

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

DEPARTAMENT DE MEDICINA

FACULTAT DE MEDICINA

**Caracterización molecular de células tumorales  
circulantes en sangre periférica de pacientes  
con cáncer de mama**

**Doctorando:** Rosa Nadal Rios

**Directores:** Dr. Rafael Rosell

Dr. María José Serrano

Dr. Francesc Solé

**Tutor:** Profesor Rafael Esteban

El Dr. Rafael Rosell, Doctor en Medicina y Cirugía, Jefe de Servicio del Servicio de Oncología Médica del Hospital Germans Trias i Pujol y Profesor asociado del Departamento de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona; el Dr. Rafael Esteban, Doctor en Medicina y Cirugía, Jefe de Servicio de Medicina Interna y Hepatología del Hospital de Vall d'Hebron de Barcelona y Profesor del Departamento de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona; la Dra. María José Serrano, Licenciada en Biología y doctora en Ciencias de la Salud por la Universidad de Jaén; el Dr. Francesc Solé, Licenciado en Biología y doctor en Biología por la Universitat Autònoma de Barcelona

#### HACEN CONSTAR

Que Rosa Nadal Rios, Licenciada en Medicina y Cirugía por la Universitat Autònoma de Barcelona, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación para elaborar la Tesis Doctoral Titulada 'Caracterización molecular de células tumorales circulantes en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama' y mediante este escrito autorizamos su presentación para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Lo cual se hace constar por la presente y a todos los efectos en Barcelona 25 Septiembre 2014

Rafael Rosell

María José Serrano

Francesc Solé

Rafael Esteban

Co-Director de la Tesis

Co-director de la Tesis

Co-director de la Tesis

Tutor de la Tesis

## **Agradecimientos**

Sempre als meus pares

A Oriol per a que el món l'emocioni i ho aconseguieixis tot.

## ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	7-26
	I.1 <i>Células Tumorales circulantes (CTCs)</i>	
	I.2 <i>Cascada metastásica</i>	
	I.3 <i>Invasión</i>	
	I.4 <i>Motilidad, migración y colonización</i>	
	I.5 <i>Papel de la transición epitelio mesénquima (TEM) en la progresión tumoral</i>	
	I.6 <i>Transición epitelio-mesénquima y CTCs</i>	
	I.7 <i>Progresión tumoral y CTCs</i>	
	I.8 <i>Implicaciones clínicas y terapéuticas</i>	
	I.9 <i>Caracterización de biomarcadores en CTCs en pacientes con cáncer de mama</i>	
	▪ <i>Receptores hormonales</i>	
	▪ <i>HER2</i>	
	▪ <i>EGFR y componentes de la vía de señalización PI3K<math>\alpha</math>/PTEN/AKT</i>	
	▪ <i>Marcadores de TEM y de células madre en CTCs</i>	
II.	HIPÓTESIS.....	30
III.	OBJETIVOS.....	30-31
IV.	TRABAJO.....	32-52
V.	PACIENTES Y METODOS.....	53
	V.1 <i>Estudio de biomarcadores en el tumor primario</i>	
	V.2 <i>Aislamiento y enumeración de las CTCs</i>	
	V.3 <i>Cultivos celulares y experimentos de recuperación celular</i>	
	V.4 <i>Viabilidad de los estudios de los marcadores: RH, EGFR, HER2 y TOPA2</i>	
	V.5 <i>Viabilidad del estudio del marcador de célula madre CD133</i>	
	V.6 <i>Análisis de Inmunoblotting para la detección de CD133</i>	
	V.7 <i>Caracterización del RE, RP y del EGFR en CTCs</i>	
	V.8 <i>Caracterización de la amplificación del HER2 y TOP2A en CTCs</i>	

**V.9 Caracterización del CD133 mediante inmunofluorescencia en CTCs**

<b>VI.</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>54</b>
<b>VII.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>55-64</b>
	<i>VII.1 Características clínicas en relación al estado de las CTCs</i>	
	<i>VII.2 Estado de los receptores hormonales en CTCs</i>	
	<i>VII.3 Expresión del EGFR en CTCs</i>	
	<i>VII.4 Estado HER2 y TOP2A en CTCs y en los correspondientes tumores primarios</i>	
	<i>VII.5 Caracterización de las CTCs después del tratamiento sistémico</i>	
	<i>VII.6 Subtipos de cáncer de mama y perfil de biomarcadores en CTCs</i>	
	<i>VII.7 Expresión de CD133 en células tumorales de MCF-7</i>	
	<i>VII.8 Expresión de CD133 en CTCs</i>	
	<i>VII.9 Correlación de la expresión de CD133 en CTCs con las características clínico-patológicas</i>	
	<i>VII.10 Subtipos de cáncer de mama y expresión de CD133 en CTCs</i>	
	<i>VII.11 Expresión de CD133 en CTCs después del tratamiento sistémico</i>	
<b>VIII.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>65-85</b>
<b>IX.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>86</b>
<b>X.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>87-98</b>

## I. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es uno de los tumores malignos más frecuentes en la mujer. En 2012, el proyecto GLOBOCAN estimó que había 1.67 millones de casos de cáncer de mama a nivel mundial (1). En Europa, incluyendo países no integrantes de la Unión Europea, se diagnosticaron 464.000 casos nuevos. Estos casos representaron el 28.8 % de todos los tumores diagnosticados en mujeres y un 13.5% de todos los pacientes con cáncer. El cáncer de mama representó el 7.5% de todos los casos de muertes por cáncer en Europa en 2012. Datos procedentes de EUROCORE-5 mostraron que la mediana de supervivencia a los 5 años de mujeres europeas diagnosticadas de este tumor es del 82% (2). A pesar de los avances en la prevención, detección y tratamiento adyuvante del cáncer de mama, una proporción sustancial de pacientes se diagnostican con enfermedad metastásica en el momento del diagnóstico inicial (5%) o durante el curso de la enfermedad (30%)(3). Una vez el cáncer de mama ha diseminado a otros órganos es una enfermedad típicamente incurable. En la mayoría de casos, la quimioterapia convencional solo tiene efecto paliativo, aunque una pequeña fracción de pacientes puede alcanzar remisiones completas prolongadas (4). Múltiples mecanismos biológicos como por ejemplo la heterogeneidad intrínseca del cáncer de mama o la existencia de células madre del cáncer son los responsables de los resultados tan pobres que se consiguen con los tratamientos convencionales (quimioterapias o tratamientos endocrinos).

La heterogeneidad biológica del cáncer de mama ha permitido su clasificación en al menos tres grandes subtipos (5-7). La actual clasificación del cáncer de mama está basada en el perfil de expresión de los receptores de los receptores hormonales (RH), estrógeno (RE) y/o progesterona (RP), y el estado del gen *ErbB2* (codifica para el receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano: HER2). Estos marcadores han permitido distinguir los tres principales subgrupos moleculares de cáncer de mama: tumores luminales los cuales son positivos para al menos uno de los RH y HER2 negativo; tumores HER2 amplificado; y aquellos que no expresan ninguno de los tres receptores, llamados triple negativos. Aunque esta división no es perfecta y existen subgrupos dentro de los tres principales subgrupos descritos, cada subgrupo molecular comparte un perfil de expresión genética, resultados clínicos y respuesta a los tratamientos. Estas similitudes dentro de los subgrupos han influido profundamente el

tratamiento de estas pacientes. Además, ha contribuido a un mayor conocimiento de la heterogeneidad biológica del cáncer de mama. El reconocimiento de la existencia tanto de heterogeneidad inter-tumoral como intra-tumoral ha reforzado la necesidad de una definición más precisa de los fenotipos tumorales. El estudio de nuevos biomarcadores, perfiles moleculares y/o vías de señalización asociadas a potenciales dianas terapéuticas en cada subtipo tumoral podrían mejorar la selección de estos tratamientos (8).

El objetivo final de la identificación de biomarcadores es individualizar tratamientos y obtener un beneficio terapéutico máximo con mínimos efectos tóxicos. Durante los últimos 15-20 años, se han descrito múltiples factores pronósticos y predictivos de respuesta para el cáncer de mama metastásico (9). Los más relevantes han sido el estado de los RH y del HER2, el grado tumoral, la extensión de la enfermedad, la edad, el estado general y los tratamientos previos (9, 10). Durante el proceso de toma de decisiones terapéuticas, los factores predictivos más importantes son los RH para la terapia endocrina y la amplificación y/o expresión del HER2 para los tratamientos dirigidos contra HER2 (11).

Una de las campos que recientemente ha suscitado más atención es el estudio del valor pronóstico y predictivo de la detección y caracterización de las células tumorales circulantes (CTCs). De forma paralela, otra estrategia que está siendo explorada para intentar frenar el proceso de diseminación ha sido el estudio los mecanismos que promueven este evento.

### ***1.1 Células Tumorales circulantes (CTCs)***

La diseminación tumoral a través de la extravasación de CTC al torrente sanguíneo, es un paso crucial para el desarrollo de metástasis. Las CTCs son células tumorales que se encuentran rodeadas de billones de células hematopoyéticas en el torrente sanguíneo lo cual dificulta su detección. La presencia de CTCs en sangre periférica fue informada por primera vez en 1869 (12), pero solamente avances tecnológicos recientes en los métodos de detección han permitido la identificación y caracterización de estas células de forma reproducible. Para su identificación, en primer lugar se deben distinguir las CTCs de las células hematopoyéticas y de las células epiteliales normales. Con este fin, se utilizan diferentes

Tabla I. Posibles métodos de selección de células viables para el análisis de expresión génica. Po s el ML de los métodos de selección de células viables para el análisis de expresión génica.

**Tabla I**

Metodología	Sistema	Método de enriquecimiento	Detección
<b>Separación inmunomagnética positiva</b>			
	CellSearch System	Bolas inmunomagnéticas conjugadas con un anticuerpo anti EpCAM	Inmunocitoquímica positiva para CK8, CK18, CK19, negativa para CD45, núcleo positivo para DAPI, además de criterios morfológicos
	MACS® technology/Dynal magnetic beads	Depleción de células CD45	Inmunocitoquímica positiva para CK mas criterios morfológicos
<b>Selección Negativa</b>			
	MACS® technology	Depleción de células CD45	Inmunocitoquímica positiva para CK mas criterios morfológicos
	EPISOT®	Rosette mas Ficoll: Depleción de células CD45 positivas	Detección de células epiteliales secretoras viables: CK19, MUC1, catepsin D
Micropocillos conjugados con anticuerpos	CTCs-Chips	Micropocillos: micropocillos conjugados con anticuerpos	Inmunocitoquímica positiva para CK8, CK18, CK19, negativa para CD45, núcleo positivo para DAPI, además de criterios morfológicos
RT-PCR	AdnTest	Bolas inmunomagnéticas conjugadas con un anticuerpo anti EpCAM y MUC-1	Biología Molecular: RT-PCR basada en la positividad de al menos one de los siguientes marcadores. mRNA MUC1, EpCAM y HER2
Citometría de escaneado laser	MAINTRAC®	Lisis de glóbulos rojos	Inmunocitoquímica positiva para EP-CAM y negativa para CD45
<b>Selección basada en el tamaño</b>			
	Screen cell	Filtración en microporo basado en el tamaño celular	Inmunocitoquímica positiva para marcadores epiteliales como EpCAM, para marcadores mesenquimales o perfil molecular
	ISET	Tamaño celular: filtro con poros de 8µm	Inmunocitoquímica positiva para marcadores epiteliales como EpCAM, para marcadores mesenquimales o perfil molecular

Tabla II. Posibles métodos de selección de células viables para el análisis de expresión génica. Po s el ML de los métodos de selección de células viables para el análisis de expresión génica.

mayoría de casos. Las dos técnicas más usadas son la separación mediante un campo electromagnético o mediante inmunoseparación. Típicamente, se conjuga un anticuerpo específico para un marcador epitelial con partículas magnéticas y se separan en un campo magnético aquellas células detectadas por el anticuerpo. Las células seleccionadas son seguidamente identificadas y caracterizadas. Desafortunadamente, nuestra capacidad de estudio y de extracción de conclusiones biológicas y clínicas es muy dependiente de los parámetros de las técnicas de aislamiento. A pesar de los avances hechos, aún estamos empezando a entender el papel de las CTCs en los procesos de diseminación y progresión.

### **1.2 Cascada metastásica**

La cascada metastásica es un proceso biológico que consta de múltiples pasos secuenciales por los que las células tumorales deben pasar para abandonar el tumor primario y generar una metástasis. Las células tumorales deben invadir la membrana basal, el tejido de alrededor y finalmente entrar en el torrente sanguíneo y/o linfático. Estas son capaces de sobrevivir en la circulación, extravasar a un órgano distante y algunas de ellas tendrán la habilidad de establecer un tumor macroscópico en el órgano distante. Datos experimentales sugieren que por cada gramo de tejido tumoral, millones de células tumorales se intravasan cada día al torrente sanguíneo o sistema linfático (13). Sin embargo, el destino final de las CTCs es más controvertido y la evidencia pre-clínica y clínica es inconsistente. En algunos modelos experimentales, la mayoría de CTCs se destruyen en la circulación(14, 15); mientras que en otros trabajos, la mayoría de CTCs sobreviven y extravasan(16, 17). Sin embargo, lo que sí parece consistente es que la mayoría de CTCs no formaran un foco metastásico macroscópico. A pesar de todos los avances realizados, aun no disponemos de un conocimiento detallado de los mecanismos que rigen la cascada metastásica.

### **1.3 Invasión**

La invasión es el primer paso crítico en el proceso de metastatización. Este proceso requiere de cambios en las adhesiones célula - célula y las adhesiones a la matriz extracelular. La familia de las cadherinas representa uno de los grupos de proteínas más importantes involucradas en las adhesiones célula – célula. El proceso de invasión frecuentemente se acompaña de un cambio de expresión en las

cadherinas con la regulación negativa de las E-cadherina y la regulación positiva de las N-cadherina (asociada a la transición epitelio-mesenquima (TEM)(18). Más allá de esta primera fase, la invasión es facilitada por la degradación proteolítica de la matriz extracelular que permite que las células tumorales penetren los límites del tejido. La adherencia de las células a la matriz extracelular es mediante las integrinas las cuales forman heterodímeros transmembrana.

La degradación de la membrana extracelular es mediada por las metaloproteinasas de la matriz (MMP) y el sistema activador del plasminógeno tipo urokinasa (uPA). Cuando el receptor de uPA (uPAR) interacciona con la uPA, el plasminógeno se degrada y activa la plasmina que regula la degradación de la matriz extracelular y la activación de las MMPs (19). Es importante destacar que un número significativo de CTCs aisladas de pacientes con enfermedad avanzada presentan amplificación de *uPAR*(20).

#### **1.4 Motilidad, migración y colonización**

Los diferentes tipos de migración, representados por la migración individual (migración ameboide) o la migración colectiva de células, requieren de la colaboración de diversas vías moleculares (21, 22). La activación de las RhoGTPasas juega un papel muy importante en la migración ameboide de una sola célula(18, 23). Este tipo de migración requiere de la pérdida de contacto con la matriz extracelular y la polaridad celular. Como consecuencia, las células tumorales adquieren rápidos movimientos siguiendo el camino con menos resistencia. Tanto la TEM como las RhoGTPasa activan las MMPs incrementando la degradación de la matriz extracelular y a su vez la invasividad de las células cancerígenas(24).

En contraste, la migración colectiva de células requiere solamente hasta cierto punto la integridad de algunas de las uniones intercelulares. En este caso, las células tumorales invaden, intravasan y diseminan en *clusters* y estos permiten la formación más efectiva de émbolos en los vasos sanguíneos o linfáticos confiriéndoles mayor capacidad para sobrevivir en la circulación(14).

Las células estromales también tienen un papel crucial en el proceso de diseminación, ya que modulan los procesos de invasión, migración y además pueden regular el proceso de TEM(25). Los fibroblastos y los miofibroblastos representan la mayoría de células estromales involucradas en el cáncer de mama.

Los fibroblastos asociados a carcinoma (CAFs) son más competentes en promover el crecimiento de las células de cáncer de mama y promover la angiogénesis que aquellas células comparables a los CAFs pero que se han originado fuera de las masas tumorales(26, 27). Los CAFs se pueden originar de fibroblastos locales o de sus precursores y de células madre del mesénquima derivadas de la médula ósea(26). Una de las vías de señalización más implicadas en los procesos que llevan a cabo los CAFs es el axis SDF1-CXCR4 (stromal cell-derived factor 1-CXC-chemokine receptor 4)(27).

Las células tumorales además pueden expresar receptores de quimioquinas facilitan la migración de estas células a localizaciones específicas(28, 29). Las quimioquinas pueden además regular desde el órgano de origen si las células tumorales van a prosperar y colonizar otros órganos. Existe evidencia de que un gradiente de quimioquinas en la sangre o en el microambiente tumoral, en colaboración con un 'nicho pre metastásico' apropiado formado por células hematopoyéticas derivadas de la médula ósea, propicia la colonización de ciertos órganos. Estas células hematopoyéticas derivadas de la médula ósea atraen las células tumorales y promuevan el desarrollo de metástasis (30, 31). Por lo tanto, las dianas terapéuticas que involucran las interacciones entre las células hematopoyéticas derivadas de la médula ósea y las células tumorales y aquellos compuestos que antagonicen los receptores de quimioquinas representan estrategias terapéuticas muy prometedoras.

El ambiente que encuentran las CTCs en el torrente sanguíneo es muy desfavorable debido a las fuerzas físicas, la presencia de células inmunológicas y la anoikis –apoptosis dependiente del anclaje-. Todos estos factores contribuyen a la insuficiencia metastásica (32). Isiah Fidler mostró ya en los años 70s que el proceso de metastatización es un proceso ineficiente(14, 33). Por lo tanto, la efectividad metastásica de estas células es muy baja y la mayoría no pueden completar el proceso más allá de micrometastasis precoces (34).

Se ha demostrado en modelos animales que los factores de coagulación también juegan un papel muy importante en los procesos de metastatización y progresión del cáncer de mama(35, 36).La unión de las células tumorales a los factores de coagulación, incluyendo factor tisular, fibrinógeno, fibrina y trombina crea un trombo y facilita que este se detenga en los lechos capilares y seguidamente el establecimiento

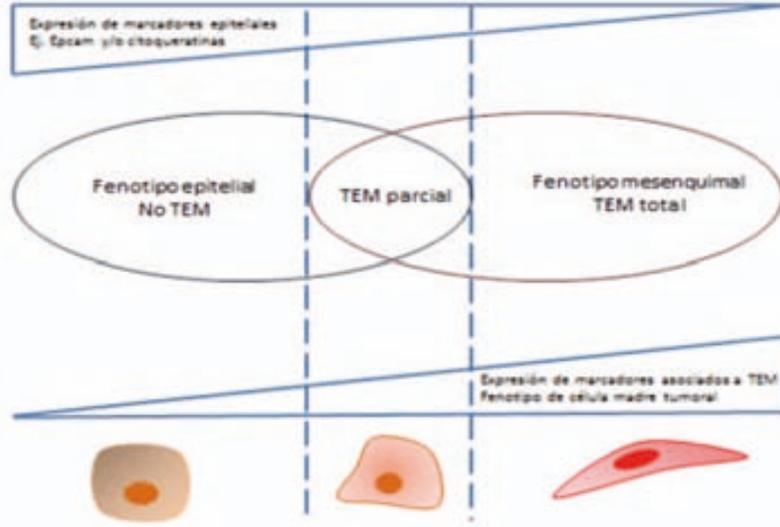
de focos metastásicos (35). Este concepto se justifica por los resultados de un meta-análisis que mostró que la anticoagulación terapéutica tiene efectos positivos en la supervivencia de los pacientes con cáncer(37). Sin embargo, el efecto antimetastásico de la heparina parece no ser debido a su efecto anticoagulante sino más bien a su habilidad para inhibir la interacción entre oligosacáridos presentes en las células tumorales y la P-selectina en las plaquetas (38, 39). Según un estudio retrospectivo, el riesgo de tromboembolismo venoso (TEV) en los pacientes con cáncer de mama metastásico se asocia a niveles elevados de factores procoagulantes, así como a la presencia de CTCs (40, 41). También, se ha postulado que la antiagregación o la anticoagulación podría facilitar la liberación de células tumorales al torrente sanguíneo; sin embargo, los tratamientos anticoagulantes aún no han demostrado tener ningún impacto en la generación de CTCs.

El flujo de células parece no ser solamente unidireccional y las CTCs podrían ser liberadas desde tumores metastásicos y volver a poblar el tumor de origen mediante un proceso llamado 'auto sembrado' (42, 43). Este proceso probablemente requiere de dos funciones diferentes: la habilidad del tumor de atraer su propia descendencia y las CTCs de reinfiltrar de nuevo el tumor primario. Este concepto podría explicar algunas observaciones clínicas, como la relación entre el tamaño tumoral, pronóstico, y las recaídas locales después de extirpaciones aparentemente completas del cáncer de mama(42).

### ***1.5 Papel de la transición epitelio mesénquima (TEM) en la progresión tumoral***

Las células tumorales frecuentemente activan la transdiferenciación de los programas involucrados en el proceso de TEM. Estas células adquieren las propiedades necesarias para ejecutar los pasos necesarios que llevarán a su metastatización (23). Mediante este proceso, las células pierden sus contactos célula - célula y la polaridad celular, se regulan negativamente los genes asociados a rasgos epiteliales y adquieren la expresión de genes asociada a rasgos mesenquimales, a la vez que se producen cambios del citoesqueleto. Estos procesos celulares culminan con la apariencia mesenquimal de las células y con un incremento de la invasividad y movilidad celular (Figura 1) (44).

Figura.1



?

El modelo de la transición epitelial-mesenchimal (TEM) describe el proceso por el cual las células tumorales adquieren características de células madre tumorales (TEM) durante el desarrollo de la metástasis. Este proceso implica la pérdida de marcadores epiteliales como E-cadherina y citoqueratinas, y la ganancia de marcadores asociados a TEM, como factores de crecimiento y genes de células madre. La TEM parcial se caracteriza por la coexistencia de ambos tipos de marcadores, mientras que la TEM total implica la completa pérdida de los marcadores epiteliales y la adquisición de un fenotipo completamente mesenquimal. Este proceso está regulado por una serie de factores, incluyendo cambios en la expresión de genes como EMT6 y EMT7, y la activación de vías de señalización como Wnt/PCP y TGF-β.

La transición epitelial-mesenchimal (TEM) es un proceso clave en el desarrollo de la metástasis de los tumores sólidos. Durante este proceso, las células tumorales pierden sus características epiteliales y adquieren características de células madre tumorales (TEM). Este proceso está regulado por una serie de factores, incluyendo cambios en la expresión de genes como EMT6 y EMT7, y la activación de vías de señalización como Wnt/PCP y TGF-β. La TEM parcial se caracteriza por la coexistencia de ambos tipos de marcadores, mientras que la TEM total implica la completa pérdida de los marcadores epiteliales y la adquisición de un fenotipo completamente mesenquimal. Este proceso está regulado por una serie de factores, incluyendo cambios en la expresión de genes como EMT6 y EMT7, y la activación de vías de señalización como Wnt/PCP y TGF-β.

## 1.6 Transición epitelio-mesénquima y CTCs

La TEM se caracteriza por múltiples cambios moleculares que facilitan la invasión y la intravasación de las células tumorales al torrente sanguíneo(47, 48), por lo tanto la generación de al menos parte de las CTCs. Este proceso también se ha asociado a la adquisición de un fenotipo de célula madre tumoral y resistente a las señales de apoptosis. Por lo tanto, se facilitaría la supervivencia de las CTCs en ambientes hostiles (45) y como consecuencia su persistencia en el torrente sanguíneo. Además, las CTCs derivadas de este proceso serían también más proclives a la colonización de órganos distantes.

También se ha observado que el fenómeno de la TEM contribuye al 'switch antigénico', favoreciendo la formación de nuevos vasos y por lo tanto permitiendo la supervivencia de las CTCs después de su extravasación y colonización del nuevo órgano (49, 50). Otro proceso que es modulado por el proceso de TEM, es la regulación positiva de las moléculas de adhesión célula – célula que median en la adhesión de las células tumorales al endotelio. De esta manera, aumenta la capacidad de estas células de migrar a través de una lámina de estrato único *'in vitro'* y facilitan los procesos de intravasación y extravasación(51, 52). Milson, *et al*; demostraron que el proceso de TEM se asocia a la expresión del factor tisular asociado con EGFR (53). Un aumento de la expresión del factor tisular puede facilitar la formación de émbolos tumorales y su impactación en los lechos capilares.

Aunque en conjunto estos datos sugieren un papel relevante de la TEM en la biología de las CTCs, en realidad existe muy poca evidencia experimental o translacional que asocie el proceso de TEM con las CTCs. Por ejemplo se ha demostrado en modelos animales, utilizando la línea celular murina de cáncer de mama 4T1 que tiene la característica de ser altamente metastásica, que la inhibición de *TWIST* (factor de transcripción que induce la TEM) regula el tamaño tumoral y el número de CTCs aisladas en los ratones(54). En otro modelo, la transformación de queratinocitos de la cavidad oral de hámsteres mediante un efector de la vía de TGF- $\beta$  (p21<sup>CKD2-API</sup>) conllevó una transformación de estas células a un fenotipo de TEM (55). Tras la inyección subcutánea de estas células en los ratones, tanto las células con un fenotipo de TEM como los controles fueron capaces de formar un tumor, pero solo aquellas células con un fenotipo de TEM se detectaron en sangre periférica. Sin embargo, ninguno de los tipos celulares

fue capaz de desarrollar metástasis pulmonares en estos ratones. En contraposición, si los dos tipos de células (con fenotipo TEM y las células control) eran inoculadas directamente al torrente sanguíneo, solo aquellas células sin fenotipo de TEM (controles) desarrollaron metástasis pulmonares(55). Chaffer *et al*; mostró el mismo fenómeno en otro modelo animal. Aquellas células de una línea células parenterales de cáncer de vejiga con características de TEM formaron metástasis si se inyectaban en la vejiga de los ratones en contraposición con las células con características epiteliales (línea celular procedente de células aislada de una metástasis ósea mediante selección *in vivo* de estas células). Después de la inyección intracardiaca de ambos tipos de células, aquellas células con un fenotipo epitelial fueron capaces de desarrollar más metástasis pulmonares en los ratones en cooperación con aquellas con un fenotipo de TEM(56).

Estos datos experimentales sugieren que las células con un fenotipo de TEM facilitan la intravasación y la generación de CTCs pero estas células tumorales son menos competentes para formar metástasis. En contraposición, las células epiteliales tienen una capacidad más limitada de activar el proceso de intravasación pero son más propensas a crecer en órganos secundarios(48, 55). Otra posibilidad para explicar estos hallazgos sería que los dos tipos celulares cooperaran en el proceso de metastatización. Dado que estas observaciones son preliminares, el papel del proceso de TEM en la generación de CTCs, su extravasación a órganos distantes y la formación de metástasis requieren aún de un extenso estudio.

### **1.7 Progresión tumoral y CTCs**

Tradicionalmente, la diseminación tumoral se ha visto como un proceso secuencial y la enfermedad metastásica un evento tardío en el proceso de la progresión tumoral. Por lo tanto, se suponía que solo aquellos tumores grandes eran capaces de generar CTCs. Sin embargo, nuevos datos apoyan que la diseminación tumoral es un evento precoz al menos en el cáncer de mama, cáncer de próstata y cáncer de esófago(57-59). Por ejemplo, se encontraron células diseminadas en la medula ósea y los pulmones de un modelo transgénico de ratones con cáncer de mama, antes de que las células del tumor primario empezaran a abrirse camino a través de la membrana basal durante la etapa pre-invasiva de hiperplasia atípica (57). En otro modelo experimental, se introdujeron en la circulación sistémica células mamarias

no transformadas de ratón y se observó que podrían desarrollar metástasis pulmonares sin requerir de su transformación en la localización primaria (inducción oncogénica inmediata y retardada). Estos datos revelan que las CTCs pueden sobrevivir en un órgano distante por periodos extensos de tiempo y que los eventos que inducen transformación en el órgano secundario pueden ser suficientes para inducir el crecimiento tumoral(16).

