

## Biopsia líquida

En estos tiempos líquidos, de modernidad líquida y amor líquido no debemos extrañarnos de que haya una biopsia líquida, término acuñado en el 2004, y que nos apabullen con noticias sobre sus logros y ventajas. La biopsia líquida busca, cuantifica y caracteriza las células tumorales, el ADN de sus núcleos (*cdNA*), o fragmentos de ese ADN (*cfDNA*) en la sangre circulante de individuos con tumores.

En 1869, poco después que Johannes Müller (1801-1858) estableciera en 1838 que los tumores están formados por células, T.R. Ashworth, un médico australiano, comunicó un caso de autopsia en el cual encontró en la sangre venosa células similares a las que formaban alrededor de 30 tumores subcutáneos (Ashworth, T.R. A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death. *Aust Med J* 1869, 14, 146-147). Es de rigor incluir esta cita en cuanto revisión se publica, para nosotros fue inaccesible. ¿Cuántos revisores habrán leído el original?

El problema, entre 1869 y el presente, interesó siempre. En un libro de referencia clásico ocupa un capítulo de 22 páginas, incluye una exhaustiva revisión histórica y cinco páginas en tipo pequeño con 283 referencias bibliográficas<sup>1</sup>. El primer escollo era y es técnico ¿Cómo separar las células tumorales de las otras células de la sangre? ¿Cómo concentrarlas si son tan pocas? ¿Cómo identificarlas con certeza?

En la actualidad los métodos y técnicas usuales para separarlas y concentrarlas se basan en:

1) *Tamaño*: las células tumorales son más grandes (> 8 µm) que los leucocitos (< 8 µm), y no pasan por un filtro con poros de 8µm, quedan retenidas en éste.

2) *Densidad*: en una solución de Ficoll (o un medio similar), las partículas más pesadas, eritrocitos y neutrófilos, van al fondo y las más livianas, células tumorales y mononucleares, y el plasma, quedan arriba.

3) *Separación inmuno-magnética*: La más empleada, la única autorizada por la *Federal Drug Administration* (FDA) de EE.UU., es *CellSearch®*, de Janssen Diagnostics. Emplea la marcación inmuno-magnética y la microscopía de fluorescencia digital. De una muestra de 7.5 ml de sangre periférica se descartan los eritrocitos, el resto se mezcla con un buffer y un ferro-fluido conjugado con un anticuerpo monoclonal, EpCAM (**E**pithelial **C**ell **A**dhesion **M**olecule), el resultado son nanopartículas con un núcleo magnético revestidas por el anticuerpo, el complejo ferro-magnético se adhiere a la superficie de las células epiteliales. Con imanes se separan las células marcadas que luego suspenden y tiñen con reactivos fluorescentes: los núcleos con DAPI (*4'-6-diamidino-2-phenylindole*); las células epiteliales con anticuerpos contra las citoqueratinas CK, 8, 18, y 19, conjugados con PE (*phycoerythrin*); los leucocitos contaminantes con APC (*allophycocyanin*)-CD45. El líquido con las células marcadas se coloca en un cartucho (*chip*) con magnetos que atraen a las células magnetizadas a su superficie y se coloca en un analizador. El analizador escanea la superficie del *chip* con un microscopio de fluorescencia y capta las imágenes de las células epiteliales marcadas con CKs o los leucocitos con CD45. La sensibilidad de la técnica es de una célula epitelial en 7.5 ml de sangre periférica. Tres o más células tumorales en el cáncer colo-rectal, y cinco o más en el cáncer de mama y de próstata indican una evolución desfavorable.

4) *Microfluídica*: Técnica basada en el comportamiento de los fluidos en micro-escala, cuando fluyen por canales de menos de 1 mm de diámetro. La sangre pasa por la superficie de un tubo y un dispositivo o un filtro separan las células por tamaño, o pasa por un *chip* donde hay puestos (*multiposts*) cubiertos por los anticuerpos anti células epiteliales, las células tumorales se adhieren y una cámara las registra<sup>2-5</sup>.

Esta lista sirve apenas de orientación, los ingeniosos nunca descansan y cada pocos meses se presenta alguna nueva técnica con el invariable anuncio de que es más sensible, sencilla y barata que las precedentes. La consigna de los innovadores debe ser: *Turning Science into Business* (Transformar la ciencia en negocios). Está fuera del alcance del redactor de esta nota comentar las técnicas que analizan *cDNA* o *cfDNA*.

El objetivo más buscado de contar las células tumorales en la sangre periférica es predecir la supervivencia, cuando menor el número mejor, cuando mayor peor. Se ha estudiado en cáncer de mama, próstata, colon y recto, pulmón y otros, también en sarcomas. Las publicaciones son innumerables. Los mismos autores producen una revisión por año, o más de una en distintas revistas, alguna tiene 159 referencias, y abundan las reuniones con este tema en el programa ¿Cómo estar al día? Eligiendo, es imposible leer todas.

Como otras ventajas potenciales de la técnica se señalan: evitar las biopsias convencionales, invasoras, a veces imposibles, pequeñas, no representativas de la heterogeneidad del tumor, irrepetibles; permite la genotipificación del tumor, sus cambios por el tratamiento y la elección del anti-neoplásico más efectivo; el tamizado (*screening*) de metástasis no visibles (¿?), la mínima enfermedad residual.

