ser obviado por la determinación de ARN libre, que desaparece rápidamente de la sangre después de la muerte de la célula, la especificidad sigue siendo baja, lo que no ha permitido su utilización en la práctica clínica.

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

Los tumores epiteliales agrupan aproximadamente el 80% de todos los cánceres. Las CTC proceden de epitelio y no están presentes en la sangre periférica de los individuos sin enfermedad neoplásica. La mayoría de las tecnologías utilizan el EpCAM —un pan-antígeno de diferenciación epitelial que se expresa en las células epiteliales y en casi todos los carcinomas— u otros similares para identificarlas.

En el momento actual la posibilidad de determinación y cuantificación de CTC con tan sólo 7,5 ml de sangre de pacientes con cáncer puede ser una realidad en los laboratorios clínicos, demostrado su relevancia clínica y operatividad técnica.

El sistema semiautomático CellSearch Epithelial Cell Kit (Veridex®) de determinación de CTC es el único aprobado actualmente por la FDA (US Food and Drug Administration) como un predictor independiente de supervivencia global y supervivencia libre de progresión en pacientes con metástasis de mama, colon y cáncer de próstata cuando se aplica en el contexto clínico concreto. Es un sistema que aprovecha la

expresión de la molécula de adhesión celular epitelial EpCAM y enriquece la muestra con fluido férrico y anticuerpos dirigidos contra EpCAM unidos a bandas inmunomagnéticas. Las células epiteliales circulantes son aisladas mediante campos magnéticos y posteriormente teñidas con DAPI (ácido nucleico fluorescente dye 4,2-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride). Para distinguir las células epiteliales de los leucocitos se utilizarán anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína específicos para leucocitos (CD45-aloforescencia) y para células epiteliales (citoqueratinas 8, 18, 19-ficoeritina [CK-PE]). Posteriormente las CTC se identifican y enumeran mediante el analizador CellSpotter, un microscopio semiautomático de fluorescencia que mediante un software específico permite reconocer las CTC^{4,5}.

Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos clínicos de los que se dispone actualmente con CTC sugieren que la capacidad de lanzar células en la circulación es una propiedad intrínseca del tumor, y que su presencia se puede iniciar en etapas precoces del desarrollo y en la progresión tumoral. Las células tumorales se pueden detectar en la sangre y la médula ósea de pacientes con cáncer, sin un contexto clínico-histopatológico o incluso signos de metástasis, y por tanto ofrecen información única, que cuando se aplica adecuadamente puede individualizar el tratamiento del paciente².

Los métodos actuales no son perfectos, y los basados en la expresión del EpCAM en las células cancerosas adolecen de que su presencia no es homogénea en todos los tumores y, por tanto, la dependencia implícita para expresar el suficiente EpCAM por los diferentes tumores que permita su captura inmunomagnética podría afectar su determinación en algunos cánceres. Ahora bien, aunque no existe en la actualidad un patrón oro en los métodos utilizados en la determinación de CTC, afortunadamente otros métodos alternativos para la su detección se han desarrollado y están en periodo de validación. Estos nuevos métodos incluyen los microchips, microfluidos y los microfiltros^{6,7}.

Recientemente investigadores del Hospital General de Massachusetts (MGH), en colaboración con el Centro de Investigación de Sistemas Biomicro-electro-mecánicos (BioMEMS), han desarrollado un microchip de silicón (CTC-chip) capaz de aislar, contabilizar y analizar las CTC. La superficie del microchip, del tamaño de una tarjeta de crédito, está recubierta de alrededor de 80.000 puntos detectores tubulares microscópicos cargados con anticuerpos capaces de detectar las proteínas expresadas en diferentes tumores sólidos y dispuestos geométricamente de manera que, al circular la sangre de la muestra entre ellos con un flujo y una velocidad prefijados por medio de una bomba neumática, capturan las células tumorales por su huella molecular. Los escasos ensayos efectuados en clínica hasta el momento muestran para este método una alta fiabilidad⁶.

Estos avances tecnológicos en la determinación de CTC representan, además, una alternativa para los procedimientos invasivos en la detección tumoral, tales como las biopsias, así como para el seguimiento de los tratamientos administrados hasta ahora, sólo posible por estudios de imagen a intervalos prefijados en los diferentes regímenes terapéuticos. Por tanto, con sólo el análisis de una muestra de sangre se facilitaría el seguimiento y la respuesta en tiempo real de las

distintas terapias mediante el incremento o disminución del número de CTC. Ello permitiría finalizar tratamientos ineficaces precozmente y ensayar otras modalidades terapéuticas.

El rápido desarrollo tecnológico en la determinación de las CTC abre una nueva área: la terapia específica. No sólo permiten la identificación de las CTC, sino también su aislamiento, lo que posibilita el estudio de su información genómica. Diferentes investigadores, muy recientemente, han comunicado los resultados obtenidos del estudio del análisis genómico mediante FISH (*Fluorescence in situ hybridization*) utilizando CTC aisladas viables⁸.

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

En la actualidad cada vez hay mayores evidencias de la importancia clínica de la detección de CTC en la sangre periférica de pacientes con cáncer, demostrando ser un relevante biomarcador pronóstico y predictivo postratamiento¹⁻⁴. Algunas de estas evidencias proceden de estudios efectuados en órganos genitourinarios^{4,9}, por lo que se refuerza la necesidad de potenciar la investigación traslacional multicéntrica en Urología y se justifican los contenidos de este comentario editorial.

B I B L I O G R A F Í A

- Mocellin S, Keilholz U, Rossi CR, Nitti D. Circulating tumor cells: the 'leukemic phase' of solid cancers. *Trends Mol Med*. 2006;12(3):130-9.
- Alix-Panabières C, Riethdorf S, Pantel K. Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis. *Clin Cancer Res*. 2008;14(16):5013-21.
- Okegawa T, Nutahara K, Higashihara E. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with hormone refractory prostate cancer. *J Urol*. 2009;181: 1091-7.
- Olivier C, Galante I, San José L, Resel L, De la Orden V, Vidaurreta M, et al. Circulating tumor cells (ctc) in three tumor types of epithelial origin: prostate, breast and colorectal, in patients with and without metastasis. *Eur Urol Suppl*. 2009;8(4):346.
- Weissleder R, Pittet MJ. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature*. 2008;452(7187):580-9.
- Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*. 2007;450:1235-9.
- Adams AA, Okagbare PI, Feng J, Hupert ML, Patterson D, Göttert J, et al. Highly efficient circulating tumor cell isolation from whole blood and label-free enumeration using polymer-based microfluidics with an integrated conductivity sensor. *J Am Chem Soc*. 2008;130(27):8633-41.
- Leversha MA, Han J, Asgari Z, Danila DC, Lin O, González-Espinoza R, et al. Fluorescence in situ hybridization analysis of circulating tumor cells in metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(6):2091-7.
- Sleijfer S, Gratama J, Sieuwerts J, Kraan J, Martens JW, Foekens JA. Circulating tumour cell detection on its way to routine diagnostic implementation? *Eur J Cancer*. 2007;43:2645-50.

C. Olivier Gómez^a y J. Carballido Rodríguez^b

^aServicio de Urología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, España

^bServicio de Urología, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda, Madrid, España

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: carlos.olivierg@gmail.com (C. Olivier Gómez).