Como ya se ha mencionado anteriormente, las CTCs juegan un papel en el proceso de 'auto sembrado'. En modelos animales de cáncer de mama, colon y melanoma, este proceso es mediado preferencialmente por las CTCs más agresivas, como por ejemplo aquellas que muestran más tropismo metastásico por el hueso, pulmón o cerebro. Se ha observado también que la interleukina (IL)-6 y la IL-8 producida por los tumores atraen las CTCs mientras que las MMP1-collagenasa-1 y fascin 1, un componente de la actina del citoesqueleto, median la infiltración de CTCs en los tumores mamarios. Como rasgo diferencial, estas células que tienen capacidad de 'auto sembrado' solo colonizan tumores pre-existentes, no localizaciones intactas, y por lo tanto parece que estas células necesitan una cierta adaptación para crecer en lugares anatómicos que están previamente establecidos. Este fenómeno podría explicar la relación entre el tamaño tumoral, vascularidad, pronóstico y recaídas locales después de que el tumor primario haya sido completamente extirpado(43). Enderling *et al*; mediante el uso de un modelo matemático experimental sugirieron que la capacidad de las células tumorales para 'auto metastatizar' es el factor más importante para la progresión tumoral y se ve afectado por el equilibrio entre proliferación celular, migración celular y muerte celular(60). Otra observación reciente de Ginester, *et al*; demostró que al menos parte de las células madre del cáncer sobreexpresan el receptor de quimioquina CXCR1 y su bloqueo *in vitro* se asocia con una reducción de metástasis sistémicas(61). Esta observación parece apoya los datos experimentales previos y propone una nueva diana terapéutica para la enfermedad metastásica (61).

El papel de las CTCs en la progresión tumoral también se asocia a la diseminación de la resistencia a los tratamientos. En pacientes con cáncer de pulmón metastásico, se han aislado CTCs con mutaciones adquiridas durante el tratamiento con inhibidores de EGFR(62). Los pacientes con este tipo de tumor presentan progresión de la enfermedad en múltiples localizaciones a la vez y se cree que estas

metástasis podrían tener el mismo tipo de resistencia (mutaciones). Una posible explicación para este tipo de progresión sería que las CTCs con la mutación adquirida fueran las responsables de la progresión de la enfermedad resistente.

Otra de las características de las CTCs es que todas no tienen la misma capacidad de generar metástasis(55, 56). Una observación muy importante proviene de pacientes (ovario, mama o pulmón) con ascitis y a las que se les ha tratado con un *shunt* peritoneo-venoso para aliviar los síntomas asociados a la ascitis. Este líquido ascítico es infundido directamente al sistema venoso y suelta billones de células tumorales a la circulación sistémica cada semana durante meses. Las autopsias de seguimiento de estos pacientes mostraron que la mayoría de las pacientes no tenían metástasis en ningún otro órgano y solo se encontraron algunos pequeños depósitos, indicando algún grado de colonización de las células procedentes del shunt. Otros pacientes presentaron más metástasis en los mismos órganos donde previamente tenían metástasis. Ninguno de estos pacientes presentó ningún síntoma asociado a los nuevos depósitos tumorales y todas murieron debido a su tumor original inoperable y en progresión(63).

Estos hallazgos apoyan el concepto de que las CTCs son muy heterogéneas y con diferente capacidad para diseminar, colonizar y formar metástasis clínicamente significativas. Debemos también tener en cuenta que el microambiente en el órgano receptor en las localizaciones distantes puede influenciar la capacidad de las CTCs para crecer allí después de su extravasación(30, 31).

### **1.8 Implicaciones clínicas y terapéuticas**

La detección de CTCs en pacientes con tumores sólidos como en pacientes con cáncer de mama, próstata y colon, ha recibido mucha atención durante los últimos 10 años (64-66). La posibilidad de recoger muestras secuenciales de sangre periférica para monitorizar a tiempo real la eficacia de tratamientos sistémicos proporciona la oportunidad del desarrollo de nuevos biomarcadores. Además la caracterización molecular de las CTCs podría contribuir a un mejor conocimiento de la biología de las

metástasis y de nuevas dianas moleculares susceptibles de ser tratadas con tratamientos dirigidos. Uno de los descubrimientos más relevantes hasta el momento proveniente del estudio fenotípico/genotípico de las CTCs, es la identificación de una fracción de CTCs con propiedades de células madre del cáncer(67, 68).

Aislar, enumerar y caracterizar CTCs tiene implicaciones clínicas conocidas y los resultados de todos los estudios que están actualmente en marcha muy probablemente expandirán aún más el conocimiento en el campo. Durante los últimos años, se han publicado los resultados de varios estudios clínicos que han tenido como objetivo determinar la utilidad de las CTCs como factor pronóstico en el cáncer de mama(64-66, 69, 70). Aunque se han utilizado diferentes estrategias para la detección de las CTCs, en la mayoría de los estudios se usaron métodos que enriquecen las muestras usando antígenos epiteliales, como por ejemplo EpCAM, y/o la definición de CTCs como células epiteliales. Una de las limitaciones de este tipo de metodologías es que infraestima las CTCs con un fenotipo completo de TEM (71), las cuales, pueden adquirir propiedades de célula madre y conferir resistencia a la quimioterapia y radioterapia(44).

En estos estudios, debido a las diferencias en los métodos y marcadores utilizados para la detección de CTCs, se detectan diferentes subpoblaciones de CTCs que no necesariamente se solapan (72). Por lo tanto, todos los datos que existen sobre su valor clínico y expresión de marcadores deben interpretarse en el contexto del método de detección utilizado. A pesar de todas las limitaciones, la mayoría de los trabajos han mostrado que la presencia de las CTCs se asocia a peores resultados clínicos de los pacientes.

El sistema *Cellsearch*<sup>™</sup> (Veridex Corporation, Warren, NJ, USA) es el único sistema de detección de CTCs aprobado por la FDA y con el que se ha obtenido la información clínica más robusta con resultados reproducibles entre diferentes laboratorios. En la siguiente sección se describirán los resultados de los estudios clínicos realizados con el uso de esta metodología. Cristofanilli *et al* (64), mostraron que el número de CTCs detectadas antes de empezar una nueva línea de tratamiento mediante el sistema *Cellsearch*<sup>™</sup> es un factor pronóstico independiente de supervivencia libre de progresión (SLP) y

supervivencia global (SG) en pacientes con cáncer de mama metastásica. Aquellas pacientes con  $\geq 5$  CTCs por 7.5 ml de sangre periférica tienen una SLP y SG inferior en comparación con aquellas pacientes con  $< 5$  CTCs (2.7 meses y 10 meses versus 7 meses y  $>18$  meses para SLP y SG, respectivamente;  $p<0.001$ ). Además, el recuento de CTCs en el momento de la primera visita de seguimiento también mostró un valor pronóstico similar(73). La utilidad pronóstico de las CTCS ha sido independientemente confirmada por diferentes grupos(74-76). Además, la supervivencia global fue superior en pacientes con  $< 5$  CTCs en 7.5 ml independientemente del tipo histológico, el estado de los RH y el estado de HER2, así como, de si el paciente debuto con enfermedad metastásica o recayó (64). El valor pronóstico fue también independiente de la línea de tratamiento (primera línea versus segunda línea de tratamiento), localización metastásica (por ejemplo enfermedad visceral vs hueso y tejido blando), o subtipo de cáncer de mama. Recientemente, se ha demostrado que la detección de CTC en la primera visita de seguimiento de pacientes con cáncer de mama metastásica, puede predecir mejor el pronóstico de estas pacientes que evaluando la respuesta con FDG-PET y/o CT(77).

Mientras que el valor pronóstico de las CTCS se ha demostrado en el cáncer de mama metastásica en pacientes tratadas con quimioterapia o tratamientos hormonales convencionales, el reto es ahora determinar este valor pronóstico en el contexto de tratamientos con agentes biológicos y terapias dirigidas que afectan directamente la célula tumoral (trastuzumab) o modifica el microambiente (bevacizumab) ya que puede influenciar procesos como la intravasación, la extravasación o el aclarado de las CTCs. De hecho, hay datos recientes que sugieren que las CTCs en pacientes tratadas con antiangiogénicos (78, 79), o con terapias dirigidas contra HER2(80) tienen un valor pronóstico limitado.

En cambio, se ha confirmado el valor pronóstico de las CTCS en los estadios tempranos de cáncer de mama. La mayoría de estudios han usado  $> 1$  CTCs como punto de corte para discriminar grupos pronóstico (dado el bajo ratio de detección de CTCs en la enfermedad precoz en comparación con la enfermedad metastásica). En el ensayo clínico más extenso evaluando el tratamiento adyuvante realizado hasta el momento participaron 1489 pacientes con cáncer de mama con alto riesgo de recaída o ganglios positivos se obtuvieron y analizaron 23 ml de sangre periférica antes y después de la quimioterapia (basada en taxanos)(69). En el 9.4% de los pacientes se detectaron  $>1$  CTCs antes de

empezar la quimioterapia, y en un 8.7% se detectaron >1 CTCs después del tratamiento quimioterápico. Aquellas pacientes con CTCs positivas antes del tratamiento tenían más ganglios linfáticos positivos al diagnóstico; sin embargo, no hubo correlación con el tamaño tumoral, el grado tumoral o el estado de los RH. Con una mediana de seguimiento de 32 meses, la presencia de > 1 CTCs antes del tratamiento fue un factor pronóstico significativo con respecto a la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y la SG. La presencia de > 1 CTCs después de la quimioterapia solo predijo la SLE(69).

En aquellas pacientes que reciben tratamiento neoadyuvante, la presencia de CTCs antes de la quimioterapia también mostró ser un factor pronóstico independiente de respuesta, supervivencia libre de metástasis y SG, mientras que la presencia de CTCs después del tratamiento quimioterápico fue menos significativa (81, 82).

La información pronóstico que las CTCs proporcionan puede que no esté solo limitada al número de células aisladas en las pacientes, sino también a las características de las CTCs. Uno de los aspectos más prometedores del estudio de las CTCs en una amplia variedad de tumores, es su caracterización fenotípica/genotípica. Esto permitiría la identificación de dianas terapéuticas (por ejemplo, en el caso del cáncer de mama la expresión de RH, HER2 o EGFR) y permitir la monitorización a tiempo real de estos marcadores en CTCs y a su vez, de los tratamientos sistémicos.

Tradicionalmente los tratamientos sistémicos que se administran de forma adyuvante o neoadyuvante a las pacientes con cáncer de mama se seleccionan en función de la expresión de los RH y HER2 (entre otros factores) en el tumor primario. Sin embargo, en el caso de la enfermedad operable, la diana de los tratamientos adyuvantes y en parte de los tratamientos neoadyuvantes es la enfermedad mínima residual representada por las CTCs y las células tumorales diseminadas (DTC). La accesibilidad y la posibilidad de análisis secuenciales de sangre hace de la caracterización de las CTCs un marcador que está ganando más y más interés en los estos estadios cuando la enfermedad tiene más posibilidades de ser curada.

Se ha estudiado y documentado ampliamente discordancias entre el estado de los RH y HER2 entre el tumor primario y las CTCs el cáncer de mama metastásica. Hasta el momento se desconoce el significado de estos hallazgos o si tienen alguna repercusión en la respuesta/resistencia a tratamientos, sin embargo, estos hallazgos podrían acarrear implicaciones clínicas muy importantes. Por este motivo, el primer objetivo de esta tesis es determinar la expresión de los RH y EGFR, así como la amplificación de HER2 en CTCs de pacientes con cáncer de mama operable.

En las siguientes secciones se revisara el conocimiento acumulado sobre las características moleculares de la CTCs principalmente de pacientes con cáncer de mama avanzado, contexto en los que se ha estudiado con más detalle la enfermedad tumoral circulante.

### ***1.9 Caracterización de biomarcadores en CTCs en pacientes con cáncer de mama***

#### **▪ *Receptores Hormonales***

El subtipo más común de cáncer de mama es el luminal A y representa el 50-60% de todos los cánceres de mama(83). Estos tumores se caracterizan por la expresión alta de receptores de estrógeno alfa (RE) y se asocian con un relativo buen pronóstico(83). Los tumores luminal B representan un 10-20% de todos los tumores malignos de mama y se caracterizan por la expresión de RE, receptor de progesterona (RP) y/o HER2. Frecuentemente representa un fenotipo más agresivo con grado tumoral más alto(5).

La expresión del RE en el tumor primario es evaluada mediante inmunohistoquímica (IHC) y la definición de un tumor con el RE positivo o RP positivo se basa en la presencia de al menos un 1% o más de células tumorales positivas para el RE o RP, respectivamente (84). La expresión del RE y/o RP media la sensibilidad de estos tumores a los tratamientos hormonales como el tamoxifeno o los inhibidores de la aromatasa. Aunque se ha demostrado claramente la eficacia de los tratamientos endocrinos para mujeres con tumores con RH positivos –tanto estadios precoces como metastásicos - se ha observado que este tratamiento no es eficaz en aproximadamente un 25-30% de pacientes (85-87). Son múltiples los mecanismos de resistencia asociados al fallo de los tratamientos endocrinos. Por ejemplo, la pérdida

de expresión del RE o el funcionamiento disfuncional de la vía de señalización del RE debido a cambios genéticos o epigenéticos –hipermetilación del promotor de *ERS1*, expresión de isoformas del RE truncadas o modificaciones post-translacionales- se han asociado a la resistencia a tratamientos hormonales (88). Otros mecanismos independientes del RE son la alteración del ciclo celular o de las moléculas relacionadas con las vías de supervivencia celular(86).

Como se ha mencionado anteriormente, el cáncer de mama se considera RH positivo si el tumor primario muestra reactividad nuclear de cualquier intensidad del RE o RP en  $\geq 1\%$  de las células estudiadas mediante IHC. Por lo tanto, no se debe necesariamente esperar que las CTCs procedentes de tumores de mama RH positivos también sean RE o RP positivas. Las CTCs que no expresan RH pueden haberse originado de la fracción de células del tumor primario negativas(89) o de clones con los RH negativos generados bajo la presión de un tratamiento hormonal(90). La aparición de las CTCs con el RE negativo puede también ir acompañada de aberraciones genómicas y epigenómicas(91).

Dado que el tratamiento endocrino es dependiente del estado de los RH y su diana terapéutica es el RE, las discrepancias entre el estado de los RH en el tumor primario y las CTCs, además de la heterogeneidad en la expresión de RH en las CTCs podría ser una de las razones para el fallo de los tratamientos endocrinos y el desarrollo de enfermedad metastásica en aquellas pacientes con tumores operables.

Los tumores primarios están compuestos tanto de células positivas como negativas para los RH previo a cualquier tratamiento. La exposición a un tratamiento sistémico desencadena un cambio de expresión del RE de positiva a negativa entre un 2.5 y un 17% de los casos (92) y estos cambios de expresión pueden ser bidireccionales(93). En el cáncer de mama metastásico, uno de los principales mecanismos para evadir los tratamientos hormonales es la negativización del RE en los tumores (86, 91).

Estudios muy recientes han podido mostrar que el estado de los RH en el tumor primario y las CTCs originadas de este tumor no siempre coinciden y esta divergencia parece además ser un fenómeno bastante común. En la mayoría de los estudios que han interrogado este fenómeno se han utilizado métodos de análisis basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para medir la expresión de RNA mensajero en la población total de CTCs (94-96). En uno de estos estudios, Tewes *et al*; fueron capaces de predecir en un 78% de los casos la respuesta al tratamiento hormonal mediante la

evaluación del RE y del RP en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama metastásico (96). Sin embargo, no se puede evaluar la heterogeneidad intratumoral de las CTCs utilizando métodos basados en la PCR. Por lo tanto, el estudio de los RH en CTCs individuales podría ser importante para describir mejor las características de la enfermedad mínima residual y su asociación a la resistencia a tratamientos hormonales. Hasta el momento, solamente un estudio evaluando pacientes con cáncer de mama metastásico con RE-positivo, ha mostrado que la expresión del RE evaluado mediante inmunocitoquímica en CTC frecuentemente es negativa (69% de los casos) y con una considerable heterogeneidad inter-paciente (97).

Otras situaciones clínicas en las que sería útil la re-evaluación de los RH y potencialmente guiar la selección de los tratamientos sistémicos sería en el momento de la recaída tumoral, especialmente en aquellos tumores que inicialmente eran RH positivos. El fenotipo de las CTCs podría ser el reflejo de la enfermedad metastásica y ser relevante a la hora de seleccionar un tratamiento paliativo o monitorizar este tratamiento.

- **HER2**

El cáncer de mama HER2 positivo representa un subtipo agresivo de esta enfermedad que ocurre entre el 15-20% de los pacientes(5). Estos pacientes desarrollan más frecuentemente enfermedad visceral y del sistema nervioso central que aquellos HER2-negativos(98, 99). Antes del desarrollo de las terapias dirigidas a HER2, como trastuzumab o lapatinib, este subtipo de cáncer de mama tenía un pronóstico muy pobre(100). La introducción de estos agentes ha mejorado los resultados clínicos tanto en la enfermedad precoz como avanzada(101-106). A pesar de esta mejoría, los resultados con trastuzumab como lapatinib están lejos de ser satisfactorios. Por ejemplo, incluso aquellas pacientes con tumores que sobreexpresan HER2 o que el gen *HER2* está amplificado, el beneficio de una terapia dirigida contra HER2 en monoterapia está en el rango de un 25% en la enfermedad avanzada(107). En el contexto de un tratamiento adyuvante, trastuzumab - en combinación con quimioterapia- ha demostrado en 4 estudios clínicos diferentes -incluyen más de 1300 mujeres con cáncer de mama en estadios precoces- una reducción del riesgo de recaída solamente en alrededor del 50% de la población tratada(108).

Existen al menos tres explicaciones posibles para este fenómeno. En primer lugar, las enfermas con tumores HER-2 positivos pueden ser divididas en subgrupos con diferentes grupos pronóstico y probablemente diferente sensibilidad a terapias dirigidas contra HER2. Segundo, los métodos de detección y evaluación de HER2 pueden ser inadecuados debido a las limitaciones que conllevan métodos tradicionales, subjetividad en la interpretación de los resultados y la heterogeneidad de los cánceres de mama. Y tercero, varios estudios han observado que existen discrepancias en la expresión de HER2 entre los tumores primarios y sus metástasis (109). Finalmente y en la misma línea, estas discrepancias también se han observado entre tumores primarios y las correspondientes CTCs – lo cual tiene especial relevancia en las pacientes sin metástasis(110-115). Estas inconsistencias indican que las células tumorales están en constante cambio -selección clonal- y que la detección del estado de HER2 en el tumor primario no tiene por qué reflejar el fenotipo en un momento determinado. Por lo tanto, es crítico descubrir biomarcadores mejores y métodos a tiempo real para testar el estado de HER2 y optimizar tratamientos individuales en pacientes con cáncer de mama tanto metastásica como operables.

Otro aspecto importante recae en la detección de marcadores de resistencia precoz y por lo tanto progresión de la enfermedad. Hasta el momento se han descrito múltiples mecanismos que contribuyan a la resistencia a los tratamientos dirigidos contra HER2. Por ejemplo, la sobreexpresión de la proteína HER2 truncada (p95<sup>HER2</sup>); la pérdida de gen supresor *PTEN* o mutaciones activadoras en la subunidad catalítica o reguladora de fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K) -lo cual se asocia a una regulación positiva de la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR- y la sobreexpresión del receptor *insulin-like growth factor tipo 1* están entre ellos(116).

En el caso del estudio de HER2 en CTCs, Ignatiadis *et al*; mostraron que a pesar de que se detectan CTC-HER2 positivas en pacientes con tumores primarios HER2-negativos, la mayoría de casos con CTC-HER2 positivo tienen el mismo fenotipo en el tumor primario(111). Sin embargo, un estudio multicéntrico prospectivo reportó que las CTC-HER2 positivas pueden ser detectadas en un número relevante de pacientes metastásicas con tumores primarios HER2-negativos(117) y este hallazgo ha sido confirmado por otros grupos(118, 119). Por ejemplo, Punnoose *et al*; publicaron que existe concordancia entre el

estado de HER2 en CTCs y el correspondiente tumor primario en la mayoría de pacientes metastásicas (89%), aunque un 11% de pacientes presentaron diferentes fenotipos/genotipos (120).

Dado la creciente evidencia de que el estado de HER2 puede cambiar durante la recaída o la progresión del cáncer de mama, la re-evaluación del estado de HER2 en CTCs es una estrategia con potenciales implicaciones clínicas y terapéuticas. En la actualidad, las pacientes con tumores primarios HER2-negativos y CTCs-HER2 positivas bien en el momento del diagnóstico o en el de la recaída, no optan a tratamientos dirigidos a HER2. Por lo tanto, existe un interés en caracterizar correctamente HER2 en CTCs y validar en estudios clínicos su importancia clínica y como biomarcador en la selección de tratamientos.

- ***EGFR y componentes de la vía de señalización PI3K $\alpha$ /PTEN/AKT***

La vía de señalización EGFR/PI3K/PTEN/AKT juega un papel muy importante en la transformación maligna, la resistencia a tratamientos anti-tumorales y los procesos de metastatización. Esta vía esta alterada con cierta frecuencia en el cáncer de mama debido a mutaciones o la expresión aberrante de sus componentes. Con especial relevancia para esta tesis cabe destacar que el EGFR está involucrado en le loop paracrino en que la producción de *epidermal growth factor* (EGF) por parte de los macrófagos asociados al tumor incrementan la invasividad y la migración de las células de cáncer de mama(121).

Existe mucha menos datos sobre la detección de EGFR y los componentes de la vía de señalización PI3K $\alpha$ /Akt en CTCs. Sin embargo, la disponibilidad de fármacos como lapatinib- un inhibidor reversible de EGFR y de HER2 aprobado para el tratamiento del cáncer de mama metastásico HER2-positivo(105) y su relevancia en la adquisición de resistencia tu fármacos dirigidos contra HER2 y terapias endocrinas, refuerza la necesidad de investigar su estado en CTCs. Otro ejemplo de la importancia de la caracterización del EGFR en CTCs en cáncer de mama se ilustró con la publicación de un caso clínico. El beneficio clínico que la paciente alcanzó con lapatinib se correlacionó con la erradicación de CTCs que sobrepresaban EGFR y la respuesta tumoral (122).

Hasta el momento, al menos dos estudios han estudiado la expresión del EGFR o componentes de la vía de señalización PI3K $\alpha$ /PTEN/AKT en CTCs mediante diferentes metodologías(123, 124) y en un estudio clínico se ha correlacionado la actividad de genitinib-un inhibidor del EGFR- con la desaparición de las CTCs-EGFR-positivas en pacientes con cáncer de mama metastásico (125).

Cabe destacar que en los estudios descriptivos publicados se han observado también divergencias similares para el EGFR que las encontradas con el RE, RP y HER2 (123). En uno de los estudios se caracterizó la expresión de EGFR, HER2, PI3K $\alpha$  y AKT en CTCs de pacientes con cáncer de mama tanto metastásico como precoz. Este grupo confirmó que las CTCs expresan tanto receptores de membrana como quinasas parte de la vía de señalización EGFR-HER2/PI3K/Akt (123). La expresión de PI3K y AKT fosforilado fue similar (  $\approx$  80%) tanto en enfermas metastásicas como precoces, en cambio, la expresión de EGFR fosforilado se observó en el 33% de pacientes con tumores precoces y en el 86% de pacientes con tumores metastásicos (123). En la misma línea, la expresión de marcadores de célula madre ADLH1 y otros marcadores de TEM como TWIST1, AKT2 o PI3K $\alpha$  fueron estudiados en CTCs de 502 pacientes exclusivamente con cáncer de mama localizado. En 29% de las pacientes expresaban al menos un marcador de TME y un 14% expresaban ALDH1, sin embargo, no se pudo demostrar ninguna correlación con los marcadores pronósticos clásicos (124).

- **Marcadores de TEM y de célula madre en CTCs**

El proceso de TEM y la adquisición de propiedades de células madre por parte de las células tumorales están íntimamente ligados(45). Durante la última década se ha observado en varios trabajos que TEM genera CTCs con características fenotípicas mesenquimales.. Uno de los trabajos iniciales fue presentado por Aktas, *et al*; en el que evaluaron la expresión de marcadores asociados a la TEM en CTCs (TWIST1, AKT 2 y PI3K $\alpha$ ) de pacientes con cáncer de mama metastásico – mediante una metodología basada en la transcripción reversa (RT)-PCR con un paso de pre-enriquecimiento de la muestra con células EpCAM-positivas(67). En este estudio, 62 % de las CTCs fueron positivas para al menos un marcador asociado a la TEM(67). Otros estudios han mostrado que el EGFR fosforilado, HIF1 $\alpha$ , HER2 y las quinasas de señalización PI3K/AKT se expresan en CTCs, a la vez que estas vías de señalización puede regular el

proceso de TEM (118, 123, 126-128). Sin embargo, en los estudios mencionados se utilizaron marcadores epiteliales para la detección de CTCs; por lo tanto, es más que probable que algunas de las células aisladas en estos estudios solo tenga un fenotipo parcial de TEM.

Se han publicado estudios más recientes en pacientes con cáncer de mama precoz en los que se relacionan la adquisición de un fenotipo mesenquimal en CTC y peores resultados clínicos. Por ejemplo, Serrano *et al*; han reportado que aquellas CTCs con fenotipo mesenquimal (Vimentina y Slug positivas) co-expresan EGFR sugiriendo que la activación de esta quinasa está involucrada en el proceso de TEM. Además, el mismo fenómeno se reprodujo en un modelo pre-clínico con una línea celular de cáncer de mama mostrando que la inducción del proceso de TEM mediante la estimulación del EGFR por su ligando está relacionado con la pérdida de CK por parte de las células tumorales, así como, la inhibición de la apoptosis (datos aceptados para publicación). Otro trabajo relevante mostró en 11 pacientes con cáncer de mama en las cuales monitorizaron de forma secuencial sus CTC, que la adquisición de un fenotipo mesenquimal está directamente asociado a la progresión de la enfermedad neoplásica. Las CTC con fenotipo mesenquimal se detectaron de forma aislada o en *clusters* multicelulares. Estas células expresaban conocidos reguladores del proceso de TEM como son componentes de la vía de señalización del *transforming growth factor* (TGF)- $\beta$  y el factor de transcripción FOXC1(129).

Tal como ya se ha mencionado, el proceso de TEM está asociado a la adquisición de marcadores de célula madre(45) y algunos estudios han documentado la expresión de estos en parte de las poblaciones de CTCs (67, 68). Reuben, *et al*; mostraron que más del 60% de CTCs expresan NOTCH1, un gen asociado con la auto-renovación de células iniciadoras de cáncer (68). De la misma forma, casi 70% de las CTCs expresan ALDH1, otro gen asociado con células madre tumorales(67, 95). La expresión de este marcador en CTCs también se ha relacionado con la resistencia a tratamiento anti-tumorales en cáncer de mama metastásico (67, 130). A pesar de las dificultades técnicas, combinaciones de marcadores típicos de un fenotipo de célula madre –  $CD44^+/CD24^{-/low}/Lineage^-$  y  $ALDH1^{high}/CD24^{-/low}$  – también se han descrito en CTCs (131).

Otra característica que otros grupos han postulado es que las células madre de cáncer de mama son típicamente son triple negativo (RH y HER2 negativos)(132). En un pequeño estudio que evaluó las CTCs en pacientes con cáncer de mama precoz objetivaron que la mayoría de las CTCs fueron triple negativas independientemente del fenotipo del tumor primario. Estos datos sugieren una continuidad en el desarrollo de los fenotipos de las CTCs desde un fenotipo de diferenciación epitelial total a un fenotipo mesenquimal, incluyendo aquellas pacientes con un fenotipo de TEM parcial – coexpresión de marcadores epiteliales y mesenquimales.

CD133 ha sido también reconocido como un indicador de células madre tumorales en diferentes tipos de neoplasias(133-135). Este marcador no ha se ha caracterizado muy extensamente en cáncer de mama, sin embargo; se ha descrito en modelos preclínicos que aquellas células de cáncer de mama BRCA1 positivas que expresan CD133 tienen capacidad de regeneración y formación de tumores (136). Además, estas células que expresan CD133, presentan mayor expresión de genes asociados a células madre como por ejemplo Notch1, ALDH1, Fgfr1 y Sox1(136). Otro modelo preclínico, mostró que aquellos xenógrafos con células capaces de iniciar tumor y con capacidad ilimitada de regeneración estaban enriquecidos con un fenotipo  $CD44^{pos}CD49^{hi}CD133/2^{hi}$ (137). CD44 y CD133 están también sobreexpresados en mamosferas derivadas de tejido tumoral mamario y líneas celulares(138, 139).

Otras funciones adicionales asociadas a células CD133 positivas son, en primer lugar, propiedades migratorias mediante la promoción del proceso de TME – a través de la vía de señalización Hedgehog- (140-142) y la facilitación del evento de ‘*vasculogenic mimicry*’ (VM)- proceso de vascularización alterativo en el que tanto las células tumorales epiteliales como las células endoteliales participan en el proceso de neovascularización(143). Los genes asociados a este proceso de vascularización forman parte de las vías de señalización relacionadas con la hipoxia, propiedades de células madre y la vascularización(143). Otros autores también han asociado las células tumorales CD133 positivas (con características de célula madre) con el proceso de VM en cáncer de mama triple negativo(144). Todos estos datos preclínicos que posicionan a las células CD133+ como potenciales células madre tumorales y parte de eventos biológicos relacionados con la diseminación tumoral, recalcan la importancia de la caracterización de este marcador en CTCs de pacientes con cáncer de mama.