Pero tras las técnicas viene la interpretación de los resultados y poco se insiste sobre sus limitaciones: la entrada en la circulación de las células tumorales no es regular ni continua; no se detectan entre el 10 y el 50% de los individuos con metástasis; no todas las células tumorales son grandes; se aglutinan entre sí o con las plaquetas y otros componentes de la sangre; aun las viables son frágiles y se destruyen en los capilares; son heterogéneas y plásticas; se encuentran células benignas circulantes; no todas las células tumorales tienen el antígeno epitelial en la superficie, y el sistema inmune para algo funciona<sup>6,7</sup>. Para más detalles consultar la nota crítica titulada *Circulating tumor cells: Who is the killer?*<sup>8</sup>.

No todas las células tumorales son viables ni todos los órganos aptos, las siembras no son eficientes (*"The seed and soil"*, hipótesis de Stephen Paget, 1889)<sup>9,10</sup>. Un experimento en seres humanos- aclaramos ya que el objetivo era un paliativo no un experimento- es el *shunt* peritoneo-yugular, que alivia el dolor y la distensión abdominal en la ascitis maligna por cánceres intratables pero que infunde en la circulación general las células tumorales del líquido ascítico. En las autopsias de 15 fallecidos en estas condiciones no se encontraron metástasis en ocho, de estos ocho uno tenía dos tumores (mama y ovario), y otro tuvo el *shunt* funcionando 27 meses. Los autores responden a las objeciones posibles, el artículo es aún el más persuasivo y prolijo sobre la cuestión<sup>11</sup>.

El lector interesado y el ansioso de incorporar a la práctica esta nueva versión de la citología diagnóstica pueden: a) leer alguna o algunas revisiones recientes sobre el tema<sup>2,3-12,13</sup>; b) entusiasmarse con las penúltimas noticias<sup>14</sup>; c) consultar los folletos y los precios a los fabricantes del producto más adecuado y rentable: *Turn Science into Business*.

Juan Antonio Barcat

e-mail: jabarcat@yahoo.com.ar

1. Koss LE, Melamed MR. Koss' Diagnostic cytology and its histopathological bases. Philadelphia: Lippincot, Williams and Wilkins, 2005. 5<sup>th</sup> Edition. Volume 2, Chapter 43. Circulating tumor cells, p1544-66.
2. Joosse SA, Gorges TM, Pantel K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Mol Med* 2014; doi 10.15252/emmm.201303698 (Online).
3. Lowes LE, Allan AL. Recent advances in the molecular characterization of circulating tumor cells. *Cancers* 2014, 6, 595-624; doi:10.3390/cancers6010595.
4. Gerges N, Rak J, Jabado N. New technologies for the detection of circulating tumour cells. *Brit Med Bull* 2010; 94: 49-64.
5. Zeliadt N. Capturing cancer cells on the move. *The Scientist Magazine* 2014; April 1. En:www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/39503/title/Capturing-Cancer-Cells-on-the-Move. www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/39503/title/Capturing-Cancer-Cells-on-the-Move; consultado el 27/12/2014.
6. Plaks V, Koopman CD, Werb Z. Circulating tumor cells (Perspective). *Science* 2013; 341: 1186-8. doi 10.1126/science.1235226.

7. Pantel K, Deneve E, Nocca D, et al. Circulating epithelial cells in patients with benign colon diseases. *Clin Chem* 2012; 5: 936-40.
8. Paterlini-Bréchet P. Circulating tumor cells: Who is the killer? *Cancer Microenvironment* 2014; 7: 161-76. doi 10.007/s12307-014-1064-4.
9. Langley RR, Fidler IJ. The seed and soil hypothesis revisited - the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *Int J Cancer* 2011; 128: 2527-35. doi:10.1002/ijc.26031.
10. Gupta GP, Masagué J. Cancer metastasis: Building a framework. *Cell* 2006; 127: 679-95.
11. Tarin D, Price JE, Kettlewell MGW, et al. Mechanisms of human tumor metastasis studied in patients with peritoneovenous shunts. *Cancer Res* 1984; 44: 3584-92.
12. Alix- Panabières C, Pantel K. Circulating tumor cells: Liquid biopsy of cancer. *Clin Chem* 2013; 59: 110-118. (Mini-Reviews).
13. Balic M, Williams A, Lin H, Datar R, Cote RJ. Circulating tumor cells: From bench to bedside. *Annu Rev Med* 2013; 64: 31-44.
14. Standaert M. A blood test to catch cancer early. *MIT Technology Review*, March-April 2015. En: [www.technologyreview.com/featurestory/53491/liquid-biopsy/](http://www.technologyreview.com/featurestory/53491/liquid-biopsy/); consultado el 29-3-2015.

-----

26 November

*There is nothing like gardening to keep you young. It is the most rejuvenating of all occupations. One is always looking forward to next year, or five years hence.*

No hay nada como la jardinería para mantenerse joven. Es la más rejuvenecedora de las ocupaciones. Uno está siempre esperando el próximo año, o de ahí a cinco años.

Vita Sackville-West\* (1892-1962)

*The Observer* 26 November 1950. En: Martin Hoyles. *The Gardener's Almanack. A book of days*. London: Thames and Hudson, 1997.

\*Escritora y jardinera inglesa. Con su marido Harold Nicolson crearon el jardín de *Sissinghurst Castle* (protegido ahora por el *National Trust*): Durante 15 años escribió la columna semanal *In your garden* en *The Observer*. Murió a los 70 años. Cristina Bugatti, escritora y jardinera argentina, durante 16 años escribió una columna semanal *Desde el jardín* en *La Nación*. Murió a los 86 años, el día anterior a su muerte apareció su última columna.