En resumen, las CTCs tienen un papel importante en la diseminación y la progresión de los tumores. Estas poblaciones de células tumorales -raramente aisladas en el torrente sanguíneo- son muy heterogéneas y su estudio está aún en estadios muy tempranos especialmente en los pacientes no metastásicas. Su caracterización muy probablemente acarreará grandes avances para el desarrollo de tratamientos dirigidos a dianas terapéuticas y en la monitorización de la respuesta a este tipo de terapias y a otras más clásicas.

## II. HIPÓTESIS

**Esta tesis doctoral consta de dos hipótesis:**

- La expresión del RE, RP y EGFR y el estado del gen de *HER2* y *TOPA2* en CTCs de pacientes con tumores localizados de cáncer de mama es discordante respecto al tumor primario de origen.
- Asumiendo que el proceso de metastatización requiere de la diseminación de células tumorales procedentes del tumor primario con propiedades de células madre y que la estas células confieren cierta resistencia a drogas, hipotetizamos que la expresión de marcadores de células madre en CTCs podría ser relevante y tener un papel como biomarcador predictor de resistencia a tratamientos anticancerosos.

## III. OBJETIVOS

- El primer objetivo del trabajo de tesis es evaluar la expresión del RE, RP y EGFR en CTCs y en el tumor primario de pacientes con cáncer de mama localizado que han recibido un tratamiento radical (cirugía  $\pm$  radioterapia  $\pm$  tratamiento sistémico [quimioterapia y/o tratamiento endocrino y/o trastuzumab]) utilizando IHC. El objetivo de estudiar si las

subpoblaciones de células tumorales circulantes reproducen el mismo fenotipo que las del tumor primario.

- El segundo objetivo del trabajo de tesis es evaluar el estado de los genes *HER2* y *TOPA2* en el tumor primario de pacientes con cáncer de mama localizado que han recibido un tratamiento radical (cirugía ± radioterapia ± tratamiento sistémico [quimioterapia y/o tratamiento endocrino y/o trastuzumab]) utilizando fluorescence in situ hybridization (FISH). objetivo de estudiar si las subpoblaciones de células tumorales circulantes reproducen el mismo genotipo que las del tumor primario.
  
- Como parte de los objetivos I y II, se correlacionaron los hallazgos en las CTCs con las características clínico-patológicas del tumor primario y los subtipos de cáncer de mama. Además, se estudian si existen cambios en el fenotipo/genotipo de CTCs en muestras obtenidas antes y después de un tratamiento sistémico.
  
- El tercer objetivo del trabajo de tesis es determinar la expresión de CD133 en CTCs de pacientes con cáncer de mama localizado que han recibido un tratamiento radical (cirugía ± radioterapia ± tratamiento sistémico [quimioterapia y/o tratamiento endocrino y/o trastuzumab]). Como parte de este objetivo, se evaluó su papel potencial de las CTCs-CD133 positivas en la resistencia a drogas mediante el estudio de muestras obtenidas antes y después de un tratamiento sistémico.

#### **IV. TRABAJOS**

RESEARCH ARTICLE

Open Access

## Biomarkers characterization of circulating tumour cells in breast cancer patients

Rosa Nadal<sup>1,2</sup>, Ana Fernandez<sup>3</sup>, Pedro Sanchez-Rovira<sup>3,4</sup>, Marta Salido<sup>1</sup>, María Rodríguez<sup>1</sup>, José Luis García-Puche<sup>3</sup>, Marta Macià<sup>5</sup>, Josep Maria Corominas<sup>1</sup>, Miguel Delgado-Rodríguez<sup>6</sup>, Lucas Gonzalez<sup>6</sup>, Joan Albanell<sup>5</sup>, Mónica Fernández<sup>3</sup>, Francesc Solé<sup>1,2</sup>, José Antonio Lorente<sup>3,7\*</sup> and María José Serrano<sup>3\*\*</sup>

### Abstract

**Introduction:** Increasing evidence supports the view that the detection of circulating tumor cells (CTCs) predicts outcomes of nonmetastatic breast cancer patients. CTCs differ genetically from the primary tumor and may contribute to variations in prognosis and response to therapy. As we start to understand more about the biology of CTCs, we can begin to address how best to treat this form of disease.

**Methods:** Ninety-eight nonmetastatic breast cancer patients were included in this study. CTCs were isolated by immunomagnetic techniques using magnetic beads labelled with a multi-CK-specific antibody (CK3-11D5) and CTC detection through immunocytochemical methods. Estrogen receptor, progesterone receptor and epidermal growth factor receptor (EGFR) were evaluated by immunofluorescence experiments and HER2 and TOP2A by fluorescence in situ hybridization. We aimed to characterize this set of biomarkers in CTCs and correlate it with clinical-pathological characteristics.

**Results:** Baseline detection rate was 46.9%  $\geq 1$  CTC/30 ml threshold. CTC-positive cells were more frequent in HER2-negative tumors ( $p = 0.046$ ). In patients younger than 50 years old, HER2-amplified and G1-G2 tumors had a higher possibility of being nondetectable CTCs. Heterogeneous expression of hormonal receptors (HRs) in samples from the same patients was found. Discordances between HR expression, HER2 and TOP2A status in CTCs and their primary tumor were found in the sequential blood samples. Less than 35% of patients switched their CTC status after receiving chemotherapy. EGFR-positive CTCs were associated with Luminal tumors ( $p = 0.03$ ).

**Conclusions:** This is the largest exploratory CTC biomarker analysis in nonmetastatic BC patients. Our study suggests that CTC biomarkers profiles might be useful as a surrogate marker for therapeutic selection and monitoring since heterogeneity of the biomarker distribution in CTCs and the lack of correlation with the primary tumor biomarker status were found. Further exploration of the association between EGFR-positive CTCs and Luminal tumors is warranted.

### Introduction

Breast cancer (BC) is the most frequently diagnosed malignancy in women [1]. Despite considerable advances in early detection, diagnosis, and treatment, BC is among the leading causes of cancer-related deaths in women because of recurrent metastatic disease.

Understanding the molecular profile of BC is becoming ever more relevant to patient care. Molecular subtypes were first described by Perou and colleagues [2,3], who mapped the phenotypic diversity to a specific gene expression pattern. An immunohistochemistry (IHC) profile based on the degree of expression of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and human epithelial growth factor receptor 2 (HER2) similarly identifies subgroups of BC patients who will have similar gene expression patterns and clinical outcomes [3-5]. Subsequently, subgroups (within major groups) that have been defined as ER<sup>+</sup>, PR<sup>+</sup>, and HER2<sup>-</sup> tumors that

\* Correspondence: mjose.serrano@genyoes

† Contributed equally

<sup>3</sup>Pfizer-University of Granada-Andalusian Government Center of Genomics and Oncology (GEHyO), Avenida de la Ilustración, 114, Granada, ES-18007, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

express cytokeratin (CK) 5/6 proteins or epidermal growth factor receptor (EGFR) or both represent another distinctive BC tumor subtype known as the core basal phenotype, which is associated with a worse prognosis [6]. Moreover, EGFR is considered essential in cancer cell migration and the intravasation process [7,8]. Therefore, we were interested in exploring the expression of EGFR in circulating tumor cells (CTCs) of patients with BC.

Subsequent studies showed differences in prognosis and differences in their response to therapeutic agents with respect to the subtype in specific cohorts of patients [4,5]. In addition to clinical and pathological factors currently used to guide prognosis and treatment, new evidence regarding the association of topoisomerase 2 $\alpha$  (*TOP2A*) gene alterations and an increase in responsiveness to anthracycline-containing regimens has been reported [9,10]. However, no studies have evaluated the *TOP2A* status in CTCs. These biomarker profiles do not guarantee a response to systemic therapy, and a fraction of patients will receive the established or investigational therapies without deriving any benefit. The presence of CTCs in the peripheral blood of non-metastatic BC patients has been associated with worse clinical outcomes [11-13]. In addition, there is increasing evidence of discrepancies between ER, PR, and HER2 expression in CTCs and the corresponding primary tumors, raising concern about the clinical implications of these observations [14-17]. Thus, the need to determine prognostically and therapeutically relevant markers in minimal residual disease is becoming important in order to increase personalized treatment options [18].

In this work, we sought to evaluate ER, PR, and EGFR expression and HER2 and *TOP2A* status in CTCs in a non-metastatic BC population. We further correlated the CTC findings with clinical and pathological characteristics of primary tumors and the distinct BC subtypes.

#### Materials and methods

From March 2009 to September 2010, patients with stage I to IIIC BC were identified from the Breast Cancer Unit at the Hospital del Mar and Hospital Universitario de Jaén. The inclusion criteria were histological diagnosis of BC and availability of tissue for biomarker studies. Surgical procedure and systemic therapy were selected at the discretion of the treating physician with or without targeted therapy (namely, trastuzumab) for patients with HER2<sup>+</sup> BC. Medical charts of these patients were reviewed, and clinical details of these patients were included in a database.

A total of 98 patients donated three samples of 10 mL of blood at the time of first diagnosis. If adjuvant therapy (AT) was administered, post-treatment samples were obtained after three cycles of chemotherapy. If

neoadjuvant therapy (NAT) was administered, samples were obtained at the end of treatment. For this study, we classified BC patients based on the pattern of expression of the hormone receptor (HR), estrogen and progesterone receptor, and HER2 status that identify three major distinct molecular BC subtypes [2,3]: luminal tumors, which are HR<sup>+</sup> and HER2<sup>-</sup>; HER2-amplified tumors; and those tumors that lack expression of the three receptors, known as triple-negative BC. This translational study was approved by the ethics review committees of the Hospital del Mar and Hospital de Jaén, and informed consent was obtained from all patients and healthy volunteers.

#### Assessment of tumor biomarkers

Tumor specimens from archival tumor biopsies were available for HER2 and *TOP2A* status ( $n = 98$  and  $n = 23$ ), ER and PR ( $n = 98$ ), p53 ( $n = 65$ ), and Ki-67 ( $n = 98$ ). ER and PR were routinely assessed by IHC by using 6F11 (diluted 1:40; Novocastra, Newcastle Upon Tyne, UK) and 312 (diluted 1:100) antibodies, respectively, in accordance with guidelines of the American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists [19]. Ki-67 proliferation index was assessed by using mouse monoclonal antibody MIB-1 (1:200 dilutions; Dako, Glostrup, Denmark), and the percentage of positively stained nuclei was calculated. Samples with any degree of p53 nuclear staining (clone DO-7; Novocastra Lab, Newcastle, UK) were considered positive. HER2 status was determined by IHC by using Herceptest (Dako) in all patients and was confirmed by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) when indicated - Pathvysion HER2 DNA Probe Kit from Abbott Molecular (Abbott Park, IL, USA) in two centers and PharmaDX from Dako in two centers - in accordance with current recommendations [20]. *TOP2A* status was also evaluated by FISH by using a *TOP2A/CEP17* FISH probe kit (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA). *TOP2A* amplification was considered if the *TOP2A/CEP17* ratio was 2:1 or greater. We considered polysomy 17 (p17) when cells had three or more copy numbers of centromeres for chromosome 17 per cell [21].

#### Isolation and enumeration of circulating tumor cells

Blood (30 mL) was collected from each donor into three different blood collection tubes (CellSave Preservatives Tubes; Veridex, LLC, Raritan, NJ, USA), maintained at room temperature, and processed in parallel within a maximum of 72 hours after collection in accordance with the protocol established for our group [22]. Briefly, the samples were processed by density gradient centrifugation (Histopaque 1119; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). For CTC enrichment, we used the Carcinoma Cell Enrichment and Detection kit with MACS

technology (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). CTC enrichment was performed by selective immunomagnetic cell separation, using magnetic beads labeled with a multi-CK-specific antibody (CK3-11D5), which recognizes CK 7, 8, 18, and 19. CTCs were identified by immunocytochemical methods and visualized under a direct light microscope to perform the combined cytomorphological and immunophenotypic assessment. The cytomorphological criteria proposed by Meng and colleagues [23] (for example, high nuclear/cytoplasmic ratio and cells larger than white blood cells) were used to characterize a CK<sup>+</sup> cell as a CTC. As we analyzed three different tubes of 10 mL in each sample, we determined a case to be CTC<sup>+</sup> if at least one CTC was isolated in at least one of the three tubes. Therefore, patients were considered CTC<sup>+</sup> if at least one CTC<sup>+</sup> was captured in one tube of 10 ml of blood of the 30 ml of blood analyzed.

#### Cell cultures and molecular biomarker assay feasibility

BC cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). In the analysis of recovery experiments, we analyzed control samples with high-level control numbers (2,000, 100, and 50 cells) from two human BC cell lines, MCF-7 and SKBR3, and with low level control numbers (10 and 5 cells and 1 cell) from four human BC cell lines: MCF-7, SKBR3, MDA-MB231, and T47D. Cells were spiked in 10 mL of venous blood from healthy volunteers, and control experiments were performed at least in triplicate. Cytospins were prepared afterward by density gradient centrifugation and immunomagnetic selection as per patient's samples. In our spiking experiments, recovery rates of tumor cells spiked into normal blood at the high-level control numbers were in the range of 40% to 60% and at the low level control numbers as shown in Supplementary Table S1 of Additional file 1. As negative controls, 16 blood samples from healthy volunteers without evidence of an epithelial malignancy were examined. Peripheral blood was drawn from the middle of vein puncture after the first 10-mL of blood were discarded. This precaution was undertaken in order to avoid contamination of the sample with epithelial cells from the skin during sample collection and to ensure a high specificity of the method. No CK<sup>+</sup> cells could be identified in these samples.

We next tested the technical feasibility of using, in assay, isolated CTCs that are more commonly used for biomarker assessment: protein expression by immunofluorescence (IF) and DNA amplification by FISH. Positive controls were created by using decreasing numbers of cells from BC cell lines spiked in blood from healthy volunteers, and cytopins were prepared as described above. For negative controls, blood from healthy volunteers was used and the primary antibody was omitted.

We tested whether ER, PR, and EGFR expression could be accurately determined by IF in CTCs by using the human BC cell line MCF-7; MDA-MB231 and SKBR3 as positive controls (Figure 1a). Using an anti-ER, -PR, and -EGFR antibody, we evaluated the expression seen in CTCs by the presence or absence of staining [24]. *HER2* and *TOP2A* gene amplifications of BC cell lines were determined by FISH by using *HER2/TOP2A/CEP17* probes. Tumor cells from SKBR3 (2,000, 100, and 50 cells) were spiked into whole blood, and cytopins were prepared under conditions identical to those of patient samples. Cells were analyzed for *HER2* and *TOP2A* amplification according to standard criteria as described above for primary tumors. Absolute and relative copy numbers of *HER2* and *TOP2A* genes in SKBR3 and MCF-7 cells after immunomagnetic separation from blood samples and fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics as a tool for investigation of neoplasms (FICTION) analyses are shown in Supplementary Table S2 of Additional file 2.

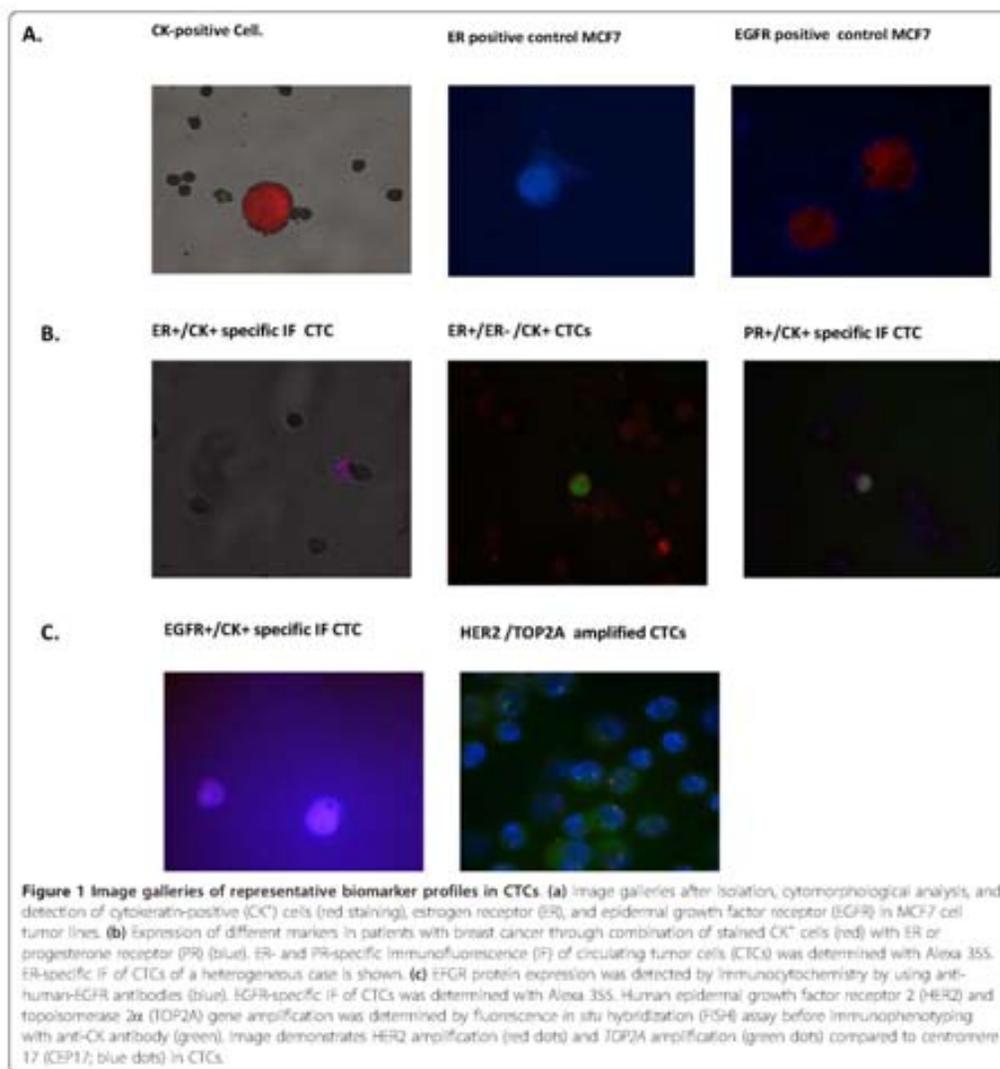
#### Characterization of ER, PR, and EGFR in circulating tumor cells

CK<sup>+</sup> and EGFR<sup>+</sup> cells were identified by IHC, and the signal was detected by chromogenic and fluorescent detection, respectively. CK-expressing cells were revealed by incubation with freshly prepared Fast Red TR/Naphthol AS-MX substrate solution (Sigma-Aldrich). Slides were washed once with phosphate-buffered saline and stained with Mayer's hematoxylin solution (Sigma-Aldrich). EGFR-expressing cells were revealed by incubation with primary monoclonal anti-human EGFR (Dako) diluted 1:25, followed by incubation with Alexa fluor 355 (Molecular Probes, now part of Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). Epithelial tumor cells were identified and enumerated on the basis of their red staining for CK<sup>+</sup> cells and blue staining for EGFR<sup>+</sup> cells.

Slides positive for CK<sup>+</sup> cells were then stained with ER and PR rabbit anti-human primary antibodies and afterward with the corresponding anti-rabbit secondary antibodies labeled with Alexa fluor 488 for double- or triple-IF experiments following the laboratory requirements. Specific staining can easily be distinguished by the differential intracellular distribution of the examined molecules and the combination of direct and indirect IF in order to evaluate Ck<sup>+</sup>/ER and CK<sup>+</sup>/EGFR/PR (Figure 1b, c).

#### Characterization of *HER2* and *TOP2A* amplification in circulating tumor cells

*HER2* and *TOP2A* amplification was determined by FISH. The *TOP2A/HER2/CEP17* multi-color probe includes a *TOP2A* probe labeled with platinumBright95 (green), *HER2* probe labeled with platinumBright550



(red), and chromosome enumeration probe *CEP17* labeled with platinumBright415 (blue) (Kreatech, Durham, NC, USA) (Figure 1c).

After incubation, dehydration, and air drying of cells, slides were co-denatured with the *TOP2A/HER2/CEP17* multi-color probe for 5 minutes at 85°C. Hybridization with the probe previously denatured for 7 minutes at 75°C was performed at 37°C. After different washing steps, slides were counterstained with 4'-6-diamidino-2-

phenylindole (DAPI) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). After FISH processing, CTCs were re-identified based on location and CK<sup>+</sup> staining, and nuclei were scored for copies of *HER2*, *TOP2A*, and *CEP17* as for primary tumors.

Identification and counting were done with a computerized fluorescence microscope (Zeiss AXIO Imager; Carl Zeiss, Jena, Germany). CK<sup>+</sup> cells were identified under a direct light microscope. After CK<sup>+</sup> cell detection

in each tube independently, samples were brought to fluorescence light to evaluate cells with expression of CK<sup>+</sup>/EGFR/RP, CK<sup>+</sup>/ER, and CK<sup>+</sup>/HER2 and TOP2A status.

#### Statistical methods

The main objectives were to investigate the status of five biomarkers in CTCs of patients with BC and to correlate this findings with clinical-pathological parameters and BC subtypes. Secondary objectives were to test changes in CTC count between inclusion and sequential samples, to evaluate the group of BC patients with non-detectable CTCs, and to evaluate the efficiency of processing three tubes with 10 mL of blood in terms of CTC count and biomarker assessment. The presence of at least one CTC per 10 mL was considered a positive result according to the reported analytic detection limit of our assay [22].

The statistical analysis was performed by using SPSS 14.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Data are expressed as means or numbers (percentages). Categorical variables were compared by Fisher exact test, and continuous variables were compared by Student *t* test. Two-tailed *P* values of less than 0.05 were considered statistically significant. Odds ratios (ORs) for the logistic model were calculated with their 95% confidence intervals (CIs) to assess the association between clinical-pathological variables and the CTC status.

## Results

#### Detection of circulating tumor cells

Ninety-eight patients with BC were enrolled in our study. Before systemic treatment, we identified CTCs in 46 out of 98 patients (46.9%). For patients in whom CTCs were detected, the mean number of CTCs present was 3.4 cells per 30 mL of blood (range of 1 to 19). After three cycles of AT, CTCs were identified in 13 out of 38 patients (34.2%), and the mean value was 2.6 cells per 30 mL (range of 1 to 7). At the end of NAT, CTCs were detected in 16 out of 35 patients (45.7%). The mean CTC count was 2.6 cells per 30 mL in peripheral blood (range of 1 to 9). In a direct comparison of the incidence of CTC detection at baseline versus the sequential blood samples, no significant differences were found (*P* = 0.30 and *P* = 0.39, respectively).

Distribution of CTC<sup>+</sup> samples in the three tubes collected and stratification according to the CTC count are shown in Figures 2a and 2b. In the baseline samples, in 56.5% of the patients, we were able to evaluate one of these phenotypes: CK<sup>+</sup>/ER, CK<sup>+</sup>/EGFR/RP, or CK<sup>+</sup>/HER2/TOP2A; in 28.3% of the patients, we were able to evaluate two of them. Although a large amount of blood was analyzed for each patient, we were able to evaluate the whole set of biomarkers in less than 16% of

the patients at any time point. Additionally, in approximately 80% of CK<sup>+</sup> samples, four CTCs or fewer were captured to perform the biomarker analysis.

#### Clinical-pathological characteristics and circulating tumor cell status

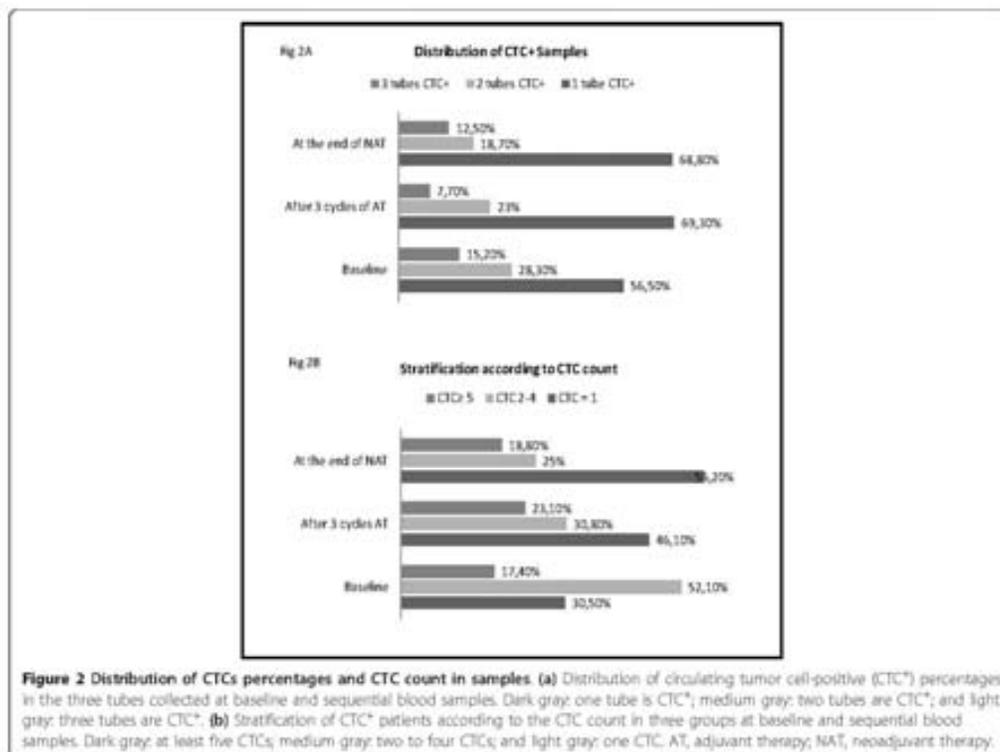
The patients' characteristics are consistent with those of an unselected early and locally advanced BC population. Main chemotherapy regimens included anthracyclines (66.3%), taxanes (54.1%), cyclophosphamide (100%), and 5-fluorouracil (66.3%). Trastuzumab was administered only to patients with HER2<sup>+</sup> tumors (14.3%). Additionally, 72.4% of patients with HR<sup>+</sup> received endocrine therapy with letrozole (44.8%), tamoxifen (23.4%), or tamoxifen (2 to 3 years) followed by exemestane (4.1%). Clinical-pathological characteristics with stratification according to the baseline CTC status are described in Table 1. Three of the 14 patients with HER2-amplified primary tumors showed CTCs<sup>+</sup>, whereas in the remaining 11 patients with HER2 amplification, we did not detect CTCs (*P* = 0.046). In contrast, no significant correlation was found between CTC status and other clinical characteristics of patients.

We attempted to look at the patients with undetectable CTCs in all of their analyzed blood samples and CTCs were not detectable in 43 (43.9%) patients. There was no statistical association between undetectable CTC status and tumor size, node status, histology, HR, Ki-67 and p53 status, or surgical procedures. However, we observed that a higher probability of patients with undetectable CTCs was recorded in patients who were younger than 50 years old (OR = 1.04, 95% CI = 1.01 to 10.8, *P* = 0.02) and had G1-G2 (OR = 6.9, 95% CI = 1.72 to 27.79, *P* = 0.006) or HER2-amplified (OR = 0.21, 95% CI = 0.05 to 0.84, *P* = 0.02) tumors.

#### Hormonal status of circulating tumor cells and corresponding primary tumors

ER expression was evaluated before any systemic treatment, and ER staining was detected in 10 (50%) of the CK<sup>+</sup> CTC samples. Heterogeneity for ER expression was found in five of 10 (50%) patients with ER<sup>+</sup> CTCs; hence, ER<sup>+</sup> and ER<sup>-</sup> CTCs were coexisting in the same sample. Among 13 patients with ER<sup>+</sup> tumors, CTCs detected before systemic therapy were analyzed for ER expression. As we expected, eight (61.5%) of these patients were classified as having ER<sup>+</sup> CTCs whereas five (38.5%) of them had ER<sup>-</sup> CTCs.

PR status in CTCs was analyzed in 27 CTC<sup>+</sup> patients, and nine (33%) had significant nuclear PR expression. Heterogeneity for PR expression was found in one (11.1%) patient. When the PR expression was correlated between CTCs and their corresponding primary tumors, CTCs from 15 (68.2%) RP<sup>+</sup> primary



tumors were classified as PR<sup>+</sup> CTCs. In contrast, only seven (31.8%) patients with PR<sup>+</sup> tumors also had PR<sup>+</sup> CTCs. It is worth noting that there was no complete correlation between ER and PR expression in CTCs and their corresponding primary tumors, respectively ( $P = 0.17$  and  $P = 0.55$ ). Moreover, ER and PR status in CTCs did not show an association with clinical-pathological baseline characteristics of patients (data not shown).

#### EGFR expression in circulating tumor cells

At baseline, EGFR<sup>+</sup> CTCs were detected in 27 (27.5%) patients. After three cycles and at the completion of chemotherapy, we detected EGFR<sup>+</sup> CTCs in five (13.9%) and four (11.1%) of the patients, respectively. No significant correlation was found between basal EGFR-CTC status and clinical-pathological characteristics of patients, including age, tumor size, nodal status, histology, nuclear tumor grade, p53 status, and Ki-67 and HER2 status. Remarkably, a higher proportion of patients with EGFR<sup>+</sup> CTCs was found in HR<sup>+</sup> patients (33.3% versus 8.7%,  $P = 0.01$ ).

#### HER2 and TOP2A status of circulating tumor cells and corresponding primary tumors

Twenty-six CTC<sup>+</sup> patients were further evaluated for *ERBB2* and *TOP2A* status by FISH in at least one CTC. Before systemic treatment, CTCs from three HER2<sup>+</sup> primary tumors were evaluated. It is of importance that none of them showed HER2 amplification in CTCs. Among patients with HER2<sup>+</sup> tumors, 24 patients were classified as having HER2<sup>+</sup> CTCs. Only one case with p17-CTCs was detected.

Among 26 CTC<sup>+</sup> patients analyzed, two cases showed *TOP2A*-amplified CTCs whereas the remaining patients had *TOP2A*<sup>-</sup> CTCs. *TOP2A* status was available in 11 corresponding primary tumors. Among patients with *TOP2A*<sup>+</sup> primary tumors, seven of them showed *TOP2A*<sup>+</sup> CTCs whereas one had *TOP2A*-amplified CTCs and another had p17-CTCs. In contrast, three *TOP2A*-amplified primary tumors had *TOP2A*<sup>-</sup> CTCs. Neither of the *TOP2A*-amplified CTC patients showed HER2 co-amplification. There was no association between HER2 or *TOP2A* CTC status and the corresponding primary tumor. In addition, baseline clinical-pathological

**Table 1** Circulating tumor cell status in relation to patient characteristics

	CTC <sup>+</sup> , number (percentage)	CTC <sup>-</sup> , number (percentage)	P value ( $\chi^2$ )
Age, years			
≤ 50	14 (41.2)	20 (58.8)	
> 50	32 (50)	32 (50)	NS
Histology			
Ductal	40 (47)	45 (53)	
Others	6 (46.2)	7 (53.8)	NS
Clinical tumor size			
≤ 2 cm	25 (54.3)	21 (45.7)	
> 2-5 cm	15 (39.5)	23 (60.5)	
> 5 cm	6 (42.9)	8 (57.1)	NS
Clinical nodal status			
cN0	28 (47.5)	31 (52.5)	
cN <sup>+</sup>	11 (34.4)	21 (65.6)	
Unknown	4 (57.1)	3 (42.9)	NS
Grade			
I	8 (38.1)	13 (61.9)	
II	15 (44.1)	19 (55.9)	
III	20 (55.5)	16 (44.5)	
Unknown	3 (42.9)	4 (57.1)	NS
Hormonal status			
HR <sup>+</sup>	35 (46.7)	40 (53.3)	
HR <sup>-</sup>	11 (47.6)	12 (52.2)	NS
HER2 status			
HER2 <sup>+</sup>	3 (21.4)	11 (78.6)	
HER2 <sup>-</sup>	43 (51.2)	41 (48.8)	0.046
p53 status			
p53 <sup>+</sup>	26 (51)	25 (49)	
p53 <sup>-</sup>	7 (50)	7 (50)	
Unknown	13 (39.4)	20 (60.6)	NS
Ki-67 percentage			
≤ 14%	20 (52.6)	18 (47.4)	
> 14%	26 (43.3)	34 (56.7)	NS

HR<sup>+</sup> indicates hormone receptor positive: estrogen receptor positive/progesterone receptor positive (ER<sup>+</sup>/PR<sup>+</sup>), ER<sup>+</sup>/PR<sup>-</sup>, or ER<sup>-</sup>/PR<sup>+</sup>. HR<sup>-</sup> indicates hormone receptor negative. A total of 98 patients were included in this study. Information on clinical nodal status was available in 91 out of 98 (92.8%) patients and information on p53 status was available in 65 out of 98 (66.3%) patients at the time of study analysis. P values were determined by chi-squared tests. All statistical tests were two-sided. CTC, circulating tumor cell; HER2, human epidermal growth receptor 2; NS, not significant.

characteristics were not linked to the HER2 and *TOP2A* status in CTCs. (data not shown).

#### Circulating tumor cell characterization after a systemic treatment

After three cycles of AT, 13 patients (34.2%) had CTCs. In the biomarker analysis, ER expression in four out of six CTC<sup>+</sup> patients was found. Notably, one of the ER<sup>+</sup> CTCs was detected in a patient who had an ER<sup>+</sup> primary tumor but no CTCs before systemic therapy. With regard to PR expression, significant PR staining was detected in three out of five CTC<sup>+</sup> patients. Interestingly, after three cycles of AT, one of the PR<sup>+</sup> CTC cases that came from a PR<sup>+</sup> tumor had PR<sup>-</sup> CTCs at baseline. EGFR<sup>+</sup> CTCs were detected in five cases; one

patient initially had EGFR<sup>+</sup> CTCs, whereas four (11.1%) cases were EGFR<sup>-</sup> at baseline.

Significantly, 25 (69.4%) cases were still classified as having EGFR<sup>+</sup> CTCs after three cycles of chemotherapy and six (16.6%) cases later were classified as having EGFR<sup>-</sup> CTCs. In addition, HER2 status and *TOP2A* status were evaluated in seven CTC<sup>+</sup> patients. In six of them, HER2 and *TOP2A* genes were normal. Among patients with HER2<sup>+</sup> tumors, discordant HER2 and *TOP2A* expression was found as one case was classified as having HER2 and *TOP2A*-co-amplified CTCs.

At the end of treatment, CTCs were detected in 17 (44.7%) of the patients. ER and PR expression of CTCs was detected in three patients (8.5%) and one patient (2.8%), respectively. Remarkably, two patients classified

as having ER<sup>+</sup> CTCs at the completion of NAT had ER<sup>+</sup> CTCs in the baseline sample and the corresponding primary tumor. In the 36 analyzed samples for EGFR expression, one case of EGFR<sup>+</sup> CTCs persisted whereas seven (19.4%) later were classified as having EGFR<sup>+</sup> CTCs. Among cases that were initially classified as having EGFR<sup>+</sup> CTCs, 25 (69.4%) were still negative for EGFR expression and three were classified as having EGFR<sup>+</sup> CTCs in the last blood sample.

In nine patients with CTCs still detectable, HER2 and TOP2A status was evaluated. Neither HER2 nor TOP2A amplification was found in any CTCs. Two of the corresponding primary tumors carried HER2 amplification, and seven were classified as HER2<sup>-</sup> tumors.

CTC status before and after systemic treatment is shown in Figure 3. It is notable that only around 30% of the patients switched their CTC status after systemic treatment. The predominant group of patients in the adjuvant and neoadjuvant setting is the group of patients with CTCs-negative before and after the systemic treatment.

#### Breast cancer subtypes and circulating tumor cell biomarker profile

To address the clinically relevant need to identify subgroups of patients within luminal, HER2-amplified, and triple-negative tumors, we correlated biomarker expression in CTCs with the three major distinct molecular BC subtypes (Table 2). Note that there was a statistically significant association between only luminal tumors and higher risk of EGFR<sup>+</sup> CTCs ( $P = 0.03$ ).

#### Discussion

To our knowledge, this study represents the largest analysis evaluating a set of five biomarkers in CTCs from

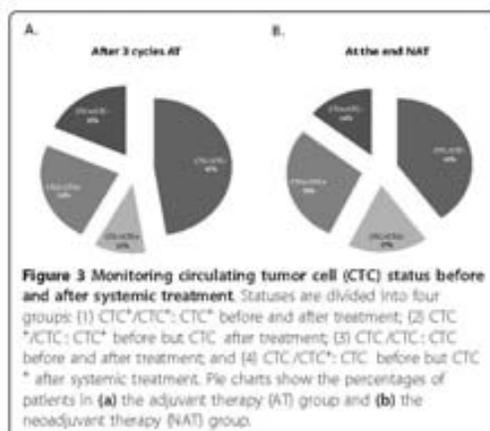
sequential blood samples of patients with non-metastatic BC. In our work, we found a slightly higher detection rate in a similar amount of blood in comparison with those other studies using the CellSearch System (Veridex, LLC) before any treatment [13,25,26]. Besides, differences in the CTC count between the baseline samples and the post-treatment samples were not observed. However, owing to the small number of patients in each treatment group, our analysis was not sufficiently powered to draw any definitive conclusion in this endpoint.

Our observations indicate that phenotyping/genotyping analysis of CTCs is highly dependent on the detection rate in three different tubes and the low number of cells captured in the non-metastatic setting. Of note, the threshold of at least one CTC has been used before as a prognostic factor in patients with non-metastatic BC [12,13,26], reflecting that CellSearch shows similarly low CTCs counts in this setting. Optimization of CTC assays for high-throughput processing will be required to allow a comprehensive characterization of CTCs and large-scale clinical trials that use this emerging technology [27].

Several studies have addressed the correlation between CTC status and clinical-pathological parameters, but reported observations are still controversial. Lang and colleagues [25] found that CTCs were more frequently found in patients with HER2<sup>+</sup> tumors, whereas other researchers have not found any association between the CTC status and HER2<sup>+</sup> tumors [13,14]. In this study, CTC<sup>+</sup> cells were found more frequently in patients with HER2<sup>+</sup> tumors, whereas other classic clinical-pathological parameters studied did not show a correlation with CTC status.

Non-detectable CTCs were observed in patients who were younger than 50 years old had primary tumors with HER2 amplification and G1-G2, and the higher risk was in the G1-G2 group. As in the metastatic setting [28], patients with poor prognostic factors had non-detectable CTCs. Such apparently contradictory results may be explained, in part, by the acquisition of mesenchymal antigens during the epithelial-mesenchymal transition (EMT) which facilitate the process of invasion and the metastatic cascade [29]. EMT-derived CTCs may have modulated their phenotype and acquired mesenchymal-like properties difficult to detect with the currently used detection methods [30]. As a result, patients with non-detectable CTCs and poor prognostic factors might represent a subset of patients with partial or complete EMT phenotype instead of an unequivocal undetectable CTC population.

Intriguingly, less than 35% of our population did not change their CTC status, suggesting that CTC population follows a pattern of neutral drift dynamics. This



**Table 2 Biomarker circulating tumor cell profile in relation to breast cancer subtypes**

	Triple-negative number (percentage)	Luminal number (percentage)	HER2 <sup>+</sup> number (percentage)	P value
ER <sup>+</sup> CTCs	1 (16.7)	7 (93.4)	2 (66.7)	NS
ER <sup>-</sup> CTCs	5 (83.3)	4 (36.4)	1 (33.3)	
PR <sup>+</sup> CTCs	1 (50)	8 (33.3)	0 (0)	NS
PR <sup>-</sup> CTCs	1 (50)	16 (66.7)	1 (100)	
EGFR <sup>+</sup> CTCs	2 (11.1)	34 (35.8)	1 (7.7)	0.03
EGFR <sup>-</sup> CTCs	16 (88.9)	43 (64.2)	12 (92.3)	
HER2 <sup>+</sup> CTCs	0 (0)	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0)	Unable to determine
HER2 <sup>-</sup> CTCs	8 (100)	16 (100)	2 (100)	
TOP2A <sup>+</sup> CTCs	1 (12.5)	1 (6.3) <sup>a</sup>	0 (0)	NS
TOP2A <sup>-</sup> CTCs	7 (87.5)	15 (93.7)	2 (100)	

<sup>a</sup>Polysomy 17 circulating tumor cell (17p CTC). The three breast cancer subtypes are triple-negative (estrogen receptor-negative [ER<sup>-</sup>], progesterone receptor-negative [PR<sup>-</sup>], and human epidermal growth factor receptor 2-negative [HER2<sup>-</sup>], luminal (ER<sup>+</sup> and/or PR<sup>+</sup> and HER2<sup>-</sup>), and HER2 (HER2-amplified tumors). P values were determined by chi-squared tests. All statistical tests were two-sided. ER<sup>+</sup> CTCs, estrogen receptor-positive circulating tumor cells; ER<sup>-</sup> CTCs, estrogen receptor-negative circulating tumor cells; PR<sup>+</sup> CTCs, progesterone receptor-positive circulating tumor cells; PR<sup>-</sup> CTCs, progesterone receptor-negative circulating tumor cells; EGFR<sup>+</sup> CTCs, epidermal growth factor receptor-positive circulating tumor cells; EGFR<sup>-</sup> CTCs, epidermal growth factor receptor-negative circulating tumor cells; HER2<sup>+</sup> CTCs, human epidermal growth factor receptor 2-positive circulating tumor cells; HER2<sup>-</sup> CTCs, human epidermal growth factor receptor 2-negative circulating tumor cells; NS, not significant; TOP2A<sup>+</sup> CTCs, topoisomerase 2 $\alpha$ -positive circulating tumor cells; TOP2A<sup>-</sup> CTCs, topoisomerase 2 $\alpha$ -negative circulating tumor cells.

finding diverges with those of previous data [12,14] that reported a lower incidence of CTC detection rate after systemic treatment, especially in those patients who had received anti-HER2 therapies [14,31]. This discrepancy may be explained, at least in part, by the fact that we analyzed 30 mL instead of 7.5 mL and because only 14.3% of our patients received trastuzumab as part of their treatment.

In concordance with the study by Fehm and colleagues [17], our findings showed that ER and PR expression in CTCs were not correlated with ER or PR expression in the primary tumor. Heterogeneous CTC subpopulations with different HR phenotypes coexisting in the same blood sample were observed. Remarkably, an RNA-based method is not able to evaluate individual cells and detect heterogeneity among a CTC population, whereas the IF approach provides an additional biologically relevant characterization of different CTC subpopulations. Thus, it could be speculated that distinct HR expression in CTCs in the same patients might, in part, explain differences in response to both endocrine and chemotherapy treatments, although this association needs to be further characterized.

Changes of ER/PR phenotype or persistence of CTC phenotypes other than the primary tumor phenotype was also observed in our study in the samples after treatment. As all of the patients with sequential samples received chemotherapy, it cannot be excluded that drug-induced changes and clonal selection may be influenced by the interaction of CTCs with chemotherapy.

EGFR protein was expressed in 27% of CTCs at baseline and did not correlate with clinical and pathological parameters except for HR<sup>+</sup> tumors. Preclinical data have provided evidence that cross-talk between growth factor

receptor (GFR) and ER pathway [32] may mediate the development of endocrine therapy resistance in HR<sup>+</sup> disease, although EGFR expression has been widely related to triple-negative BC tumors. The proposed biological mechanisms to explain how GFR signaling results in endocrine therapy resistance are conflicting [33-35]. Thus, we hypothesized that EGFR<sup>+</sup> CTCs might represent a potential negative biomarker of response to certain anti-cancer agents, including endocrine therapy in patients with HR<sup>+</sup> BC.

Besides, less than 25% of the EGFR<sup>+</sup> CTC patients became EGFR<sup>-</sup> CTC after treatment, suggesting that conventional agents like chemotherapy or even trastuzumab eradicate partially EGFR<sup>+</sup> CTC subpopulations. We fully acknowledge that our results should be interpreted with caution because the sample size is limited and the small numbers of events limit our conclusions.

HER2 overexpression of CTCs in patients with BC has been well characterized in recent studies [14,15]. Discrepancies between HER2 status in CTCs and their corresponding primary tumors have been described in patients with early and metastatic BC [14,36]. In our study, the rate for HER2-amplified CTCs detected by FISH was null at baseline, which differs from the HER2<sup>+</sup> CTC rate reported by other groups using an IF approach. The lack of HER2<sup>+</sup> CTCs may be influenced by the fact that CTC populations are heterogeneous, and analyzing such a small number of CTCs may underestimate HER2<sup>+</sup> populations. Besides, CTCs with (2+) HER2 IF staining remain unresolved and could justify partially HER2<sup>-</sup> CTCs. The optimal HER2 testing performance in CTCs has not been validated yet. Although IHC was the original method of assessment for HER2 status, IHC or IF alone cannot be recommended now for determining anti-HER2 treatment.

Previous studies have demonstrated that amplification of *TOP2A* in BC is not confined to those who are concomitantly *HER2*-amplified, suggesting that a proportion of *HER2*<sup>+</sup> patients exhibit *TOP2A* alterations [9,37]. Our findings that two *TOP2A*-amplified CTCs come from *HER2*<sup>+</sup> primary tumors and that the *HER2* gene is not co-amplified in these CTCs are consistent with previous observations described in primary BC tissues [37,38].

After three cycles of AT, co-amplification of *HER2* and *TOP2A* in CTCs was observed in one patient with *HER2* and *TOP2A*<sup>+</sup> tumor. This finding is consistent with a shift in tumor genotype and possibly dependency to alternative signaling pathways in *HER2*<sup>+</sup> primary tumors. As all of the patients included in the sequential blood analysis received chemotherapy, it cannot be excluded that *HER2* and *TOP2A* alterations in CTCs after treatment are influenced, at least in part, by the interaction with chemotherapy. According to other research groups, this finding opens up a window of opportunity because *HER2*<sup>+</sup> BCs with co-amplification of *HER2* and *TOP2A* in CTCs may exquisitely benefit anti-*HER2* agents as well as anthracycline-based regimens.

*HER2*<sup>+</sup> CTCs were isolated in patients with either *HER2*<sup>+</sup> or *HER2*<sup>-</sup> primary tumors after systemic treatment and trastuzumab therapy when recommended. This finding suggests that in *HER2*-amplified BC, *HER2*<sup>+</sup> CTCs may have been selected by trastuzumab therapy. It is noteworthy that anti-*HER2* agents are given in combination or sequentially [39,40] with chemotherapy, and the precise mechanism by which *HER2*<sup>+</sup> CTCs persist is currently unknown.

Standard predictors for BC treatment selection are HR expression for endocrine therapy and *HER2* status for anti-*HER2* therapy [41]. Among the whole set of biomarkers evaluated in CTCs, only *EGFR*<sup>+</sup> CTCs were more frequent in luminal tumors compared with triple-negative and *HER2*-amplified tumors. It could be speculated that the association between *EGFR*<sup>+</sup> CTCs and luminal BC patients is explained, in part, by an increase of cancer cells expressing *EGFR* involved in the paracrine loop in which epidermal growth factor produced by tumor-associated macrophages increases the invasiveness and migration of BC cells that express *EGFR* [7,8], although *EGFR* expression has been widely related to lower HR levels, higher proliferation, genomic instability, and *HER2* overexpression [42]. Although this association needs to be further characterized, luminal tumors might be more dependent than other BC subtypes on this mechanism that promotes cell migration and intravasation.

## Conclusions

Our findings exhibit the heterogeneity of biomarker distribution in CTCs and a lack of correlation with the

primary tumor biomarker profile before and after chemotherapy. The lack of an association between HR, *HER2*, and *TOP2A* status in CTCs and BC subtypes may contribute to diversity in gene expression patterns and clinical outcomes within BC subtypes [43-45]. Biomarker characterization in CTCs might become a useful tool for selecting patients for tailored therapies and target drug development. However, these findings should be validated in a larger cohort of patients.

## Additional material

**Additional file 1: Recovery rates with lower level control numbers (10, 5, 1 cells).** Spiking experiments were performed in cultured cancer cell lines: MCF-7, SKBR3, MDA-MB 231 and T47D in triplicate. Recovery rate ranges from 33.3 to 66.6% at 1 cell level, from 33.3 to 66.6 at 5 cells level and from 53.3 to 73.3% at 10 cells level. Recovery data from single samples ranged from 15.2% to 173.2% because of the inherent variation in spiking of low numbers of cells. However, all spiked samples levels regardless of the low number added, had detectable cells except in one sample of the level of 1 cell from the SKBR3 cell line.

**Additional file 2: Absolute and relative copy numbers of *HER2* and *TOP2A* genes in SKBR3, MCF7 cells, after immunomagnetic separation from blood samples and FICION analyses.**

## Abbreviations

AT: adjuvant therapy; BC: breast cancer; CI: confidence interval; CK: cytokeratin; CTC: circulating tumor cell; EGFR: epidermal growth factor receptor; EMT: epithelial-mesenchymal transition; ER: estrogen receptor; FISH: fluorescence in situ hybridization; GFR: growth factor receptor; HR: hormone receptor; IF: immunofluorescence; IHC: immunohistochemistry; *HER2*: human epidermal growth factor receptor 2; NAT: neoadjuvant therapy; OR: odds ratio; p17: polysomy 17; PR: progesterone receptor; *TOP2A*: topoisomerase 2 $\alpha$ .

## Acknowledgements

We thank the patients for their participation in the study. We also thank John Pope for excellent editorial assistance. This work was supported by the RETICS, FEDER (RD07/0020/2004), the FIS (PI08/0334) FEDER and the Consejería de Salud, Andalusian Regional Government, Spain.

## Author details

<sup>1</sup>Molecular Cytogenetics Laboratory, Pathology Department, Parc de Salut Mar-Hospital del Mar-IMM-GRETNHE, Passeig Marítim, 25-29, Barcelona, ES-08003, Spain. <sup>2</sup>Medicine Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Passeig Vall d'Hebrón, 119, Barcelona, ES-08035, Spain. <sup>3</sup>IFGA-University of Granada-Andalusian Government Center of Genomics and Oncology (GENYO), Avenida de la Ilustración, 114, Granada, ES-18007, Spain. <sup>4</sup>Medical Oncology Department, University Hospital of Jaén, Avenida del Ejército Español, 10, Jaén, ES-23007, Spain. <sup>5</sup>Medical Oncology Department, Hospital del Mar-IMAS, Passeig Marítim, 25-29, Barcelona, ES-08003, Spain. <sup>6</sup>Division of Preventive Medicine and Public Health, CIBERESP, University of Jaén, Campus de las Lagunillas, Ctra Tomequebradilla s/n, Edificio 8-3, Jaén, ES-23071, Spain. <sup>7</sup>Laboratory of Genetic Identification-UGR, Department of Legal Medicine, University of Granada, Avenida Madrid, 11, Granada, ES-18012, Spain.

## Authors' contributions

AF and LG helped to perform the immunomagnetic separation, the cell culture, and the immunofluorescence and FISH experiments. MS helped to perform the immunomagnetic separation, the cell culture, and the immunofluorescence and FISH experiments and to draft the manuscript. RN helped to collect all of the blood samples and the clinical-pathological characteristics of the patients and to draft the manuscript. MW, PS-R, and MF helped to collect all of the blood samples and the clinical-pathological

characteristics of the patients. MS, MR-R and JMC carried out the biomarker analysis in tissues. MD-R performed the statistical analysis. FS and JAL helped to draft the manuscript. All the authors participated in the design and coordination of the study. All the authors read and approved the final manuscript.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 3 April 2012 Revised: 10 April 2012 Accepted: 3 May 2012  
Published: 3 May 2012

#### References

- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E: **Cancer statistics, 2010.** *CA Cancer J Clin* 2010, **60**:277-300.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnson H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D: **Molecular portraits of human breast tumours.** *Nature* 2000, **406**:747-752.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnson H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Mataric JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL: **Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98**:10869-10874.
- Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Colchillo F, Ollila DW, Sartor CI, Graham ML, Perou CM: **The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes.** *Clin Cancer Res* 2007, **13**:2329-2334.
- Hugh J, Hanson J, Cheang MC, Nielsen TO, Perou CM, Dumontet C, Reed J, Krajewski M, Telleux L, Rupin M, Magherini E, Mackey J, Martin M, Vogel C: **Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BORG 001 trial.** *J Clin Oncol* 2009, **27**:1168-1176.
- Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, Perou CM, Nielsen TO: **Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype.** *Clin Cancer Res* 2008, **14**:1368-1376.
- Wyckoff J, Wang W, Lin EY, Wang Y, Piskley F, Stanley ER, Graf T, Pollard JD, Segall JE, Condeelis JS: **A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors.** *Cancer Res* 2004, **64**:7022-7029.
- Gowami S, Sahai E, Wyckoff JB, Cammer M, Cox D, Piskley FJ, Stanley ER, Segall JE, Condeelis JS: **Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop.** *Cancer Res* 2005, **65**:5278-5283.
- O'Malley FF, Chia S, Tu D, Shepherd LE, Levine MN, Bramwell VH, Andrulis IL, Pritchard KJ: **Topoisomerase II alpha and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy.** *J Natl Cancer Inst* 2009, **101**:644-650.
- Ejlertsen B, Jensen MB, Nielsen KV, Bahlis E, Rasmussen BB, Willemoe GL, Hentel PB, Knop AS, Mouridsen HT, Brunner N: **HER2, TOP2A, and TMP1 and responsiveness to adjuvant anthracycline-containing chemotherapy in high-risk breast cancer patients.** *J Clin Oncol* 2010, **28**:984-990.
- Sakourts E, Peraki M, Apostolaki S, Kallergi G, Xyrafas A, Kalbakis F, Aggelaki S, Kalykaki A, Georgoulas V, Mavroudis D: **Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells during follow-up of patients with operable breast cancer: prognostic relevance for late relapse.** *Breast Cancer Res* 2011, **13**:R60.
- Pierga JY, Bidard FC, Mathiot C, Brain E, Delaloge S, Giacchetti S, de Cremoux P, Salmon R, Vincent-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.
- Rack BK, Schindlbeck C, Andergassen U, Schneeweis A, Zwingers T, Lichtenegger W, Beckmann M, Sommer HL, Pantel K, Janni W: **Use of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood of breast cancer patients before and after adjuvant chemotherapy to predict risk for relapse: the SUCCES trial (abstract).** *J Clin Oncol* 2010, **28**(15 Suppl):1300.
- Riehdorf S, Müller V, Zhang L, Rau T, Lotfi S, Komer M, Röllig M, Huber J, Fehm T, Schröder L, Hillich J, Holms F, Tesch H, Eidmann H, Untch M, von Minckwitz G, Pantel K: **Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial.** *Clin Cancer Res* 2010, **16**:2634-2645.
- Wulfing P, Borchard J, Bueger H, Heid S, Zanler KS, Kiesel L, Brandt B: **HER2-positive circulating tumor cells indicate poor clinical outcome in stage I to II breast cancer patients.** *Clin Cancer Res* 2006, **12**:1715-1720.
- Ignatiadis M, Rothe F, Chalaboussas C, Durbecq V, Rouas G, Criscuolo C, Metallo J, Kheddoumi N, Singhal SK, Michels S, Vays I, Rosari J, Larismont D, Carly B, Pezzini M, Bessi S, Baurant F, Liebrens F, Piccart M, Sotiriou C: **HER2-positive circulating tumor cells in breast cancer.** *PLoS One* 2011, **6**:e15624.
- Fehm T, Hoffmann G, Altas B, Becker S, Sotzmayr EF, Wallekner D, Kimmig R, Kalinik-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**:R59.
- Mego M, Mani SA, Cristofanilli M: **Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer-clinical applications.** *Nat Rev Clin Oncol* 2010, **7**:693-701.
- Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbon PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Mangu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Palk S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FC, Taube S, Torkelson EE, Valentin P, Viale G, Vischer D, Wheeler T, Williams RB, et al: **American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer.** *J Clin Oncol* 2010, **28**:2784-2795.
- Sauter G, Lee J, Bartlett JM, Slamon DJ, Press MF: **Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations.** *J Clin Oncol* 2009, **27**:1323-1333.
- Salido M, Tusquets I, Cominbas JM, Suarez M, Espinier B, Corzo C, Bellet M, Fabrejat 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**:R267-273.
- Galarza JL, Serrano ML, Sanchez-Rovira P, Sivert A, Delgado-Rodriguez M, Campos M, de la Torre H, Algorta I, Duas A, 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, **102**:984-990.
- Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Nafatis EZ, Huth JF, Beltsch PD, Leitch M, Hoover S, Eshu D, Haley B, Morrison L, Fleming TP, Herlyn D, Tentapies LW, Fehm T, Tucker TF, Lane H, Wang J, Uhr JW: **Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**:8152-8162.
- Payne RE, Yague E, Slade ML, Apostolopoulos C, Jiao LR, Ward B, Coombes RC, Stubbins J: **Measurements of EGFR expression on circulating tumor cells are reproducible over time in metastatic breast cancer patients.** *Pharmacogenomics* 2009, **10**:51-57.
- Lang JE, Mosalpuria K, Cristofanilli M, Krishnamurthy S, Reuben J, Singh B, Bedrosian I, Metic-Bertram F, Lucci A: **HER2 status predicts the presence of circulating tumor cells in patients with operable breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 2009, **113**:501-507.
- Bizard FC, Mathiot C, Delaloge S, Brain E, Giacchetti S, de Cremoux P, Marty M, Pierga JY: **Single circulating tumor cell detection and overall survival in nonmetastatic breast cancer.** *Ann Oncol* 2010, **21**:729-733.
- Punnoose EA, Atwal SK, Spoerlein JM, Savage H, Pandita A, Yeh RF, Fitzhail A, Fine BM, Amiker UC, Chen DS, Lachner MB: **Molecular biomarker analyses using circulating tumor cells.** *PLoS One* 2010, **5**:e12517.
- Mego M, De Giorgi U, Dawood S, Wang X, Valero V, Andreopoulou E, Handy B, Ueno NT, Reuben JM, Cristofanilli M: **Characterization of metastatic breast cancer patients with nondetectable circulating tumor cells.** *Int J Cancer* 2011, **129**:417-423.
- Yang J, Wiesberg RA: **Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis.** *Dev Cell* 2008, **14**:819-829.
- Kallergi G, Papadaki MA, Politaki E, Mavroudis D, Georgoulas V, Agelaki S: **Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumor cells of early and metastatic breast cancer patients.** *Breast Cancer Res* 2011, **13**:R59.
- Pierga JY, Halghe D, Bachelot T, Delaloge S, Brain E, Campone M, Dieras V, Rolland E, Mignot L, Mathiot C, 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**:618-624.
32. Shou J, Massarew S, Osborne CK, Wakeling AE, Ali S, Weis H, Schiff R: Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004, **96**:926-935.
  33. Osborne CK, Schiff R: Growth factor receptor cross talk with estrogen receptor as a mechanism for tamoxifen resistance in breast cancer. *Breast* 2003, **12**:362-367.
  34. Font de Mora J, Brown M: AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Mol Cell Biol* 2001, **21**:5041-5047.
  35. Creighton CJ, Massarew S, Huang S, Timelzon A, Hillenbeck SG, Osborne CK, Shou J, Malami L, Schiff R: Development of resistance to targeted therapies transforms the clinically associated molecular profile subtype of breast tumor xenografts. *Cancer Res* 2008, **68**:7493-7501.
  36. Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Haley B, Perkins S, Betsch P, Khan A, Euhus D, Osborne C, Frenkel E, Hoover S, Leitch M, Clifford E, Vletta E, Morrison L, Herlyn D, Tenstappen LW, Fleming T, Fehm T, Tucker T, Lane N, Wang J, Uhr J: **HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**:9393-9398.
  37. Glynn RW, Mahon S, Curran C, Callagy G, Miller N, Kerin M: **TOP2A amplification in the absence of that of HER-2/neu: toward individualization of chemotherapeutic practice in breast cancer.** *Oncologist* 2011, **16**:949-955.
  38. Nielsen KV, Müller S, Møller S, Schonau A, Balslev E, Kropp AS, Ejlertsen B: **Alterations of ERBB2 and TOP2A genes in breast cancer.** *Mol Oncol* 2010, **4**:161-168.
  39. Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, Manikhas A, Lluch A, Tjuland S, Zambetti M, Valquez F, Bykhov M, Lichinitser M, Clement MA, Ciruelos E, Qjeda B, Marouni M, Bozhok A, Baroni R, Feyereislova A, Banon C, Valagussa P, Baselga J: **Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (the NOAH trial): a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort.** *Lancet* 2010, **375**:377-384.
  40. Piccart-Gebhart M, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, Steger G, Huang CS, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Láng I, Nitz U, Nwata H, Thomsen C, Lohrich C, Suter TM, Röschoff J, Suto T, Grestone V, Ward C, Straehle C, McFadden E, et al: **Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer.** *N Engl J Med* 2005, **353**:1659-1672.
  41. Di Cosimo S, Baselga J: **Management of breast cancer with targeted agents: importance of heterogeneity.** [corrected]. *Nat Rev Clin Oncol* 2010, **7**:139-147.
  42. Rimawi MF, Shetty PB, Weis HL, Schiff R, Osborne CK, Charnviss GC, Elledge RM: **Epidermal growth factor receptor expression in breast cancer: association with biologic phenotype and clinical outcomes.** *Cancer* 2010, **118**:1234-1242.
  43. Yang XR, Chang-Claude J, Goode EL, Couch FJ, Nevanlinna H, Milne RL, Gaudet M, Schmidt NK, Broeks A, Cox A, Cox A, Fasching PA, Hein J, Spurdle AB, Blows F, Driver K, Fleisch-Jarvis D, Heinz J, Sinn P, Welling A, Heikkinen T, Aittomäki K, Heikkinen P, Blomqvist C, Litowska J, Peplonska B, Charock S, Figueroa J, Brinton L, Hall P, Carne K, et al: **Associations of breast cancer risk factors with tumor subtypes: a pooled analysis from the Breast Cancer Association Consortium studies.** *J Natl Cancer Inst* 2011, **103**:250-263.
  44. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE, Wesseling J, Cheang MC, Gelmon K, Nielsen TO, Blomqvist C, Heikkinen P, Heikkinen T, Nevanlinna H, Akslen LA, Begín LR, Foulkes WD, Couch FJ, Wang X, Caloupek V, Olson JE, Baglietto L, Giles GG, Severi G, McLean CA, Southey MC, Rakha E, Green AR, Ellis KD, Sherman ME, Litowska J, et al: **Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies.** *PLoS Med* 2010, **7**:e1000279.
  45. Staaf J, Ringner M, Vallon-Christenson J, Jonsson G, Bendahl PO, Holm K, Arason A, Gunnarsson H, Hegardt C, Agnarsson BA, Luts L, Gråbau D, Fernö M, Malmström PO, Johannsson OT, Loman N, Barkardottir RB, Borg A: **Identification of subtypes in human epidermal growth factor receptor**

**2-positive breast cancer reveals a gene signature prognostic of outcome.** *J Clin Oncol* 2010, **28**:1813-1820.

doi:10.1186/bcr3180

**Cite this article as:** Nadal et al.: Biomarkers characterization of circulating tumour cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Research* 2012 **14**:R71.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



## CD133 expression in circulating tumor cells from breast cancer patients: Potential role in resistance to chemotherapy

Rosa Nadal<sup>1,2</sup>, F. Gabriel Ortega<sup>3\*</sup>, Marta Salido<sup>4</sup>, Jose A. Lorente<sup>3,5</sup>, Maria Rodríguez-Rivera<sup>4</sup>, Miguel Delgado-Rodríguez<sup>6</sup>, Marta Macià<sup>6</sup>, Ana Fernández<sup>3</sup>, Josep M. Corominas<sup>4</sup>, J. Luis García-Puche<sup>3</sup>, Pedro Sánchez-Rovira<sup>3,8</sup>, Francesc Solé<sup>1,7</sup> and M. Jose Serrano<sup>3,5</sup>

<sup>1</sup>Institut de Recerca Contra la Leucèmia Josep Carreras, Badalona, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Universitat Autònoma de Barcelona, Departament de Medicina, Barcelona, Spain

<sup>3</sup>Centro Pfizer-Universidad de Granada, Junta de Andalucía, Centro de Genómica e Investigación Oncológica, Granada, Spain

<sup>4</sup>Molecular Cytogenetics Laboratory, Pathology Department, Parc de Salut Mar-Hospital del Mar-IMM-GRETHHE, Barcelona, Spain

<sup>5</sup>Laboratory of Genetic Identification-UGR, Department of Legal Medicine, University of Granada, Granada, Spain

<sup>6</sup>Division of Preventive Medicine and Public Health, CIBERSP, University of Jaén, Jaén, Spain

<sup>7</sup>Medical Oncology Department, Hospital del Mar-IMAS, Barcelona, Spain

<sup>8</sup>Medical Oncology Department, University Hospital of Jaén, Jaén, Spain

CD133 has been associated with cell properties such as self renewal, migration and vasculogenic mimicry, potentially involved in generation of circulating tumor cells (CTCs). We characterized CD133 expression in CTCs of 98 nonmetastatic breast cancer (BC) patients. CTCs were isolated by immunomagnetic techniques using magnetic beads labeled with a multicytokeratin (CK)-specific antibody (CK3-1105) and CTCs and CD133 detection through immunocytochemical methods. CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs were identified in 65% of patients at baseline and 47.8% after systemic therapy ( $p = 0.53$ ). Correlation of CD133 status in CTCs with classical clinicopathological characteristics and response to therapy was performed. Her2 not amplified and low Ki-67 index were positively correlated with presence of CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs. Before any treatment, CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs were more frequently isolated in patients with luminal BC subtype. No statistically significant differences were found between proportion of CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs and BC subtypes after systemic therapy, implying a relative enrichment of CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs in triple negative and HER2-amplified tumors. While CK<sup>+</sup>/CTCs decreases after chemotherapy when analyzing the whole population, CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs were enriched in post-treatment samples in nonluminal BC subtypes. These findings suggest the potential role of CD133 as a promising marker of chemoresistance in nonluminal BC patients. Further prospective studies and extensive pre-clinical modeling will be needed to confirm whether CD133 is a marker of resistance to chemotherapy, and its role as a target for novel anticancer therapies targeting cancer stem cells and tumor vasculature.

Breast cancer (BC) is a complex and heterogeneous disease comprising multiple tumor entities associated with distinctive different biological feature, clinical behaviors and response to therapy. The current classification of BC is based on the pattern of expression of the hormone receptors (HR) estrogen receptor and/or progesterone receptor, and human epidermal receptor 2 (Her2) that identify three major BC subtypes:

luminal tumors, which are HR positive and Her2 negative; Her2 amplified tumors; and those tumors with lack of expression of the three receptors, referred to as triple negative (TN) BC.<sup>1</sup>

Despite advances in BC treatments, primary and acquired resistance to cancer therapies remains a challenge especially in nonmetastatic patients. Cancer stem cells (CSC) have been

**Key words:** CTCs, CD133, breast cancer, cancer stem cell, vasculogenic mimicry and drug resistance

**Abbreviations:** ALDH1: enzyme aldehyde dehydrogenase 1; BC: breast cancer; CK: cytokeratin; CSC: cancer stem cell; CTCs: circulating tumor cells; EMT: epithelial-mesenchymal transition; FISH: fluorescence *in situ* hybridization; Her2: human epidermal receptor 2; HR: hormonal receptor; IF: immunofluorescence; IHC: immunohistochemistry; ml: milliliter; TN: triple negative; VM: vasculogenic mimicry

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

\*R.N. and F.G.O. contributed equally to this work

RETICS, FEDER; Grant number: RD07/0020/2004; Grant sponsor: FIS; Grant number: PI08/0334; FEDER and Consejería de Salud.

Andalusian Regional Government; Grant number: GREIB PT 2010.07.

DOI: 10.1002/ijc.28263

History: Received 3 Oct 2013; Revised 28 Mar 2013; Accepted 17 Apr 2013; Online 10 May 2013

Correspondence to: Dr. Maria José Serrano, Centro Pfizer-Universidad de Granada, Junta de Andalucía, Centro de Genómica e Investigación Oncológica (GENYO), Avda. de la Ilustración, 114, ES-18007 Granada, Spain. Tel.: +34-958-637-079; Fax: +34-958-637-071, E-mail: mjose.serrano@genyo.es

**What's new?**

Despite advances in breast cancer treatments, primary and acquired resistance to cancer therapies remains a challenge. Here the authors looked at the expression of CD133—a glycoprotein associated with stem cell and migratory properties and vasculogenic mimicry—in circulating tumor cells (CTCs) of non-metastatic patients. CD133 was widely expressed, particularly in patients with luminal tumors before they received treatment. A relative enrichment was detected in non-luminal tumor subtypes following systemic therapy, suggesting a potential role of CD133+ CTCs in chemoresistance. Characterization of CD133 in CTCs might help to develop new therapeutic approaches targeting cancer stem cells and tumor vasculature.

implicated in tumor invasion, establishment of metastasis and mediation of intrinsic resistance to chemotherapy.<sup>2,3</sup> Recent studies have associated passage through epithelial-mesenchymal transition (EMT) with the acquisition of stem cell properties,<sup>4,5</sup> implying the potential expression of stem cell markers in CTCs.

CTCs are a heterogeneous cell population with established prognostic and predictive value in BC patients.<sup>6-9</sup> Breast CSCs were initially characterized and widely accepted as CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/low</sup>/Lineage<sup>-</sup> cells and enzyme aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1)-positive cells.<sup>10,11</sup> Association between CSC and resistance to anticancer agents has been widely demonstrated in different forms of BC,<sup>12-15</sup> including in CTCs. Indeed, expression of ALDH1 in CTCs has been linked to drug resistance in metastatic BC patients.<sup>16,17</sup> Although there is not data about correlation with clinical outcomes in non-metastatic BC patient, ALDH1 and other EMT markers [TWIST1, AKT2 and Phosphoinositide Kinase 3] have been identified in CTC-positive and CTC-negative samples in this setting.<sup>18</sup> Stem-like phenotypes such as CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/low</sup> and ALDH1<sup>high</sup>/CD24<sup>-/low</sup> have also been described in BC patients.<sup>19</sup>

Biological functions of CD133 (prominin-1) are not completely established; however, CD133 has been recognized as an indicator of tumor-initiating cells in many cancers including glioblastoma, prostate and colorectal tumors.<sup>20-22</sup> CD133, which has not been profiled extensively in BC may also define tumor-initiating cells in BC tumors.<sup>23</sup>

CD133-expressing tumor cells manifest cancer stem cell properties, characterized by the ability to self-renew in culture, to differentiate into cells that recapitulate original breast tumors, and to form tumors in animal models. Moreover, expression of stem cell associated genes, such as Notch1, ALDH1, Fgfr1 and Sox1, is increased in CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup> and CD133<sup>high</sup> cells.<sup>24</sup> Xenograft-initiating BC cells enriched in CD44<sup>high</sup>/CD49f<sup>high</sup>/CD133/2<sup>high</sup> cells also show unlimited self-renewal capabilities.<sup>25</sup> Other studies have observed that CD44 and CD133 are over-expressed in mammospheres derived from BC tissues and cell lines.<sup>26,27</sup>

In addition to being a stem cell-related marker; other properties such as cellular migration by facilitating EMT<sup>28-30</sup> and vasculogenic mimicry (VM)<sup>31</sup> have been linked to CD133<sup>+</sup> cells. CD133 is involved in migration via Hedgehog signaling enhancing the migratory ability of CD133<sup>+</sup> cells derived from cancer cells lines.<sup>28,30</sup>

CD133<sup>+</sup> cells also participate in tumor cell VM, an alternative type of blood supplement wherein both host endothelium and tumor cells participate in tumor neo-vascularization. VM-modulating genes are associated with vascular, embryonic and/or stem cell, and hypoxia-related signaling pathways.<sup>31</sup> Interestingly, Liu et al; reported that cell subpopulations with CD133<sup>+</sup> phenotype and CSC characteristics might contribute to vasculogenic mimicry in TN BC.<sup>32</sup>

In this work, we sought to characterize the expression of CD133 in CTCs of peripheral blood from nonmetastatic BC patients and correlate it with classical BC clinicopathological characteristics. To assess whether CK<sup>+</sup>/CTCs expressing CD133 could contribute to resistance to cancer therapies, we analyzed blood samples from before and after chemotherapy.

**Material and Methods**

From March 2009 to September 2010, BC patients with Stage I to IIIC were identified from the Breast Cancer Unit. The inclusion criteria were histological diagnostic of BC with availability of tissue for biomarker studies. Surgical procedure and systemic therapy were given at the discretion of the treating physician with or without targeted therapy namely trastuzumab for HER2+ BC patients. Medical charts of these patients were reviewed and clinical details of these patients were included in a database. This translational study was approved by the Ethics Review Committees of our institutions (Hospital del Mar and Hospital de Jaén). Informed consent was obtained from all patients and healthy volunteers.

A total of 98 patients donated 10 ml of blood at the time of first diagnostic. If adjuvant therapy was considered, post-treatment sample were obtained after 3 cycles of chemotherapy. If neoadjuvant therapy was administered, samples were obtained at the end of the treatment. We analyzed samples after systemic treatment together as post-treatment samples due to the limited sample size. For this study, we used a combination of immunohistochemistry (IHC) markers for classification of BC patients based on the pattern of expression of the HR, and HER2 that identify three major distinct molecular BC subtype: luminal tumors, which are HR positive and HER2 not amplified, HER2 amplified tumors; and those tumors with lack of expression of the three receptors, known as triple negative BC.

### Assessment of tumor biomarkers

ER and PR were routinely assessed by IHC using 6F11 (diluted 1/40; Novocastra, Newcastle Upon Tyne, UK) and 312 (diluted 1/100) antibodies, respectively, following ASCO/College of American guidelines.<sup>33</sup> Ki-67 LI was assessed using mouse monoclonal antibody MIB-1 (1:200 dilutions; Dako, Glostrup, Denmark) and percentage of positively stained nuclei was calculated. The Ki67 cut point of 14% established by Cheang et al. was used to designate a tumor as high proliferation.<sup>34</sup> Samples with any degree of p53 nuclear staining (clone DO-7, Novocastra Lab, Newcastle, UK) were considered positive. HER2 status was determined by IHC using Herceptest (Dako) in all patients and confirmed by Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) when indicated (Pathvysion, Abbott) following current recommendations.<sup>35</sup>

### Patients samples and cytospin preparation

Ten milliliters of blood were collected from each donor into a CellSave Preservatives Tubes (Veridex, LLC, Johnson & Johnson Company) blood collection tube, maintained at room temperature and processed within a maximum of 72 hr after collection according to the protocol established by our group.<sup>36,37</sup>

Briefly, the samples were processed by density double gradient ( $d = 1.077$  g/mol) centrifugation for the isolation of peripheral blood mononuclear (PBMCs) cells (Histopaque 1119 + 1077, Sigma) at 700 rpm for 30 min. For CTCs enrichment, we used the standard Carcinoma Cell Enrichment and Detection kit: MACS technology (Miltenyi Biotchnology).<sup>38</sup> The enrichment was performed using a bench top magnet for selective immunomagnetic cell separation, using magnetic beads labeled with a multi-CK-specific mouse antibody (CK3-11D5), which recognizes CK 7, 8, 18 and 19 (Miltenyi Biotchnology). CTCs were identified by immunocytochemical methods in glass slides and visualized under a direct light microscope to perform the cytomorphologic assessment.

CK-expressing cells were visualized by incubation of specimens with freshly prepared Fast Red TR/Naphthol AS-MX substrate solution for 30 min in a humidity chamber at room temperature. Slides were washed once with PBS and stained with Mayer's hematoxylin solution (Sigma) for 60 sec at room temperature. Epithelial tumor cells were readily identified and manually enumerated based on red staining of the cytoplasm and cellular cytomorphology. The cytomorphological criteria proposed by Meng et al.<sup>39</sup> (e.g., high nuclear/cytoplasmic ratio, larger cells than white blood cells) were used to characterize a CK<sup>+</sup> cell as a CTC. The presence of at least 1 CTC per 10 ml was considered a CTC-positive case, according to the analytic detection limit of our assay.<sup>37</sup>

### Cell cultures

All BC cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD).<sup>40</sup> In the analysis of recovery experiments, we analyzed control samples with high level

Table 1. CD133 status in CTCs in relation to patients characteristics

		N (%)/CK+/CD133+	N (%)/CK+/CD133-	p ( $\chi^2$ )
Age	≤ 50	6 (85.7)	1 (14.3)	NS
	> 50	7 (53.8)	6 (46.2)	
Histology	Ductal	11 (68.8)	5 (31.2)	NS
	Others	2 (50.0)	2 (50.0)	
Clinical tumor size	≤ 2 cm	8 (80)	2 (20)	NS
	> 2-5 cm	3 (62.9)	4 (57.1)	
	> 5 cm	2 (66.7)	1 (33.3)	
Clinical node status	No	3 (50)	3 (50)	NS
	N +	10 (71.5)	4 (28.5)	
	Unknown	1 (100)	0 (0)	
Grade	I	4 (100)	0 (0)	NS
	II	3 (75)	1 (25)	
	III	5 (65.5)	6 (54.5)	
	Unknown	1 (100)	0 (0)	
Hormonal Status	RH+	10 (76.9)	3 (23.1)	NS
	RH-	3 (42.9)	4 (57.1)	
HER2 Status	HER2-	13 (76.5)	4 (23.5)	0.03
	HER2+	0 (0.0)	3 (100)	
P53 Status	P53+	8 (80)	2 (20)	NS
	P53-	1 (50)	1 (50)	
	Unknown	4 (4)	4 (50)	
Ki67%	< 14%	8 (100)	0 (0.0)	0.01
	≥ 14%	5 (61.7)	7 (58.3)	

Abbreviations: RH+ indicates hormonal receptor positive (ER+/PR+, ER+/PR-, or ER-/PR+); RH- hormonal receptors negative; HER2, human epidermal growth receptor 2.

A total of 98 patients were included in this study. Information on CK+/CD133+ CTCs and CK+/CD133- CTCs was available in 20 of 98 (20.8%) patients at baseline at the time of study analysis. p values determined by  $\chi^2$  tests. All statistical tests were two-sided.

control numbers (2000, 100 and 50 cells) and with low level control numbers (10, 5 and 1 cells) from two human BC cell lines, MCF-7 and T47D. Cells were spiked in 10 ml of venous blood from healthy volunteers and control experiments were performed at least in triplicate. Cytospins were prepared afterward by density gradient centrifugation and immunomagnetic selection as per patients' samples. In our spiking experiments, recovery rates of tumor cells spiked into normal blood at the high level control numbers were in the range of 40-60% and at the low level control numbers as shown in Supporting Information Table 1.

As negative controls, 16 blood samples from healthy volunteers without evidence of an epithelial malignancy were examined. Peripheral blood was drawn from the middle of vein puncture after the first 10 ml of blood were discarded. This precaution was undertaken in order to avoid contamination of the sample with epithelial cells from the skin during sample collection and to assure a high specificity of the method. No CK<sup>+</sup> cells could be identified in these samples.

#### CD133 expression in cell lines

Since, MCF7 cells express CD133 were proposed as a positive control. FLG cells (stable clone from a kidney cells line), which do not express CD133 were used as a negative control. Cells were cultured in RPMI Medium (Sigma) enriched with 10% fetal bovine serum (HyClone) and supplemented with penicillin/streptomycin. Cells were maintained in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 37°C following instructions from manufacturer. All experiments were performed during the logarithmic growth phase 15 to 20 hr prior to the experiments and cells were transferred to serum-free culture medium containing only L-glutamine, NaHCO<sub>3</sub>B and penicillin/streptomycin.

MCF-7 cells and FLG were separately added into the blood from healthy donors and processed under identical conditions as per patients' samples. Cytospins were prepared afterward with Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. The slices were blocked with blocking reagent (Myltenyi biotech), CD133 was detected using polyclonal antibody against CD133 by using CD133 antibody sampler kit (biobyte) that contains three CD133 antibodies against different epitopes of the CD133 protein, diluted 1:50 and incubated overnight. Finally, samples were incubated with secondary antibody antirabbit IgG labeled with Alexa flour 350 (Invitrogen), diluted 1:50 for 1 hr in a humidity chamber and darkness.

Additionally, negative controls were performed for CD133 primary antibody by omitting the corresponding primary antibody and adding the secondary antibody.

#### CD133 immunoblot analysis

To ensure that the antibodies against CD133 did not cross-react with other proteins such as CK18, a series of control cells with known CD133 expression levels were examined by Western blot analysis against CD133 and  $\beta$ -Actin as a loading control.

Two BC cell lines (MCF7 and FLG) and three embryonic cell lines (AND1 and H9) were used in the immunoblot analysis. The use of the human ESC AND1 was approved to P.M. by the National Ethical Steering Committee for Embryo Research.<sup>43</sup> All cell lines were cultures as described earlier. To collect protein lysates, cells were scraped in 100  $\mu$ l lysis buffer each (50 mM Tris/HCl, 1% TritonX-100 pH 7.4, 1% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 0.15% NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate) at 4°C and flasks were scrapped off. Protein concentration of the samples was determined using the Bio-Rad protein kit. Equal amounts of protein (10  $\mu$ g) of each cell line were separated with SDS electrophoresis and transferred onto pvdF membrane (Biorad, Hercules, CA). Nonspecific binding was blocked with skim milk before incubation with the primary antibody (Rabbit CD133 antibody sampler kit Biorbyt), at a dilution 1/500. Proteins were incubated with anti-CD133 antibody overnight at 4°C and then after three washes with PBS-Tween with the appropriate secondary antibody (goat-antimouse RPH in

dilution 1/1,000) for one hour at room temperature. Detection of protein bands was succeeded using chemiluminescence kit (Thermo scientific, Rockford, IL).

#### CD133 staining by immunofluorescence methods

After identification of CTCs, cytopins were stained for CD133/CK in double-immunofluorescence (IF) experiments, following laboratory requirements. Cytopins were initially washed in PBS 1 $\times$  at room temperature during 15 min. Following the blocking with normal goat serum, cytopins were incubated with polyclonal antibody against CD133 by using CD133 antibody sampler kit (biobyte) diluted 1:50 for overnight at 4°C, followed by incubation with anti-IgG rabbit secondary goat antibody diluted 1:50 labeled with Alexa flour 350 (Invitrogen) for 1 hr in a humidity chamber and darkness.

#### Fluorescence microscopy

Specific staining can easily be distinguished by because of the differential intracellular distribution of the examined molecules. Cytopins were analyzed for the presence of tumor cells using a computerized fluorescence microscope Zeiss AXIO Imager.A1, with 20 $\times$ , 40 $\times$ , 63 $\times$  and 100 $\times$  oil immersion objective. Samples were visualized under a direct light microscope to identify red stained of CK<sup>+</sup> cells. After CK<sup>+</sup> cells detection, samples were brought to fluorescence light to detect cells with intense CD133 staining. CD133 positive cells showed an intense blue fluorescence surface.

#### Statistical methods

The main objective was to investigate the coexpression of CD133 in CTCs in samples prior to any treatment and after chemotherapy of nonmetastatic BC patients and correlate with clinical outcomes. The presence of at least 1 CTC per 10 ml was considered a positive result, according to the reported analytic detection limit of our assay.<sup>37</sup> We evaluated the range of expression of CD133 seen in CK<sup>+</sup>/CTCs by presence or absence of staining.

The statistical analysis was performed using SPSS 14.0 software. Data are expressed as means or numbers (%). Categorical variables were compared by Fisher's exact test, and continuous variables were compared by Student's *t*-test. Two-tailed *p* < 0.05 values were considered statistically significant.

#### Results

##### CD133 expression in MCF-7 cells

MCF-7 cells spiked into blood of healthy volunteers were processed as per patient and used as controls for the CD133 detection. Positive and negative control cells were used at the time of individual patient CTC analysis to determine positive or negative CD133 IF expression. Computerized fluorescence microscope revealed CD133 expression located in the surface of CK<sup>+</sup>/CTCs. Positive and negative controls for CD133 and CK expression are shown in Figure 1a.

Immunoblot analysis of equal protein amounts of cell lysates with anti-CD133 antibody revealed that MCF7 and

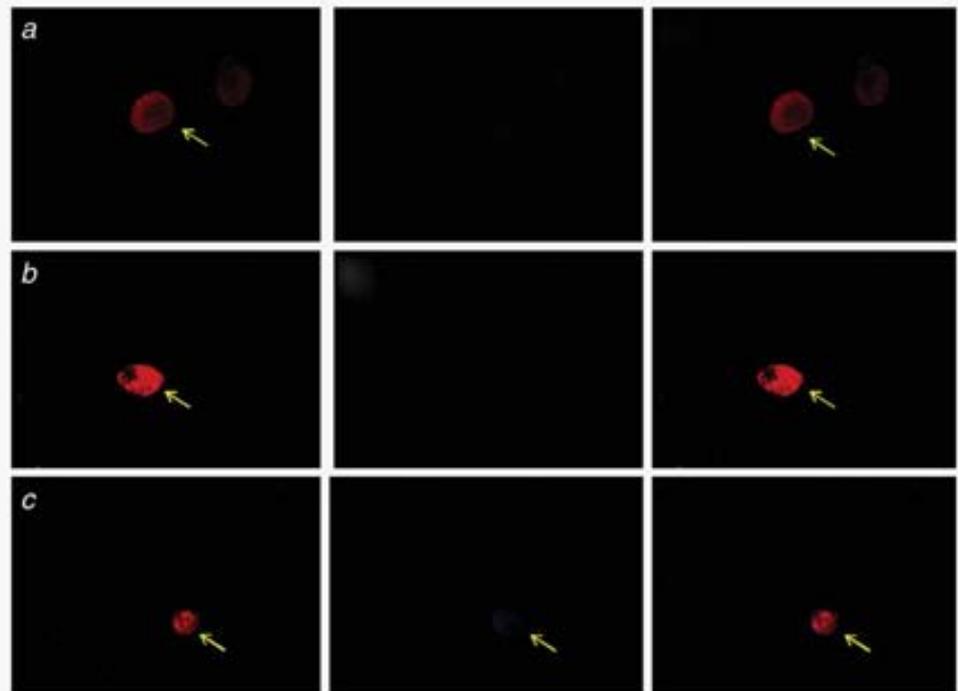


Figure 1. Cytokeratin and CD133 expression in FLG and MCF7 cells. Representative images of MCF7 and FLG spiked in the blood of normal volunteers. (a) Negative control for CD133 expression. Representative double immunofluorescence microscope images of FLG cells stained with A1: Multi-CK-specific mouse antibody (CK3-11D5)/Fast Red (red); A2: Polyclonal Mix Rabbit antibody against CD133/Alexa fluor 350 anti-rabbit IgG antibody (blue); A3: Overlap immunofluorescence image of CK+ (red)/CD133- (blue) MDA-MB231 cells. (b) Negative control for CD133 expression. Representative double immunofluorescence microscope images of MCF7 cells stained with B1: Multi-CK-specific mouse antibody (CK3-11D5)/Fast Red (red); B2: Alexa fluor 350 anti-rabbit IgG antibody (blue); B3: Overlap immunofluorescence image of CK+ (red)/CD133- (blue) MCF7 cells. (c) Positive control for CD133 expression. Representative double immunofluorescence microscope images of MCF7 cells stained with C1: Multi-CK-specific mouse antibody (CK3-11D5)/Fast Red (red); C2: Polyclonal mix rabbit antibody against CD133/Alexa fluor 350 anti-rabbit IgG antibody (blue); C3: Overlap immunofluorescence image of CK+ (red)/CD133+ (blue) MCF7 cells. Original magnification 60 $\times$ . Abbreviation: CK, cytokeratin; Ig, immunoglobulin.

H9 (positive control) expressed CD133, whereas CD133 expression was not detectable in FLG and AND1 (negative control) (Fig. 1b).

#### CD133 expression on CTCs of nonmetastatic breast cancer patients

Ninety-eight BC patients were enrolled in our study. The presence of CK<sup>+</sup> cells was confirmed in 20 of 98 (20.4%). Double-staining experiments with pan-CK and CD133 antibodies revealed strong CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> specific immunofluorescence in 13 of 20 (65%) (Fig. 2). The mean CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTC count was of 1.46 cells per 10 ml (range 1–4). Heterogeneity for CD133 expression was found in 75% of the CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs cases in which we were able to evaluate more

than 1 CTCs, as CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> and CK<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup> CTCs were coexisting in the same sample. We analyzed data from 73 of 74 patients that received chemotherapy, as one patient withdrew consent for sequential sampling. Twenty-four patients received endocrine therapy as a single modality of adjuvant treatment and they were not included in the analysis of those patients treated with chemotherapy.

Regarding the CK/CD133 status before and after chemotherapy, presence of CK<sup>+</sup> cells was confirmed in 17 (23.3%) at baseline and 23 (31.5%) after a systemic treatment. Ten out of 17 (58.8%) at baseline with a mean CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTC count of 1.6 cells per 10 ml (range 1–4). Eleven out of 23 (47.8%) CK<sup>+</sup>/CTCs had coexpression of CD133 with a mean of 1.54 cells ranging from 1 to 3 CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> cells.

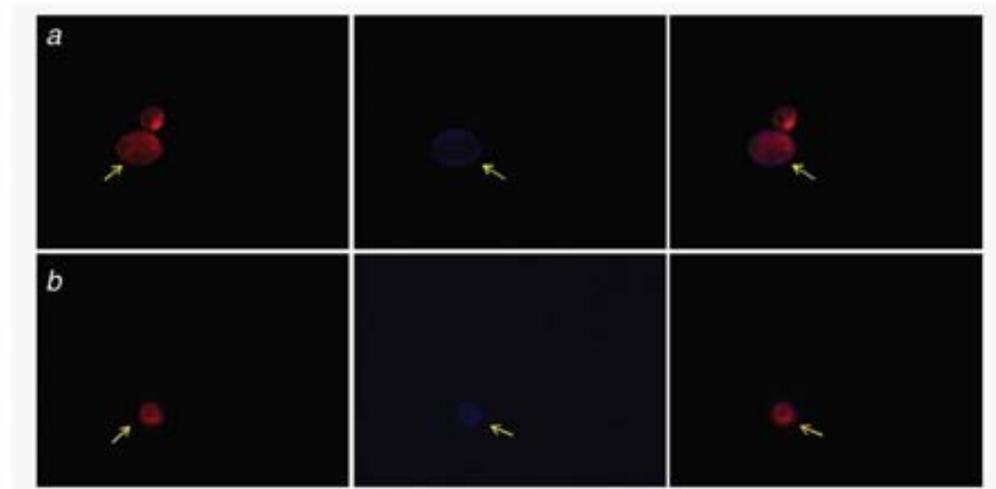


Figure 2. Double immunofluorescence CK and CD133 in CTCs of non-metastatic breast cancer patients. (a) Graph 1: Two CTCs expressing CD133 in the cell surface (Alexa 350, blue). Graph 2: Two CTCs expressing cytoplasmic CKs (Fast Red, red). Graph 3: CTCs double stained for CD133 (Alexa 350, blue) and CK (Fast Red, red) representing two CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs. (b) Graph 1: CTC expressing CD133 in the cell surface (blue). Graph 2: CTC expressing cytoplasmic CKs (red). Graph 3: CTC double stained for CD133 (Alexa 350, blue) and CK (Fast Red, red) representing a CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs. Original magnification  $\times 60$ . Abbreviation: CTC, Circulating tumor cells; CK, cytokeratin.

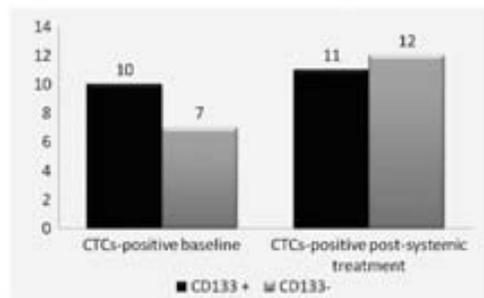


Figure 3. Frequency of CD133<sup>+</sup>/CK<sup>+</sup> CTCs versus CD133<sup>-</sup>/CK<sup>-</sup> CTCs of breast cancer patients in 10 ml of blood before and after systemic treatment. Black columns, number of cases with CD133<sup>+</sup>/CK<sup>+</sup> CTCs detected before systemic treatment; gray columns, number of cases with CD133<sup>-</sup>/CK<sup>-</sup> CTCs detected after chemotherapy. Abbreviation: CK, Cytokeratin; CTCs, circulating tumor cells.

Although the proportion of patients with CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs was higher before any treatment, no statistically significant differences were found between proportion of CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs before and after chemotherapy ( $p = 0.53$ ) (Fig. 3).

It is notable that around 10.2% of the patients switched their CTCs status after systemic treatment becoming CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs, and 62.5% (5/8) of them also coexpressed CD133. The

predominant group among the CK<sup>+</sup> CTCs patients was those with CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs pretreatment and CTCs-negative post-treatment. Any CK<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup> patients at baseline became CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> after chemotherapy.

Notably, when analyzing patients with CTC-negative pretreatment and CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs post-treatment ( $n = 6$ ), two of them showed evidence of disease relapse and one patient died due to recurrent BC. Because of the small sample size and limited number of events in the groups, the effect of the Kaplan-Meier survival analysis was limited (data not shown).

#### CD133 expression on CK<sup>+</sup> CTCs and correlation with clinicopathological characteristics

Patients' characteristics are consistent with an unselected early and locally advanced BC population. Clinicopathological characteristics stratified according to the baseline CK/CD133-CTCs status are described in Table 1. HER2 status and Ki67 were the primary tumor features that correlated with CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs ( $p = 0.03$  and  $0.01$ , respectively). Tumors with HER2 not amplified or low proliferation (Ki67 index <14%) index showed higher proportion of CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs. No significant correlation was found between CK<sup>+</sup>/CD133 expression in CTCs and clinical characteristics of patients, including age (<50 vs.  $\geq 50$ -years-old), histology, tumor size ( $\leq 2$  cm vs.  $>2-5$  cm vs.  $>5$  cm), nodal status (N0

Table 2. CK<sup>+</sup>/CD133 CTC profile in relation to breast cancer subtypes

a: Pre-treatment	Triple negative N(%)	Luminal N(%)	HER2+ N(%)	p
CK <sup>+</sup> /CD133 <sup>+</sup> CTCs	3 (50)	10 (90.9)	0 (0)	0.006
CK <sup>+</sup> /CD133 <sup>-</sup> CTCs	3 (50)	1 (9.1)	3 (100)	
b: Post-treatment				
CK <sup>+</sup> /CD133 <sup>+</sup> CTCs	4 (66.6)	6 (50)	1 (20)	0.35
CK <sup>+</sup> /CD133 <sup>-</sup> CTCs	2 (33.3)	6 (50)	4 (80)	

vs. N1-2), grade (gI vs. gII vs. gIII), hormonal status (RH+ vs. RH-), p53 status (positive vs. negative).

#### CD133 expression on CTCs and BC subtypes

In this study, 67 (68.4%) patients were classified as luminal, 17 (17.3%) as triple negative, 14 (14.3%) as Her2-amplified tumors. Given the increasing evidence that there are alterations in the distribution of cells with stem cell-like features according to BC subtypes,<sup>42</sup> we correlated CK/CD133 CTCs status with the three major distinct BC subtypes. CTCs were positive for CD133 expression in 10 (90.9%) of luminal tumors, 3 (50%) of triple negative and 0 (0%) of Her2-amplified tumors. Note that a statistically significant association was found between luminal tumors and CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs before systemic treatment ( $p = 0.006$ ) (Table 2a).

When we analyzed only patients that received chemotherapy as a part of their systemic treatment, association between CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs and luminal tumors remained statistically significant ( $p = 0.026$ ). After receiving chemotherapy, distribution of CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs and CK<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup> CTCs was not significantly different across the BC subtypes in the overall population ( $p = 0.35$ ) (Table 2b).

#### CD133 expression in CTCs within BC subtypes of patients receiving systemic chemotherapy

Seventy-four patients (75.5%) received either adjuvant ( $n = 41$ ) or neoadjuvant ( $n = 33$ ) chemotherapy. Main chemotherapy regimens included anthracyclines (66.3%), taxanes (54.1%), cyclophosphamide (100%) and 5-fluorouracil (66.3%). Trastuzumab was administered only to patients with HER2+ tumors (14.3%). Additionally, 72.4% of patients with HR positive received endocrine therapy with letrozole (44.8%), tamoxifen (23.4%) or tamoxifen (2-3 years) followed by exemestane (4.1%).

Because molecular characterization of CTCs could help to identify novel markers predictive of drug response or resistance, we investigated CD133 expression in CTCs of distinct BC subtypes before and after chemotherapy.

First, changes in the proportion of CK<sup>+</sup>/CD133-positive CTCs before and after chemotherapy were studied in patients with luminal tumors. Of the total 67 patients, 43 (64.2%) were treated with either adjuvant ( $n = 26$ ) or neoadjuvant ( $n = 17$ ) chemotherapy followed by endocrine therapy. Seven

(87.5%) patients had CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs before any treatment whereas only 1 (12.5%) patient had CK<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup> CTCs. After chemotherapy, 6 (50%) patients had CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs and 6 (50%) had CK<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup> CTCs. When comparing pre- and post-treatment samples, no statistically significant changes were observed in the proportion of CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs ( $p = 0.15$ ).

Considering only TN patients, 17 (17.3%) patients were included and all of them received conventional chemotherapy. Three (50%) patients had CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs pre-treatment, whereas 4 (66.6%) patients remained CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs post-treatment. No statistically significant differences were found in proportions of CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs before and after chemotherapy. It is worth mentioning that a relative enrichment of CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs was observed in patients with TN-BC as 66.6% of CK<sup>+</sup>/CTCs coexpressed CD133, whereas only 50% of the CK<sup>+</sup>/CTCs coexpressed CD133 pretreatment.

Among HER2-amplified tumors ( $n = 14$ ), no CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs were found in CK<sup>+</sup>/CTCs positive patients before treatment, whereas 2 patients with CK<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup> CTCs were observed. One (20%) out of 5 patient with CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs and 4 (80%) patients with CK<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup> CTCs were found after chemotherapy plus trastuzumab. As in luminal and TN BC subtypes, no statistically significant differences were found between the percentage of CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs before and after systemic treatment; however, a relative enrichment of CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs was also found in patients with Her2-amplified tumors.

No significant correlation was observed between CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs and clinicopathological characteristics of any BC patients (data not shown).

#### Discussion

On the basis of the evidence of the implication of CD133 as a stem cell marker, in cellular migration and vasculogenic mimicry, we hypothesized that CD133 could be a marker expressed in CTCs of nonmetastatic BC patients and play a role in resistance to chemotherapy.

In this study, the rate of CTCs detection was of 20.4% within the range of previously published results using different methodologies that showed a CTC detection rate ranging from 19% to 24% in similar BC populations.<sup>2,14</sup> Our results showed that a high proportion of CK<sup>+</sup>/CTCs coexpressed

CD133 both before and after chemotherapy; however, only part of the CK<sup>+</sup>/CTCs population coexpressed CD133. Most of the samples with CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs also contained CK<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup> CTCs. In agreement with these findings, we have previously shown that the heterogeneity of ER and PR expression in CTCs reported in the same cohort of patients.<sup>37</sup> Hence, the high incidence of patients with CK<sup>+</sup>/CTCs that also coexpress CD133 highlights the importance of this cellular subpopulation as part of the CTCs pool. CD133 and ER expression heterogeneity in CTCs supports the concept that intratumor heterogeneity seems likely to be a general feature of primary tumors,<sup>43,45</sup> and also of EMT-derived cells. In summary, our observations add further evidence of the heterogeneous nature of circulating BC cells in nonmetastatic patients.

Recently, Park et al. have shown that the frequency of tumor cells positive for stem cell-like and more differentiated cell markers varies according to tumor subtype and histological stage.<sup>42</sup> It therefore seemed to be of considerable interest to correlate CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs with clinicopathological characteristics of BC patients. CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs were significantly associated with HER2 not amplified and low proliferation index primary tumors suggesting genetic heterogeneity in promoting diversity for the expression of stem cell markers in cancer cells.

Expression of stem cell markers in CTCs has been found associated with innate resistance to anticancer agents and treatment failure. Consequently, CTCs with a stem cell phenotype can pose major clinical challenges towards the complete eradication of minimal residual disease. In contrast to primary tumors and CTCs in metastatic BC patients that showed enrichment of cells with stem cell-like phenotypes after chemotherapy,<sup>15,16</sup> we did not find differences between CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs proportion before and after systemic treatment in the overall population. When we analyzed BC subtypes separately, CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs differed significantly across BC subtypes with the higher percentage of CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs in luminal tumors before any treatment. However, the significant higher proportion of CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs in luminal tumors disappeared after receiving chemotherapy. This result may be explained at least in part by the relative enrichment of CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs in triple negative and HER2-positive tumors after systemic treatment.

Nonetheless, these results are of concern as CTCs with stem cell properties have been isolated after polychemotherapy, including trastuzumab in those patients with HER2-amplified tumors. Indeed, two out of four TN patients with CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs after chemotherapy relapsed within the first two years. However, we cannot rule out the possibility that we did not find statistically significant differences because of the lack of longer follow-up and an insufficient sample size to detect differences in such a low-frequency occurring event in the nonmetastatic setting.

Several groups have evaluated BC stem cell markers such as CD44 and ALDH1 in CTCs.<sup>16,18,19</sup> Given that CD133 plays a role as a BC stem cell marker in preclinical studies, our findings could be consistent with the results of Mani et al. showing that epithelial cells induced to undergo EMT in BC models activate stem cell pathways.<sup>4</sup>

VM describes the unique ability of highly aggressive tumor cells to express endothelial cell-associated genes and form vasculogenic-like networks. Chang et al. have shown in colon cancer and melanoma the functional activity of VM and their implication for tumor shedding and migration.<sup>46,47</sup> Although so far there is only reported evidence of the role of CD133 in VM in BC cell lines, our results suggest that CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs may represent part of those cells with multipotent phenotype underlying VM. In addition, migratory properties and contribution to VM attributed to CD133<sup>+</sup> tumor cells may partially explain the dissemination of a large pool of CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> cells in the bloodstream of BC patients.

Taking all of these considerations into account and despite our observations are not mechanistically driven, CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs could ultimately be implicated in tumor shedding and potentially metastasis. Importantly, critical VM modulating genes can be categorized into pathways associated with vascular and stem cell signaling, which are potential targets for vascular and stem cell therapies.

Because CSCs lead to resistance to chemotherapy, signaling pathways that maintain CSC are attractive therapeutic targets. Accordingly, a new promising agent, Salinomycin, decreases the proportion of CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup> BC cells and its use in mice inhibits mammary tumor growth *in vivo*.<sup>48</sup> Specifically, Salinomycin targets CD133<sup>+</sup> cell subpopulations and decreases the malignant traits in colorectal cancer lines.<sup>49</sup> Additionally, there is experimental evidence that specifically targeting pathways implicated in VM may have success in inhibiting tumor growth. For example, rapamycin (an inhibitor of the mTOR pathway and VEGF), an FDA-approved angiogenesis inhibitor, that has specifically suppressed tumor cell VM coincident with a downregulation of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinases, and Hypoxia-inducible factor 1.<sup>50</sup>

Interruption of the metastatic cascade *via* the targeting of CTCs is a promising therapeutic approach. The availability of novel targeted anticancer treatments increased the interest of the molecular characterization of CTCs, in particular in nonmetastatic BC patients that are potentially curable.

In conclusion, to our knowledge this is the first study exploring CD133 in CTCs of nonmetastatic BC patients, a stem cell marker involved in VM and cellular migration. The expression of CD133 in CTCs was more frequent in luminal tumors before any treatment suggesting subtype-specific stem cell gene expression. Relative enrichment of CK<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> CTCs in nonluminal BC subtypes was observed after systemic therapy suggesting a potential role in resistance to therapy.

More extensive prospective studies and extensive preclinical modeling will certainly be necessary to confirm the role of CD133 in resistance to chemotherapy and its role as a target of anti-CSC and anti-vascular treatments.

#### Acknowledgements

The authors thank the patients for their participation in the study. They thank John Pope for excellent editorial support. They also thank Dr Pablo Menendez and Dr Juan Carlos Rodriguez Manzanique for prove cell lines.

#### References

- Di Costanzo S, Basaglia J. Management of breast cancer with targeted agents: importance of heterogeneity. [corrected]. *Nat Rev Clin Oncol* 2010;7:139-47.
- Li X, Lewis MT, Huang J, et al. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:672-9.
- O'Brien CA, Karns A, Jamieson CH. Cancer stem cells and self-renewal. *Clin Cancer Res* 2010;16:3113-20.
- Masi SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;133:704-15.
- Moril AP, Llovera M, Theodorou C, et al. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 2008;3:e2888.
- Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351:781-91.
- Back B. Use of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood of breast cancer patients before and after adjuvant chemotherapy to predict risk of relapse. *J Clin Oncol* 2010;28:a1003.
- Purga TY, Ballard FC, Mathot C, et al. 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;14:7094-10.
- Lucci A, Hall CS, Lothi AK, et al. Circulating tumor cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study. *Lancet Oncol* 2012;13:984-95.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:3983-8.
- Guenther C, Har MH, Charde-Jauffret E, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 2007;1:553-67.
- Calzagno AM, Salcido CD, Gillet JP, et al. Prolonged drug selection of breast cancer cells and enrichment of cancer stem cell characteristics. *J Natl Cancer Inst* 2010;102:1637-52.
- Filmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res* 2008;10:R25.
- Creighton CL, Li X, Landi M, et al. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:13820-5.
- Tamir T, Morimoto K, Shimizu K, et al. Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clin Cancer Res* 2009;15:4234-41.
- Aktao B, Trevis M, Felton T, et al. Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2009;11:R46.
- Raimondi C, Gaddione A, Naso G, et al. Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2011;130:449-55.
- Kaurini-Bear S, Hoffmann O, Walzmann D, et al. Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells. *Breast Cancer Res* 2012;14:R13.
- Theodoropoulos PA, Polissoulis H, Agiadi S, et al. Circulating tumor cells with a putative stem cell phenotype in peripheral blood of patients with breast cancer. *Cancer Lett* 2010;288:99-106.
- Rico-Vitani L, Lombardi DG, Pizzoni E, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007;445:111-5.
- Zhu L, Gibson P, Currie DS, et al. Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation. *Nature* 2009;457:603-7.
- Vander Griend DJ, Karthaus WL, Dabryele S, et al. The role of CD133 in normal human prostate stem cells and malignant cancer-initiating cells. *Cancer Res* 2008;68:9703-11.
- Schwab LP, Pascock DL, Majumdar D, et al. Hypoxia-inducible factor 1alpha promotes primary tumor growth and tumor-initiating cell activity in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2012;14:R6.
- Wright MH, Calzagno AM, Salcido CD, et al. Pical breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast Cancer Res* 2008;10:R10.
- Meyer ME, Fleming JM, Lin AP, et al. CD44posCD49betaCD133/2hi defines tumorigenic cells in estrogen receptor negative breast cancer. *Cancer Res* 2010;70:4824-33.
- Pecor S, Tosoni D, Confalonieri S, et al. Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content. *Cell* 2010;140:62-73.
- Sansone P, Storti G, Tavolari S, et al. IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinomas and normal mammary gland. *J Clin Invest* 2007;117:3888-4002.
- Chen X, Linggi S, Khoojyari S, et al. Epithelial-mesenchymal transition and hedgehog signaling activation are associated with chemoresistance and invasion of hepatoma subpopulations. *J Hepatol* 2011;55:838-45.
- Chen YS, Wu MJ, Huang CY, et al. CD133/Scr axis mediates tumor initiating property and epithelial-mesenchymal transition of head and neck cancer. *PLoS One* 2011;6:e28053.
- Uchida H, Arta K, Yamoue S, et al. Role of sonic hedgehog signaling in migration of cell lines established from CD133-positive malignant glioma cells. *J Neuroscol* 2011;104:697-704.
- Kirschmann DA, Seifor EA, Hardy KM, et al. Molecular pathways: vasculogenic mimicry in tumor cells: diagnostic and therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 2012;18:2726-32.
- Liu TT, Sun BC, Zhao XL, et al. CD133(+) cells with cancer stem cell characteristics associates with vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer. *Oncogene* 2012;32:544-53.
- Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, et al. American society of clinical oncology/College of American pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:2784-95.
- Cheng MC, Chiu SK, Vodiak D, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:736-50.
- Sastre G, Lee J, Bartlett JM, et al. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol* 2009;27:1323-33.
- Galeffi JL, Serrano ML, Sanchez-Rovira P, et al. 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;107:984-90.
- Nadal RM, Fernandez A, Sanchez-Rovira P, et al. Biomarkers characterization of circulating tumour cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2012;14:R71.
- Martin VM, Stewart C, Schulz A, et al. Immunomagnetic enrichment of disseminated epithelial tumor cells from peripheral blood by MACS. *Exp Hematol* 1998;26:252-64.
- Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer: discrepancy. *Clin Cancer Res* 2004;10:4152-62.
- Hwang-Verasian WW, Kuo WH, Chang PH, et al. Multiple lineages of human breast cancer stem/progenitor cells identified by profiling with stem cell markers. *PLoS One* 2009;4:e3777.
- Cortes JL, Sanchez L, Lligo G, et al. Mesenchymal stem cells facilitate the derivation of human embryonic stem cells from cryopreserved poor-quality embryos. *Hum Reprod* 2009;24:1844-51.
- Park SY, Lee HH, Li H, et al. Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16:876-87.
- Charde-Jauffret E, Monville F, Guenther C, et al. Cancer stem cells in breast: current opinion and future challenges. *Pathobiology* 2008;75:73-84.
- Polyak K. Heterogeneity in breast cancer. *J Clin Invest* 2011;121:3786-8.
- Rosen JM, Jordan CT. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science* 2008;324:1679-3.

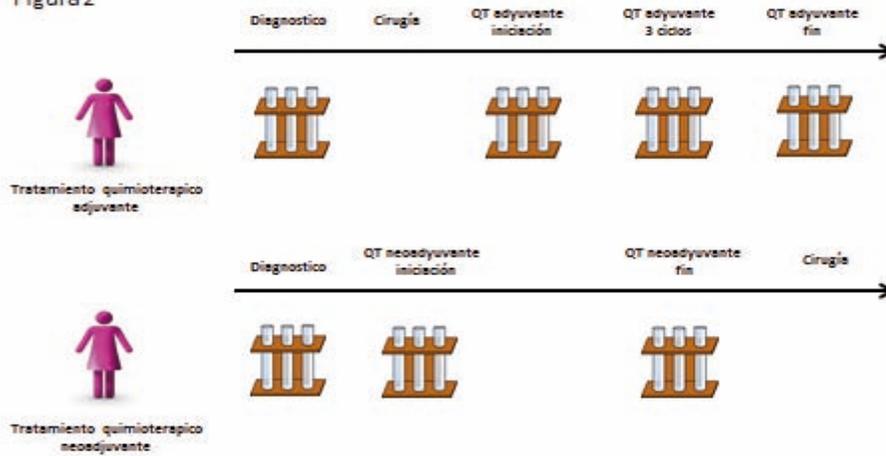
46. Masiata AI, Folberg K, Hess A, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999;155:738-52.
47. Chang YS, & Toranzo E, McDonald DM, et al. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;97:14808-13.
48. Gupta PR, Oude TT, Jiang G, et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell* 2009;138:645-58.
49. Dong TT, Zhou HM, Wang LL, et al. Salinomycin selectively targets 'CD133+' cell subpopulations and decreases malignant traits in colorectal cancer lines. *Ann Surg Oncol* 2011;18:1797-804.
50. Su M, Feng YI, Yao LQ, et al. Plasticity of ovarian cancer cell SKOV3ip and vasculogenic mimicry in vivo. *Int J Gynecol Cancer* 2008;18:476-85.

## V. PACIENTES Y METODOS

Entre marzo del 2009 y septiembre del 2010 fueron identificados pacientes con cáncer de mama con estadios clínicos I-IIIc –según la clasificación de TNM- en las Unidades de cáncer de mama del Hospital del Mar y del Hospital Universitario de Jaén. Los principales criterios de inclusión fueron tener un diagnóstico histológico de cáncer de mama y tejido disponible para el estudio de biomarcadores. Tanto los tratamientos quirúrgicos como el tratamiento anti-tumorales sistémico se indicaron de acuerdo con el criterio de los médicos a cargo de la paciente. Los tratamientos sistémicos incluían terapias endocrinas, quimioterapia y tratamientos dirigidos contra HER2 -como el trastuzumab para aquellas pacientes con una enfermedad HER2-positiva. Las historias clínicas de las pacientes fueron revisados y la información clínica de interés se recopiló en una base de datos.

Un total de 98 pacientes fueron seleccionadas para participar en el estudio las cuales donaron tres muestras de 10 ml de sangre en el momento del diagnóstico. En aquellas pacientes que recibieron quimioterapia adyuvante, se obtuvieron tres muestra de sangre después de 3 ciclos de quimioterapia y al final del tratamiento. En aquellas que recibieron tratamiento neoadyuvante, se obtuvieron las tres segundas muestra al final del tratamiento neoadyuvante (Figura 2). Para este estudio, clasificamos a las pacientes en tres grandes subgrupos de pacientes en base a la expresión de los RH, el RE y el RP, y el estado de HER2(5). De esta manera se clasificaron como tumores luminales aquellos con al menos uno de los dos RH positivo y con HER2 negativo; tumores HER2 positivos aquellos con amplificación de *HER2* o sobreexpresión de HER2 y finalmente los tumores triple negativos que no expresan ninguna de los 3 receptores. Este estudio fue aprobado por los comités éticos del Hospital del Mar y del Hospital de Jaén y todas las pacientes y controles sanos firmaron el consentimiento informado del estudio.

Figura 2



?

**Objetivo de la Unidad Curricular**

El propósito de esta unidad es proporcionar al estudiante los conocimientos y habilidades necesarios para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la enfermedad de mama. Se abordarán los aspectos clínicos, diagnósticos y terapéuticos de esta patología, así como el rol del enfermero en el cuidado de la paciente oncológica. Se enfatizará en el uso de evidencia científica para la toma de decisiones y en el trabajo en equipo interdisciplinario.

El estudiante deberá ser capaz de identificar los factores de riesgo y los signos y síntomas de la enfermedad de mama, así como realizar el diagnóstico diferencial de esta patología. Además, deberá conocer los principios de los tratamientos disponibles y el rol del enfermero en el manejo de la paciente durante el proceso terapéutico.

PharmaDX de Dako en el otro - de acuerdo con las recomendaciones del momento(145). El gen de la *TOP2A* se evaluó mediante FISH usando el *TOP2A/CEP17* FISH probe kit® (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA). Se consideró amplificación de *TOP2A* si el ratio *TOP2A/CEP17* era 2:1 o mayor. Se consideró polisomía del 17 (p17) cuando las células tenían 3 o más copias de centrómeros del cromosoma 17 por célula(146).

### ***V.2 Aislamiento y enumeración de las CTCs***

Los 30 ml de sangre de cada donante se obtuvieron en 3 diferentes tubos (CellSave Preservatives Tubes; Veridex, LLC, Raritan, NJ, USA), se mantuvieron a temperatura ambiente, y se procesaron en paralelo dentro de las primeras 72 horas después de la obtención, de acuerdo con el protocolo establecido por nuestro grupo(147). De forma simplificada, las muestras fueron procesadas mediante centrifugación en un gradiente de densidad (Histopaque 1119; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Para el enriquecimiento de las CTCs en la muestra, se utilizó el kit de enriquecimiento comercial Carcinoma Cell Enrichment y seguidamente el kit de detección de MACS technology (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).

El enriquecimiento de las CTCs se llevó a cabo mediante separación celular selectiva positiva inmunomagnética, usando ferropartículas magnéticas conjugadas con un anticuerpo que detecta múltiples CK (CK3-11D5): CK 7,8, 18 y 19. Las CTCs fueron finalmente identificadas mediante inmunocitoquímica y visualizadas en el microscopio de luz directa con el objetivo de realizar una evaluación combinada citomorfológica y inmunofenotípica. Los criterios citomorfológicos fueron propuestos por el grupo de Meng (148) – por ejemplo, ratio citoplasma/núcleo alto y células más grandes que los glóbulos blancos- fueron utilizados para la caracterización de células CK-positivas como CTCs. Dado que se analizaron tres tubos diferentes de sangre para cada paciente, clasificamos un caso como positivo para CTCs si al menos en uno de los tres tubos se aislaba una CTCs.

### ***V.3 Cultivos celulares y experimentos de recuperación celular***

Las líneas celulares de cáncer de mama fueron obtenidas del American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). En el análisis de los experimentos de recuperación celular, se analizaron muestra



en los controles como en las pacientes- para evitar la contaminación con células epiteliales de la piel en el momento de la venopunción y asegurar la máxima especificidad de la metodología. No se encontró ninguna célula CK positiva en las muestras de los controles.

#### **V.4 Viabilidad de los estudios de los marcadores: RH, EGFR, HER2 y TOPA2**

Seguidamente se testó la viabilidad técnica de evaluar los biomarcadores de interés en las CTCs aisladas utilizando las mismas técnicas que se utiliza en el tejido del tumor primario: expresión proteica mediante inmunofluorescencia (IF) y la amplificación del DNA mediante FISH. Los controles positivos fueron creados añadiendo un número decreciente de células tumorales de cáncer de mama procedentes de líneas celulares que se pipetearon en diferentes muestras de sangre de donantes voluntarios sanos. Las preparaciones de la centrifuga fueron creadas como se ha descrito anteriormente. Para los controles negativos, se omitió el anticuerpo primario en las muestras de sangre de voluntarios sanos procesadas.

Mediante los controles positivos y negativos de los biomarcadores, testamos si la expresión de los RE, RP y el EGFR podría ser determinada de forma segura y precisa mediante IF en células de cáncer de mama de las siguientes líneas celulares: MCF-7, MDA-MB231 and SKBR3. Utilizamos anticuerpos contra el RE, RP y el EGFR y se evaluó su expresión basándonos en la presencia o ausencia de tinción en las CTCs (127). La amplificación del HER2 y TOP2A se determinó mediante FISH –usando el cociente *HER2/TOP2A/CEP17*. Las células tumorales de la línea SKBR3 – caracterizadas por tener el gen *ErbB2* amplificado- y MCF-7 – típicamente HER2 negativas- fueron pipeteadas en sangre total (2000, 100 y 50 células). A continuación se procesaron las preparaciones de la centrifuga con idénticas condiciones que en las muestras de los pacientes. La amplificación de HER2 y TOPA2 fue determinada en las células de acuerdo con los criterios estándar descritos previamente para los tumores primarios(145). Finalmente, se calculó el número de copias absolutas y relativas de los genes HER2 y *TOPA2* en células tumorales de las líneas SKBR3 y MCF-7 mediante la metodología llamada FICTION - que incluye separación inmnunomagnética, inmunofenotipaje y citogenética interfásica para la investigación de neoplasias (Figura 3).



para controlar el anticuerpo primario, se omitió el correspondiente anticuerpo primario y a continuación se añadió el secundario.

#### ***V.6 Análisis de Inmunoblotting para la detección de CD133***

Con el objetivo de garantizar que el anticuerpo contra CD133 no reaccionaba de forma cruzada con otras proteínas celulares como por ejemplo CK18, una serie de células control- con el estado de expresión de CD133 conocido- se examinaron para CD133 y  $\beta$ -Activa ( como control de carga) mediante la técnica de Western Blot (WB).

Dos líneas celulares diferentes MCF-7 y T47D y tres líneas celulares embrionarias (AND1 y H9) fueron usadas en este experimento. Todas las líneas celulares fueron cultivadas según los protocolos de nuestra institución. A continuación se procedió con la rotura de las células con 100  $\mu$ l de buffer de lisis (50 mM Tris/HCl, 1% TritonX-100 pH 7.4, 1% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 0.15% NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM ortovanadato de sodio) a 4°C con el objetivo de obtener las proteínas del lisado. Se determinó la concentración de proteínas de las muestras mediante el kit Bio-Rad protein. Concentraciones iguales de proteínas (10 $\mu$ g) de cada línea celular fueron separadas mediante electroforesis SDS y transferida a una membrana pvdfa (Biorad, Hercules, CA). Las uniones no específicas fueron neutralizadas con leche desnatada antes de la incubación con el anticuerpo primario (anticuerpo de conejo contra CD133 sampler kit Biorbyt<sup>®</sup>) a una dilución 1/500. El lisado proteico fue incubado con un anticuerpo anti-CD133 durante una noche a 4°C y a continuación – después de 3 lavados con PBS-Tween- se incubó con el anticuerpo secundario (RPH cabra-antiratón a una dilución 1/1.000) durante 1 hora a temperatura ambiente. La detección de las bandas del WB se realizó mediante un kit de quimioluminiscencia (Thermo scientific, Rockford, IL). Figura 4.

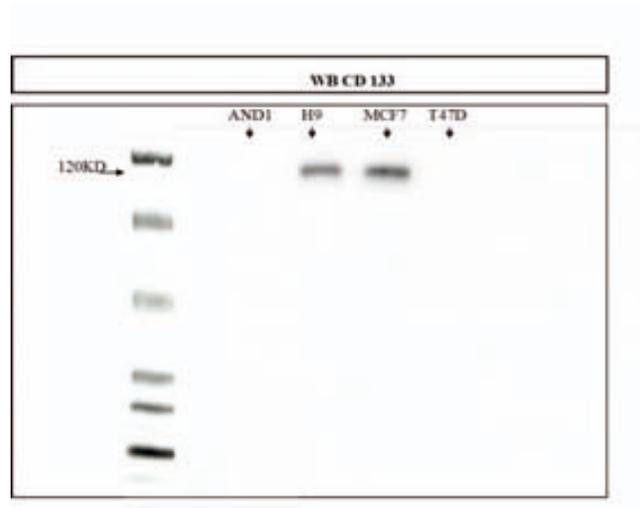


Fig. 2. Western blot analysis of CD133 expression in cell lines AND1, H9, MCF7, and T47D.

Western blot analysis of CD133 expression in cell lines AND1, H9, MCF7, and T47D. The blot shows bands for CD133 in the H9, MCF7, and T47D lanes, but not in the AND1 lane. A 120KD marker is indicated on the left. The lanes are labeled AND1, H9, MCF7, and T47D at the top. Arrows point to the bands in the H9, MCF7, and T47D lanes, indicating the presence of CD133. No band is visible in the AND1 lane.

Western blot analysis of CD133 expression in cell lines AND1, H9, MCF7, and T47D. The blot shows bands for CD133 in the H9, MCF7, and T47D lanes, but not in the AND1 lane. A 120KD marker is indicated on the left. The lanes are labeled AND1, H9, MCF7, and T47D at the top. Arrows point to the bands in the H9, MCF7, and T47D lanes, indicating the presence of CD133. No band is visible in the AND1 lane.

tinciones específicas para cada marcador se diferenciaron fácilmente de acuerdo con la distribución diferencial de las proteínas examinadas y la combinación de inmunofluorescencia directa e indirecta con el objetivo de evaluar simultáneamente células CK+/RE and CK+/EGFR/RP (Figura 3)

#### ***V.8 Caracterización de la amplificación del HER2 y TOP2A en CTCs***

La amplificación de *HER2* y *TOP2A* fue determinada mediante FISH. Las sondas multicolor para *TOP2A/HER2/CEP17* incluyen: una sonda para *TOP2A* marcada con platinumBright495 (verde), una sonda para *HER2* marcada con platinumBright550 (rojo) y una sonda para la enumeración de *CEP17* marcada con platinumBright415 (azul) (Kreatech, Durham, NC, USA) (Figura 3). Después de la incubación, deshidratación y el secado de las células, las muestras fueron co-desnaturalizadas con las sondas multicolores para *TOP2A/HER2/CEP17* durante 5 minutos a 37° C. Después de diferentes pasos de lavado, las muestras fueron contra teñidas con 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Después de la realización de la técnica de FISH, las CTCs fueron re-identificadas en base a la localización de la tinción para CK y las señales nucleares fueron cuantificadas de acuerdo al número de copias de los genes *HER2* y *TOP2A*, así como *CEP17* para cada tumor primario.

La identificación y conteo de las células tumorales fueron llevados a cabo con un microscopio de fluorescencia computerizado (Zeiss AXIO Imager; Carl Zeiss, Jena, Germany). Las células CK+ fueron identificadas en un microscopio de luz directa. Tras la detección de las células CK+ en cada muestra de forma independiente, las muestras se evaluaron de forma independiente en un microscopio de luz fluorescente para evaluar las células con expresión para CK+/EGFR/RP, CK+/RE, y el estado de CK+/*HER2* and *TOP2A*.(Figure 3)

#### ***V.9 Caracterización del CD133 mediante inmunofluorescencia en CTCs***

Después de la identificación de CTCs, las preparaciones de la centrifuga fueron teñidas para CD133 y CK para su evaluación mediante doble inmunofluorescencia (IF) siguiendo el protocolo establecidos en nuestro laboratorio. Las preparaciones de las centrifugas se incubaron con un anticuerpo policlonal



## VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

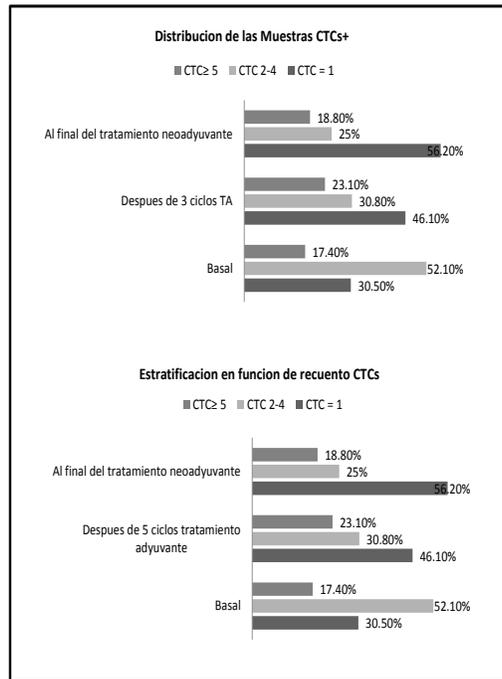
El análisis estadístico se llevó a cabo con SPSS 14.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Los datos se expresaron como medianas o porcentajes. Las variables categóricas fueron comparadas mediante el test exacto de Fisher y las variables continuas fueron comparadas mediante la t de Student. Valores de p menores de 0.05 fueran considerados estadísticamente significativos aplicando una prueba estadística de dos colas. Las odds-ratio (OR) para el modelo de regresión logística se calcularon con un intervalo de confianza (CI) del 95% para evaluar la asociación entre las variables clínico-patológicas y el estado de las CTCs y de los marcadores de interés en pacientes con cáncer de mama.

## VII. RESULTADOS

Noventa y ocho pacientes fueron incluidos en el estudio. Antes del tratamiento sistémico, se identificaron CTCs en 46 de las 98 pacientes estudiadas (46.9%). La mediana de CTCs presentes en aquellas pacientes CTCs positivas fue de 3.4 células en 30 ml de sangre (rango 1 – 19). Después de 3 ciclos de quimioterapia adyuvante, se identificaron CTCs en el 34.2% (13/28) de las pacientes que recibieron este tratamiento con una mediana de 2.6 células/30 ml (rango 1-7). Al final de la quimioterapia neoadyuvante, se detectaron CTCs en 16 de las 35 pacientes (45.7%) en este grupo. La mediana de CTCs detectadas fue de 2.6 células en 30 ml de sangre (Rango 1-9). No se hallaron diferencias entre el ratio de detección pre- o post-quimioterapia. La distribución de muestras CTCs+ en los tres tubos recogidos y la distribución de acuerdo con el recuento de CTCs se muestra en la Figura 6.

En las muestras basales, en el 56.5% de las pacientes se detectaron uno de los fenotipos estudiados: CK+/ER, CK+/EGFR/RP, o CK+/HER2/TOP2A, en 28.3% de los pacientes se detectaron 2 de los fenotipos. A pesar de analizar 30 ml de sangre, en menos de un 16% de pacientes se pudieron analizar los 3 fenotipos. Además, en aproximadamente 80% de las muestras positivas para CTCs-CK+ se detectaron 4 CTCs o menos para el análisis de los biomarcadores.

**Figure 6.**



### **VII.1 Características clínicas en relación al estado de las CTCs**

La población estudiada fue representativa de una población no seleccionada de pacientes con cáncer de mama precoz o localmente avanzada. Los regímenes de quimioterapia que fueron administrados a estas pacientes incluyeron antraciclinas (66.3%), taxanos (54.1), ciclofosfamida (100%) y 5-fluorouracilo (66.35). Trastuzumab se administró solamente a aquellas pacientes con tumores HER2+ (14.3%). Además, 72.4% de las pacientes con RH+ recibieron terapia endocrina con letrozol (44.8%), tamoxifeno (23.4%) o tamoxifeno 2-3 años seguido de exemestano (4.1%). Las características clínico-patológicas estratificadas de acuerdo con la presencia y no de CTCs basales se presentan en la Tabla 3.

Tres de las 14 pacientes con el HER2 amplificado en el tumor primario presentaron CTCs+, mientras que en el resto de pacientes HER2 positivas fueron negativas para CTCs (P = 0.046). En contraste, no existe correlación entre el estado de las CTCs y otras características clínicas en las pacientes. Las CTCs fueron indetectables en todas las muestras obtenidas en 43 pacientes (43.9%). No se encontró asociación estadística entre las siguientes características clínico-patológicas -tamaño tumoral, estado nodal, histología, estado de los RH, estado del Ki-67, p53 o tipo de cirugía- y la negatividad de CTCs indetectables. Sin embargo, se observó mayor probabilidad de no detectar CTCs en aquellas pacientes menores de 50 años (OR = 1.04, 95% CI = 1.01 to 10.8, P = 0.02), tumores G1-G2 (OR = 6.9, 95% CI =1.72 to 27.79, P = 0.006) o HER2 amplificados (OR = 0.21, 95% CI = 0.05 to 0.84, P = 0.02).

**Tabla 3.**

		<b>N(%) CTC +</b>	<b>N(%) CTC -</b>	<b>p(<math>\chi^2</math>)</b>
Edad	≤ 50	14 (41.2)	20 (58.8)	NS
	> 50	32 (50)	32 (50)	
Histología	Ductal	40 (47)	45 (53)	NS
	Others	6 (46.2)	7 (53.8)	
Clínico	≤ 2cm	25 (54.3)	21 (45.7)	NS
Tamaño Tumoral	> 2-5cm	15 (39.5)	23 (60.5)	
Patológico	pN0	9 (39.1)	14 (60.2)	NS
Estado Nodal	pN1-2	11 (61.1)	7 (38.9)	
Clínico	cN0	7 (41.2)	10 (58.8)	NS
Estado Nodal	cN positive	7 (38.9)	11 (61.1)	

Grado	I	8 (38.1)	13 (61.9)	NS
	II	15 (44.1)	19 (55.9)	
	III	20 (55.5)	16 (44.5)	
Estado Hormonal	RH+	35 (46.7)	40 (53.3)	NS
	RH -	11 (47.8)	12 (52.2)	
Estado HER2	HER2 +	3 (21.4)	11 (78.6)	0.046
	HER2 -	43 (51.2)	41 (48.8)	
Estado P53	P53 +	26 (51)	25 (49)	NS
	P53 -	7 (50)	7 (50)	
Ki67%	≤ 14%	20 (52.6)	18 (47.4)	NS
	> 14%	26 (43.3)	34 (56.7)	

## VII.2 Estado de los receptores hormonales en CTCs

La expresión de RE fue evaluada antes de empezar el tratamiento sistémico y la expresión de RE fue detectada en 10 (50%) de las CTCs-CK+. Se detectó heterogeneidad en la expresión de RE in 5/10 (50%) pacientes en las cuales se detectaron CTCs-CK+ con RE+ y RE- en la misma muestra. En 13 pacientes con tumores RE+ se detectaron CTCs antes del tratamiento sistémico y en 61.5% de ellas las CTC-CK+ aisladas fueron también positivas para RE, mientras que en el resto de pacientes se detectaron CTCs-CK+ con RE-. El estado de RP en CTCs se analizó en 27 pacientes con CTC-CK+ y 33% de estas tenían expresión nuclear para PR. También se observó heterogeneidad para la expresión de RP en un 11.1% de las pacientes. Cuando se correlacionó la expresión del RP en las CTCs y los tumores primarios correspondientes, en 68.2% (15/27) CTCs originadas en tumores primarios RP+ fueron clasificadas como CTC-CK+ RP-. En contraste, solo 7 pacientes (31.8%) con tumores positivos para el RP también tuvieron las CTC-CK+ positivas para RP. Es importante remarcar que no hubo correlación entre la expresión de

los RE y RP en CTCs y los tumores primarios de origen ( $P = 0.17$  and  $P = 0.55$ ). Además, no se observó asociación entre el estado del RE y el RP en CTCs y las características clínico-patológicas basales de las pacientes.

### **VII.3 Expresión del EGFR en CTCs**

En la muestra basal, CTCs-CK+ EGFR+ se detectaron in 27 (27.5%) de las pacientes. Después de 3 ciclos de quimioterapia y al final de este tratamiento, se detectaron CTCs-CK+ EGFR+ in 5 (13.9%) y 4 (11.1%) de las pacientes, respectivamente. No existe correlación entre el estado del EGFR en CTCs en la muestra basal y las siguientes características clínico-patológicas de las pacientes: edad, tamaño tumoral, estado nodal, histología, grado nuclear, estado de la p53 y Ki-67, así como el estado de HER2. Es importante destacar que se detectaron CTCs-CK+ con expresión positiva para EGFR en una mayor proporción de pacientes con tumores primarios que expresaban RH (33.3% versus 8.7%,  $P = 0.01$ ).

### **VII.4 Estado HER2 y TOP2A en CTCs y en los correspondientes tumores primarios**

En veinte seis pacientes con CTCs+ se evaluó el estado de *HER2* y *TOP2A* mediante FISH en al menos una CTCs en cada paciente. Antes de un tratamiento sistémico, se pudieron estudiar las CTCs de tres pacientes con tumores primarios con el *HER2* amplificado. Ninguna de estas pacientes presentaba el *HER2* amplificado en las CTCs. Entre aquellas pacientes con tumores primarios negativos para *HER2*, se clasificaron 24 pacientes como negativas para *HER2* en CTCs. En estas pacientes, solamente en un caso se detectó polisomía del Cromosoma 17 en las CTCs.

Se analizaron 26 pacientes con CTC-CK+ para conocer el estado de la *TOP2A* y en dos casos se encontró amplificación de este gen, mientras que las otras pacientes tenían el gen de la *TOP2A* nativo. EL estado de *TOP2A* fue evaluado en 11 correspondientes tumores primarios. En aquellas pacientes con tumores primarios con el gen *TOP2A* nativo, siete de estas pacientes también tenían el gen de la *TOP2A* nativo en el tumor primario, mientras que en un caso el gen

de la *TOP2A* estaba amplificado en CTCs y en otro caso se demostró polisomía del cromosoma 17. En contraste, en tres pacientes con la *TOP2A* amplificado en el tumor primario, las correspondientes CTCs tenían el gen de la *TOP2A* nativo. Ninguno de los casos con CTCs con la *TOP2A* amplificado no presentaron co-amplificación del gen *HER2*. No se demostró asociación entre el estado de estos dos genes en CTCs y su estado en los correspondientes tumores primarios. Además, no se encontró asociación entre las características clínico-patológicas de las pacientes y el estado de *HER2* y *TOP2A* en CTCs.

#### ***VII.5 Caracterización de las CTCs después del tratamiento sistémico***

Después de tres ciclos de tratamiento adyuvante, en 13 pacientes (34.2%), se detectaron CTCs. En el análisis de biomarcadores, se detectó expresión de RE en 4 de 6 pacientes con CTC positivas. Una de las CTCs-CK+ RE+ se detectó en una paciente con un tumor que era RE positivo (esta paciente era negativa para CTCs antes de un tratamiento sistémico).

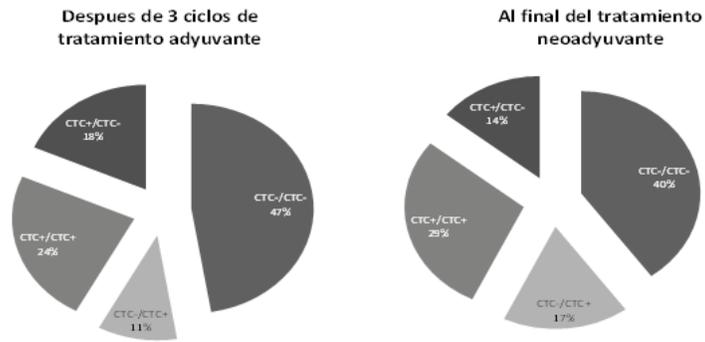
Con respecto a la expresión de RP, se detectó expresión de este marcador en cinco pacientes con CTCs-CK+. Después de 3 ciclos de tratamiento adyuvante, uno de los casos con CTCs-CK+ RP+ procedía de un tumor primario que expresaba RP, sin embargo, en la muestra basal se aisló una CTCs-CK+ RP-. En el caso del EGFR, se detectaron CTCs-CK+ EGFR+ en 5 pacientes; un paciente presentó inicialmente CTCs-CK+ EGFR+, mientras cuatro (11.1%) casos fueron EGFR – en la muestra basal. Cabe destacar que 25 (69.4%) de los casos las CTCs-CK+ fueron EGFR negativos y después de 3 ciclos de quimioterapia, 6 (16.6%) pacientes continuaron presentando CTCs-CK+ EGFR-.

Respecto al estado de *HER2* y *TOP2A*, fueron evaluados en siete pacientes con CTCs-CK+. En siete de estas pacientes, los genes *HER2* y *TOP2A* fueron normales. Entre las pacientes con tumores primarios HER2-, se detectó un caso de CTCs con co-amplificación de *HER2* y *TOP2A*.

Al final del tratamiento, CTCs-CK+ fueron detectadas en 17 (44.7%) pacientes. Expresión de RE y RP en CTCs fue detectada en 3 pacientes (85%) y en 1 paciente (44.7%) respectivamente. Cabe recalcar que 2 pacientes con CTC-CK+ RE- al finalizar el tratamiento neoadyuvante habían presentado CTC-CK+ RE+ en la muestra basal y el tumor primario también era RE+. De las 36 muestras de diferentes pacientes analizadas para la expresión del EGFR, un solo caso presentó CTCs-CK+ EGFR+ persistentes después del tratamiento sistémico, mientras que 7 (19.4%) de los casos fueron clasificados como CTCs-CK+ EGFR-. Aquellas pacientes que fueron inicialmente clasificadas como CTCs-CK+ EGFR-, 25 (69.4%) de ellas presentaron el mismo fenotipo y 3 fueron clasificadas como CTCs-CK+ EGFR+ en la muestra al final del tratamiento.

En nueve pacientes con CTCs detectables al final del tratamiento sistémico, se evaluó el estado de *HER2* y *TOP2A*. En ningún caso se encontró alteración de estos genes en las CTCs detectadas. Dos de los casos analizados presentaron al diagnóstico un tumor con *HER2* amplificado y siete eran tumores con *HER2* nativo. El estado de las CTCs antes y después del tratamiento se muestra en la Figura 7. Vale la pena remarcar que alrededor de un 30% de pacientes cambiaron el estado de las CTCs después de un tratamiento sistémico, Sin embargo, el grupo de pacientes más común en esta serie de pacientes fue aquel en el que no se pudieron detectar CTCs ni antes ni después de la quimioterapia.

**Figura 7.**



?

**El proceso de un estudio de CTC en el tratamiento de cáncer de mama**

El estudio de CTC en el tratamiento de cáncer de mama se realiza a través de un proceso de selección de pacientes que cumplen con los criterios de inclusión y exclusión. Este proceso se realiza a través de un equipo de trabajo que incluye a oncólogos, enfermeras y personal administrativo. El estudio de CTC se realiza a través de un análisis de sangre que detecta la presencia de células tumorales en la circulación sanguínea. Este análisis se realiza a través de un método de inmunofluorescencia que detecta la presencia de anticuerpos contra las células tumorales. El estudio de CTC se realiza a través de un análisis de sangre que detecta la presencia de células tumorales en la circulación sanguínea. Este análisis se realiza a través de un método de inmunofluorescencia que detecta la presencia de anticuerpos contra las células tumorales.

El estudio de CTC en el tratamiento de cáncer de mama se realiza a través de un proceso de selección de pacientes que cumplen con los criterios de inclusión y exclusión. Este proceso se realiza a través de un equipo de trabajo que incluye a oncólogos, enfermeras y personal administrativo. El estudio de CTC se realiza a través de un análisis de sangre que detecta la presencia de células tumorales en la circulación sanguínea. Este análisis se realiza a través de un método de inmunofluorescencia que detecta la presencia de anticuerpos contra las células tumorales.

	Triple Negativo	Luminal	HER2 +	p
	N(%)	N(%)	N(%)	
ER+CTCs	1 (16.7)	7 (63.6)	2 (66.7)	NS
ER-CTCs	5 (83.3)	4 (36.4)	1 (33.3)	
PR+CTCs	1(50)	8 (33.3)	0 (0)	NS
PR-CTCs	1(50)	16 (66.7)	1 (100)	
EGFR+CTCs	2 (11.1)	24 (35.8)	1 (7.7)	.03
EGFR-CTCs	16 (88.9)	43 (64.2)	12 (92.3)	
HER2+CTCs	0 (0)	0 (0)*	0 (0)	Unable to determine
HER2-CTCs	8 (100)	16 (100)	2 (100)	
TOP2A+CTCs	1 (12.5)	1 (6.3)*	0 (0)	NS
TOP2A-CTCs	7 (87.5)	15 (93.7)	2 (100)	

### VII.7 Expresión de CD133 en células tumorales de MCF-7

Células de las líneas celulares MCF-7 y H9 fueron pipeteadas en sangre periférica de voluntarios sanos. Los controles positivos y negativos fueron utilizados en el momento del análisis de CTCs para determinar la expresión de CD33 mediante IF. Las muestras se evaluaron con un microscopio computerizado de fluorescencia revelando que la expresión de CD133 es de superficie en CTCs-CK+. Los controles positivos y negativos para la expresión de CD133 y CK se muestran en la Figura 5. El análisis mediante inmunoblot del lisado de proteínas con el

anticuerpo anti-CD133 mostró que MCF-7 y H9 ( controles positivos) expresaban CD133, mientras que la expresión de CD133 fue no detectable en FLG y ADN1 (controles negativos).

#### **VII.8 Expresión de CD133 en CTCs**

Se analizó la expresión de CD133 en 20 pacientes en las que se aislaron CTCs-CK+. Los experimentos de doble tinción con anticuerpos para pan-CK y CD133 mostraron inmunofluorescencia específica para CK+ y CD133 en 13 de las 20 pacientes analizadas (65%) (Figura 5). La mediana de CTCs CK+/CD133+ fue de 1.46 células por cada 10 ml (rango 1–4). También se observó heterogeneidad en la expresión de CD133 en un 75% de las CTCs-CK+ en las pacientes que se pudieron evaluar más de una CTC (CK+/CD133+ and CK+/CD133- CTCs co-existían en la misma muestra).

Por otra parte, 73 pacientes de las 74 pacientes que recibieron quimioterapia, ya que una paciente retiró el consentimiento informado para la muestra secuencial. Veinticuatro pacientes que recibieron tratamiento endocrino como tratamiento único adyuvante y fueron excluidas del análisis de las muestras secuenciales. Con respecto al estado de CK-CD133 antes y después de quimioterapia, la presencia de células CK+ se confirmó en 17 (23.3%)s pacientes en las muestra basal y en 23 (31.5%) después del tratamiento de quimioterapia. En 10 pacientes de las 17 analizadas (58.8%) se aislaron CTCs/CK+/CD133+ en la muestra basal con una media de 1.6 células en cada 10 ml (rango 1-4). Once de las 23 (47.8%) CK+/CTCs analizadas presentaron co-expresión de CD133 con una media de 1.54 células (1 to 3 CK+/CD1331 células).

Aunque la proporción de pacientes con CTCs CK+/CD133+ fue mayor en las muestras pre-quimioterapia, no se encontraron diferencias significativas entre la proporción de CTCs CK+/CD133+ antes y después de la quimioterapia ( $p=0.53$ ). Es importante destacar de que en la población estudiada para CD133, 10.2% de las pacientes cambiaron el estado de las CTCs

después de un tratamiento sistémico y se aislaron en ellas CTCs-CK+. De estas CTCs-CK+ aisladas después de un tratamiento sistémico 5/8 (62.5%) también co-expresaron CD133.

El fenotipo más común entre las pacientes CTC-CK+ fue CTCs CK+/CD133+ pre-tratamiento y CTCs-negativas después de la quimioterapia. Cuando se analizan pacientes con CTCs-negativas pre-tratamiento y CTCs CK+/CD133+ post-tratamiento (n=6), dos de ellas presentaron una recaída precoz y una murió debido a cáncer de mama recurrente. Dado el pequeño tamaño muestral y el limitado número de eventos en los grupos, el efecto del análisis de supervivencia sería muy limitado (datos no mostrados).

**VII.9 Correlación de la expresión de CD133 en CTCs con las características clínico-patológicas**

Se estratificaron las características clínico-patológicas de acuerdo con el estado de las CTCs CK+/CD133 antes del tratamiento sistémico (Tabla 5). El estado del gen HER2 y el Ki67 fueron las dos únicas características del tumor primario que se correlacionaron con las CTCs CK+/CD133+ (p = 0.03 and 0.01, respectivamente). Los tumores con HER2 nativo y bajo índice de proliferación (Ki67 index <14%) mostraron una proporción más elevada de CTCs CK+/CD133+. No se encontró correlación entre CTCs CK+/CD133+ y el resto de características clínico-patológicas.

**Tabla 5.**

		N(%) Ck+/CD133 +	N(%) Ck+/CD133-	p( $\chi^2$ )
Edad	≤ 50	6(85.7)	1(14.3)	NS
	> 50	7 (53.8)	6 (46.2)	

Histología	Ductal	11 (68.8)	5 (31.2)	NS
	Otros	2(50.0)	2(50.0)	
Clínico Tamaño Tumoral	≤ 2cm	8 (80)	2 (20)	NS
	> 2-5cm	3 (42.9)	4 (57.1)	
	> 5cm	2 (66.7)	1 (33.3)	
Estado nodal	N0	6(60)	4(40)	NS
	N1-2	7(87.5)	7 (38.9)	
	Desconocido	0(0)	2(100)	
Grado	I	4(100)	0 (0)	NS
	II	3 (75)	1(25)	
	III	5(45.5)	6 (54.5)	
	Unknown	1(100)	0 (0)	
Estado Hormonal	RH+	10 (76.9)	3 (23.1)	NS
	RH -	3(42.9)	4(57.1)	
Estado HER2	HER2 +	13 (76.5)	4 (23.5)	0.03
	HER2 -	0 (0.0)	3 (100)	
Estado P53	P53 +	8 (80)	2 (20)	NS
	P53 –	1(50)	1(50)	
	Desconocido	4 (4)	4(50)	
Ki67%	≤ 14%	8 (100)	0 (0.0)	0.01
	> 14%	5 (41.7)	7 (58.3)	

**Princípios de Contabilidade Financeira**

Os dados da tabela são relativos ao exercício de 2018. O valor da dívida líquida em 31/12/2018 é de R\$ 6.068 milhões, sendo R\$ 3.038 milhões em dívida financeira e R\$ 3.030 milhões em dívida operacional.

De acordo com o plano de contingências, a empresa possui uma provisão para contingências de R\$ 1.000 milhões em 31/12/2018, sendo R\$ 500 milhões em contingência financeira e R\$ 500 milhões em contingência operacional. A provisão para contingências é calculada com base no valor da dívida líquida em 31/12/2018, acrescido de R\$ 500 milhões, resultando em R\$ 6.568 milhões. A provisão para contingências é calculada com base no valor da dívida líquida em 31/12/2018, acrescido de R\$ 500 milhões, resultando em R\$ 6.568 milhões. A provisão para contingências é calculada com base no valor da dívida líquida em 31/12/2018, acrescido de R\$ 500 milhões, resultando em R\$ 6.568 milhões.

**Princípios de Contabilidade**

	Contingência Operacional	Dívida Líquida	Contingência Financeira	Total
2018	R\$ 1.000 milhões	R\$ 6.068 milhões	R\$ 500 milhões	R\$ 7.568 milhões
2017	R\$ 1.000 milhões	R\$ 5.570 milhões	R\$ 550 milhões	R\$ 7.120 milhões

Os dados da tabela são relativos ao exercício de 2018. O valor da dívida líquida em 31/12/2018 é de R\$ 6.068 milhões, sendo R\$ 3.038 milhões em dívida financeira e R\$ 3.030 milhões em dívida operacional. A provisão para contingências é calculada com base no valor da dívida líquida em 31/12/2018, acrescido de R\$ 500 milhões, resultando em R\$ 6.568 milhões.

67 pacientes luminales, 43 (64.2%) fueron tratadas con quimioterapia adyuvante (n=26) o neoadyuvante (n=17) seguido de tratamiento hormonal. Siete (87.5%) pacientes tenían CTCS-CK+/CD133+ antes del tratamiento sistémico, mientras que solamente 1 (12.5%) paciente presentó CTCS-CK+/CD133-. Después del tratamiento quimioterápico, 6 (50%) de las pacientes tenían CTCS-CK+/CD133+ y 6 (50%) CTCS-CK+/CD133-. Cuando comparamos muestras pre- y post-tratamiento, no encontramos cambios significativos en la proporción de CTCS-CK+/CD133+ ( $p=0.15$ ).

Cuando se consideraron solo pacientes triple negativas, 17 (17.3%) fueron incluidas y todas habían recibido quimioterapia. Tres (50%) de estas pacientes tenían CTCS-CK+/CD133+ en la muestra pre-tratamiento y 4 (66.6%) pacientes presentaron CTCS-CK+/CD133+ post-tratamiento. No se observaron diferencias en la proporción de CTCS-CK+/CD133+ antes y después de la quimioterapia. Es importante destacar que se observó un enriquecimiento relativo de CTCS-CK+/CD133+ en las pacientes con cáncer de mama triple-negativo. Concretamente 66.6% of CTCs-CK+ co-expresaron CD133, mientras que solamente 50% de las CTCs-CK+ co-expresaban CD133 en la muestra pre-tratamiento.

En las pacientes con tumores HER2-amplificados (n=14), no se observaron CTCS-CK+/CD133+ antes del tratamiento sistémico, mientras que en 2 pacientes se detectaron CTCS-CK+/CD133-. Una de las 5 (20%) pacientes con CTCS-CK+/CD133+ y 4 (80%) de las pacientes con CTCS-CK+/CD133- fueron encontradas después de tratamiento con quimioterapia más trastuzumab. Tampoco se observaron diferencias significativas entre el porcentaje de CTCS-CK+/CD133+ antes y después del tratamiento sistémico. También se observó un enriquecimiento relativo en de CTCS-CK+/CD133+ en las pacientes con tumores HER-2 amplificados. No encontramos correlación entre CTCS-CK+/CD133+ y las características clínico-patológicas en ningún subtipo de cáncer de mama.

## VIII. DISCUSIÓN

El trabajo del análisis de cinco biomarcadores en CTCs de pacientes con cáncer de mama operable fue el primer estudio en analizar múltiples marcadores relevantes para la decisión del tratamiento sistémico en esta población de pacientes. En este trabajo, el ratio de detección de CTC en un volumen similar de sangre en las muestras basales fue similar a otros estudios en poblaciones similares usando CellSearch System (Veridex, LLC)/ En nuestro trabajo no se observaron diferencias en el recuento de CTCs las muestras de antes y después del tratamiento sistémico. Dado el número limitado de pacientes en cada grupo de tratamiento no se pueden sacar conclusiones definitivas en cuanto a los cambios de estado de CTCs en muestras pre- y post-tratamiento.

Nuestras observaciones indican que el análisis genotípico y fenotípico de las CTCs es altamente dependiente del ratio de detección en los tres diferentes tubos y el bajo número de células capturadas en el contexto de la enfermedad no-metastásicas. Es importante destacar que el umbral de 1 CTC ha demostrado valor pronóstico por otros autores en este contexto clínico – esto refleja que el sistema CellSearch presenta un rendimiento para la detección de CTCs bajo en este mismo contexto. La optimización de los ensayos para la detección de CTCs para procesamientos de alto rendimiento se requerirá para la caracterización global de CTCs y ensayos clínicos a gran escala que incluyan CTCs como parte del estudio.

Muchos estudios han intentado demostraron la correlación entre el estado de las CTCs y los parámetros clínico-patológicas, sin embargo; los datos reportados son aún controvertidos. Lang y su equipo observaron que las CTCs se aíslan más frecuentemente en pacientes con tumores HER2-amplificado, mientras que otros investigadores han encontrado que no existe asociación entre el estado de CTCs y este subtipo de cáncer de mama (149). En este estudio, las CTCs se

detectaron con más frecuencia en pacientes con HER2 nativo, mientras que otros parámetros no mostraron correlación con el estado de las CTCs.

Las muestras no detectables para CTCs se observaron en pacientes con menos de 50 años y/o con tumores HER2-amplificados y/o G1-G2. Igual que en la enfermedad metastásica, en pacientes con factores de mal pronóstico no se detectan CTCs. Estos resultados aparentemente contradictorios podrían ser explicados, al menos en parte, por la adquisición de un fenotipo mesenquimal durante la transición epitelio-mesenquima. CTCs derivadas de la EMT pueden modular su fenotipo y adquirir un fenotipo parecido al mesenquimal, difícil de detectar con los métodos basados en la detección de marcadores epiteliales. Como resultado, las pacientes en las que no se detectan CTCs y presentan factores de mal pronóstico podrían representar un grupo de pacientes con un fenotipo de TEM parcial o completa más que una población con CTCs indetectables. En esta población de pacientes, menos de un 35% de pacientes cambiaron su estado lo que sugeriría que la dinámica de las CTCs probablemente es neutral (Casos con positividad y casos con negativización de las CTCs).

Estos hallazgos divergen de los datos publicados previamente (81, 110), los cuales reportaron una ratio de detección de CTCs más baja después del tratamiento sistémico, especialmente en aquellas pacientes que han recibido tratamiento contra HER2 (110, 150). Estas discrepancias podrían explicarse, al menos en parte, por el hecho de que en nuestro estudio se analizaron 30 mL en lugar de 7.5 mL y porque el 14.3% de nuestros pacientes recibieron trastuzumab como parte de su tratamiento.

En concordancia con el estudio de Fehm y sus colegas(95), nuestros hallazgos muestran que la expresión del RE y del RP en CTCs no se correlaciona con la expresión de RE y RP en el tumor primario. En nuestro estudio se demostró que existen diferentes subpoblaciones de CTCs en la misma muestra de sangre con diferentes fenotipos con respecto a los RH.

Desafortunadamente, con los métodos basados en el análisis de RNA no podemos evaluar células de forma individual y evaluar la heterogeneidad entre las diferentes subpoblaciones de CTCs. En cambio, las técnicas basadas en IF ofrecen una caracterización más detallada de las subpoblaciones de CTCs. Por lo tanto, se podría especular que la expresión diferencial de los RH en la misma paciente podría en parte explicar diferencias en la respuesta a los tratamientos endocrinos y quimioterápicos- aunque esta asociación necesita ser evaluada más extensamente. Los cambios en el fenotipo RE/RP o la persistencia de estos fenotipos en CTCs diferentes al tumor primario se observó también en las muestras después del tratamiento sistémico. Dado que todas las pacientes con muestras secuenciales habían recibido quimioterapia, no se puede excluir que los fenotipos de las CTCs en las muestras post-quimioterapia sean influenciada por la interacción de las CTCs con la quimioterapia.

La proteína EGFR se encontró expresada en el 27% de las CTCs en las muestras basales y su expresión en CTCs se correlacionó solamente con los pacientes con tumores primarios RH+ solamente. Datos preclínicos han proporcionado evidencia de que existe asociación entre los factores de crecimiento y la vía de señalización del RE (151) puede mediar el desarrollo de resistencia a tratamientos endocrinos en la enfermedad RH+, aunque la expresión de EGFR en las células tumorales ha sido más ampliamente relacionada con los tumores triple negativos. El mecanismo biológico propuesto para explicar cómo las vías de señalización de los factores de crecimiento llevan a la resistencia a tratamientos endocrinos es controvertida(86, 152, 153). En base a nuestros hallazgos, hipotetizamos que las CTCs-CK+/CD133+ podrían representar un marcador negativo de respuesta por ejemplo a los tratamientos endocrinos en las pacientes con cáncer de mama RH+. Además, menos del 25% de pacientes con CTCs-CK+/EGFR+ se convirtieron en CTCs-CK+/EGFR- después del tratamiento, sugiriendo que tratamientos como la quimioterapia o trastuzumab podrían erradicar solo parcialmente subpoblaciones de CTCs-CK+/EGFR+.

Somos totalmente conscientes de que nuestros resultados deben ser interpretados con prudencia dado que el tamaño muestra es limitado y el número de eventos limita nuestras conclusiones.

La sobreexpresión de HER2 en CTCs en pacientes con cáncer de mama se ha caracterizado en múltiples estudios(110, 114, 126). Existen discrepancias en el estado de HER2 en CTCs y sus tumores primarios correspondientes tanto en pacientes con tumores precoces como metastásicos (110, 114). En nuestro estudio, el ratio de detección de CTC con el HER2 amplificado fue detectado mediante FISH fue nulo en las muestras basales, lo cual difiere de los datos reportados por otros grupos usando técnicas de IF. La falta de expresión de HER2 en CTCs puede ser influenciada por el hecho que las poblaciones de CTCs son heterogéneas y el análisis de un pequeño número de CTCs puede infraestimar las poblaciones HER2+. Además, las CTCs con IF clasificada como 2+ HER2 (expresión moderada de HER2) no está bien definido y podría justificar parcialmente casos CTCs-CK+/HER2-. El test óptimo para determinar el estado de HER en CTCs aún no está establecido. Aunque las técnicas de IHC son el método de evaluación para el estado de HER2, IHC y IF solamente no puede ser recomendado actualmente para seleccionar paciente para tratamientos contra HER2.

Existen estudios que han demostrado que la amplificación de *TOP2A* en los tumores de cáncer de mama no está confinado a aquellos casos que presentan amplificación concomitante de HER2, sugiriendo que una proporción de pacientes con tumores HER2- presentan alteraciones en el gen de la *TOP2A*(154, 155). En nuestro estudio, se observaron CTCs con el gen de la *TOP2A* amplificado procedente de tumores primarios HER2- - dado que el gen del *HER2* no se encontró amplificado en las CTCs- estos datos son consistentes con las observaciones en tumores primarios de cáncer de mama(155, 156) . Después de 3 ciclos de quimioterapia adyuvante, se observó en un solo caso con el tumor primario con los genes del *ErbB2* and *TOP2A* nativos y co-amplificación de *HER2* y *TOP2A* en las CTCs. Este hallazgo es consistente

con un cambio de genotipo y posiblemente una vía alternativa de señalización de la enfermedad circulante de tumores HER2-. Ya que todos los pacientes de los que se analizaron muestras secuenciales habían recibido quimioterapia, no podemos excluir que las alteraciones de *HER2* y *TOPA2* en CTCs después del tratamiento sistémico estén también influenciadas por este tratamiento. Tanto estos hallazgos, como investigaciones por parte de otros grupos, genera la hipótesis de que pacientes con cáncer de mama HER2- con CTCs con co- amplificación de los genes *HER2* y *TOPA2* podrían beneficiarse de tratamientos combinados de terapias anti-HER2 y antraciclinas.

CTCs-CK+/HER2- fueron aisladas en pacientes con tumores primarios tanto HER2- como HER2+ después de un tratamiento sistémico y trastuzumab- cuando estaba recomendado. Estos hallazgos sugieren que en las pacientes con tumores malignos de mama HER2-amplificado en las que se aíslan CTCs-CK+/HER2- después de un tratamiento con trastuzumab. Es importante destacar que los agentes anti-HER2 se administran de forma concomitante o secuencial con quimioterapia (103, 157) y el mecanismo por el cual las CTCs-CK+/HER2- persisten después de esos tratamientos es actualmente desconocido.

La selección de los tratamientos para el cáncer de mama se basa en predictores de respuesta estándar como son la expresión de RH para los tratamientos hormonales y el estado de HER2 para los tratamientos anti-HER2. De los biomarcadores evaluados en CTCs, solamente CTCs-CK+/EGFR+ fueron detectadas más frecuentemente en tumores luminales en comparación con los tumores triple-negativos y tumores HER2 amplificados. Podríamos especular que la asociación entre CTCs-CK+/EGFR+ y las pacientes luminales, sería explicado al menos parcialmente por un número elevado de células que expresan EGFR involucradas en la invasividad y la migración de células tumorales (121, 158)- a pesar de que la expresión del EGFR ha sido ampliamente relacionado con niveles bajos de RH, proliferación elevada, inestabilidad genómica y sobreexpresión de HER2(159). Aunque está por determinar, una posibilidad sería

que los tumores luminales podrían ser más dependientes de este mecanismo para su diseminación que otros subtipos de tumores malignos de mama.

En base a la evidencia de la implicación de CD133 como marcador de célula madre, en la migración celular y el proceso de VM, nuestra hipótesis fue que CD133 podría ser un marcador expresado en CTCs en pacientes con cáncer de mama no- metastásica y jugar un papel en la resistencia a quimioterapia.

En la parte del estudio en la cual se estudió la expresión de CD133 en CTCs, se demostró que una proporción elevada de CTCs-CK+ co-expresaban CD133 antes y después de la quimioterapia. La elevada incidencia de pacientes con CTCs-CK+/CD133+ resalta la importancia de esta subpoblación en el pool total de CTCs. La mayoría de las muestras con CTCs-CK+/CD133+ también contenían CTCs-CK+/CD133-. Este mismo fenómeno también se observó cuando se analizaron el RE y el RP de la misma población de pacientes. La heterogeneidad en la expresión de CD133 y RH en las CTCs apoya el concepto de heterogeneidad intratumoral, la cual, parece ser una característica generalizada en los tumores primarios y también en las CTCs. En resumen, nuestras observaciones añaden más evidencia de la naturaleza heterogénea de las CTCs de pacientes con cáncer de mama operables.

Recientemente, Park y sus colegas han mostrado que la frecuencia de marcadores de célula madre y de marcadores epiteliales -más diferenciados- varía de acuerdo con el subtipo y la histología del cáncer de mama(160). Por lo tanto, nos pareció de interés correlacionar CTCs-CK+/CD133+ con las características clínico-patológicas de las pacientes con cáncer de mama. CTCs-CK+/CD133+ fueron asociadas de forma significativa con el estado de HER2 nativo y un bajo índice de proliferación en los tumores primarios. Esta observación sugiere que la heterogeneidad genética es importante para promover la diversidad de la expresión de los marcadores de célula madre en las células tumorales.

La expresión de marcadores de célula madre en CTCs también se ha asociado a la resistencia primaria a los tratamientos anti-cáncer y al fallo del tratamiento. Consecuentemente, las CTCs con un fenotipo de célula madre podrían plantear un reto clínico a la hora de erradicar por completo la enfermedad mínima residual. En contraste con los tumores primarios, las CTCs procedentes de pacientes con enfermedad metastática que mostraron una incidencia más elevada de CTCs con un fenotipo de célula madre después de la quimioterapia(67, 161). Sin embargo, no encontramos tales diferencias en la población global en nuestro estudio. En cambio, cuando se analizó la población de pacientes de acuerdo a los subtipos tumorales, CTCs-CK+/CD133+ difirieron significativamente entre los subtipos de cáncer de mama con un porcentaje más elevado de CTCs-CK+/CD133+ en las pacientes con tumores luminales en las muestras basales. Sin embargo, estas diferencias desaparecieron en las muestras post-tratamiento sistémico. Este resultado podría a su vez explicar el enriquecimiento relativo de CTCs-CK+/CD133+ en aquellas pacientes con tumores triple negativo o con el HER2 amplificado.

De cualquier manera, estos resultados son preocupantes dado que aislamos CTCs con propiedad de célula madre tumoral después de un tratamiento sistémico incluyendo poliquimioterapia y trastuzumab en aquellas pacientes con tumores HER2+. De hecho, dos de las 4 pacientes con tumores triple negativos en las que aislamos CTCs-CK+/CD133+ después del tratamiento quimioterápico, recayeron en los dos años siguientes a la obtención de estas muestras. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que no encontramos diferencias significativas debido a la falta de seguimiento y al insuficiente tamaño muestral para detectar diferencias relacionadas con un evento que ocurre con tan poca frecuencia en el contexto de enfermedad no-metastática.

Muchos grupos han evaluado marcadores de célula madre en cáncer de mama como CD44 y ALDH1 en CTCs (67, 124, 131). Dado que CD133 juega un papel como marcador de célula madre en el cáncer de mama en estudios preclínicos; nuestras observaciones podrían ser

consistentes con los resultados de Mani y colegas(45). Este grupo mostró que las células epiteliales inducidas a entrar en el proceso de transición epitelio-mesenquimal en modelos de cáncer de mama adquieren propiedades de células madre.

El proceso de la VM describe la habilidad de células tumorales altamente agresivas para expresar genes asociados a células endoteliales y formar redes similares a neovasos. Diferentes investigadores han mostrado en cáncer de colon y melanoma que la actividad funcional de este proceso y sus implicaciones en la migración y el sembrado de células tumorales(162, 163). Aunque hasta el momento solo existe evidencia pre-clínica del papel de las células de cáncer de mama CD133+ en el proceso de VM; nuestros resultados podrían sugerir que las CTCs-CK+/CD133+ representan células con propiedades multipotenciales subyacentes al proceso de VM. Además, las propiedades migratorias y su contribución en este proceso de a las células tumorales CD133+ podría explicar la diseminación de un gran *pool* de células CTCs-CK+/CD133+ en el torrentes sanguíneo de pacientes con cáncer de mama.

Si se toman todos los datos en consideración, aun sabiendo que nuestras observaciones no son mecanísticas, las CTCs-CK+/CD133+ podrían estar implicadas en le diseminación tumoral y al final en el proceso de metastatización. De forma importante, los genes implicados en el proceso de VM podrían ser categorizados en vías de señalización asociados a señales relacionados con las células madre y la vascularización, los cuales podrían a su vez, ser dianas para terapias dirigidas. Un gente nuevo, Salinomicina disminuye la proporción de células de cáncer de mama CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup> y su uso en ratones experimentales inhibe el crecimiento tumoral '*in vivo*' (164). Específicamente, Salinomicina se dirige a las subpoblaciones de células CD133 y disminuye los rasgos malignos de líneas celulares de colon(165). Además, existe evidencia experimental de que bloquear las vías implicadas en el proceso de VM podría ser exitoso para inhibir el crecimiento tumoral. Por ejemplo, la rapamicina (un inhibidor de la vía de señalización de mTOR y VEGF), y un inhibidor de la angiogénesis que puede suprimir el proceso de VM

guiado por las células tumorales mediante la supresión del crecimiento del endotelio vascular, las metaloproteinasas de la matriz y el factor inducible mediante la hipoxia 1(166).

La interrupción de la cascada metastásica a través del tratamiento de las CTCs es una estrategia muy prometedora. La disponibilidad de tratamientos dirigidos aumenta el interés para la caracterización de las CTCs en particular en aquellas pacientes sin evidencia de enfermedad metastásica las cuales son potencialmente curables.

## IX. CONCLUSIONES

- Las CTCs de pacientes con cáncer de mama no-metastásica mostraron considerable heterogeneidad en la expresión de los RH y EGFR y la amplificación de los genes de *HER2* y *TOP2A* analizados en el trabajo de los cinco biomarcadores. Además, no se encontró correlación entre los marcadores en el tumor primario y sus correspondientes CTCs tanto antes como después de la quimioterapia.
- No se objetivo una clara asociación entre el estado de los RH, los genes *HER2* y *TOPA2* en las CTCs y los subtipos de cáncer de mama lo cual podría contribuir a la diversidad de los perfiles de expresión genética y los resultados clínicos dentro de los subtipos de cáncer de mama
- Evaluamos por primera vez la expresión de CD133 en CTCs de pacientes con cáncer de mama no metastásica, un marcador de célula madre e involucrado en la migración celular y el proceso de '*vasculogenic mimicry*'.
- La expresión de CD133 en CTCs se detectó más frecuentemente en pacientes con tumores primarios luminales en las muestras basales sugiriendo que la expresión de marcadores de células madre podría ser específica de subtipo de cáncer de mama.

- El enriquecimiento de CTCs-CK+/CD133+ en los subtipos de cáncer de mama no luminales después del tratamiento sistémico sugiere su papel potencial en el desarrollo de resistencia a tratamientos quimioterapico.
- Un estudio más extenso tanto preclínicos como clínicos serán necesarios para confirmar el papel de CD133 en la resistencia a quimioterapia y su papel como diana para tratamientos anti-células madre y anti-vasculares.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
2. De Angelis R, Sant M, Coleman MP, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, et al. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EURO CARE--5-a population-based study. *The lancet oncology*. 2014;15(1):23-34.
3. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2010;60(5):277-300.
4. Greenberg PA, Hortobagyi GN, Smith TL, Ziegler LD, Frye DK, Buzdar AU. Long-term follow-up of patients with complete remission following combination chemotherapy for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 1996;14(8):2197-205.
5. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52.
6. Pusztai L, Ayers M, Stec J, Clark E, Hess K, Stivers D, et al. Gene expression profiles obtained from fine-needle aspirations of breast cancer reliably identify routine prognostic markers and reveal large-scale molecular differences between estrogen-negative and estrogen-positive tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003;9(7):2406-15.
7. Gianni L, Zambetti M, Clark K, Baker J, Cronin M, Wu J, et al. Gene expression profiles in paraffin-embedded core biopsy tissue predict response to chemotherapy in women with locally advanced breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23(29):7265-77.
8. Gonzalez-Angulo AM, Hennessy BT, Mills GB. Future of personalized medicine in oncology: a systems biology approach. *J Clin Oncol*. 2010;28(16):2777-83.
9. Hayes DF. Prognostic and predictive factors revisited. *Breast*. 2005;14(6):493-9.

10. Hortobagyi GN, Smith TL, Legha SS, Swenerton KD, Gehan EA, Yap HY, et al. Multivariate analysis of prognostic factors in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 1983;1(12):776-86.
11. Bast RC, Jr., Ravdin P, Hayes DF, Bates S, Fritsche H, Jr., Jessup JM, et al. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol.* 2001;19(6):1865-78.
12. Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. (1869). *Aust Med J.*14:146-9.
13. Butler TP, Gullino PM. Quantitation of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma. *Cancer research.* 1975;35(3):512-6.
14. Fidler IJ. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor embolilabeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *Journal of the National Cancer Institute.* 1970;45(4):773-82.
15. Wong CW, Lee A, Shientag L, Yu J, Dong Y, Kao G, et al. Apoptosis: an early event in metastatic inefficiency. *Cancer research.* 2001;61(1):333-8.
16. Podsypanina K, Du YC, Jechlinger M, Beverly LJ, Hambardzumyan D, Varmus H. Seeding and propagation of untransformed mouse mammary cells in the lung. *Science.* 2008;321(5897):1841-4.
17. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature reviews Cancer.* 2002;2(8):563-72.
18. Yilmaz M, Christofori G. Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Molecular cancer research : MCR.* 2010;8(5):629-42.
19. Riisbro R, Christensen IJ, Piironen T, Greenall M, Larsen B, Stephens RW, et al. Prognostic significance of soluble urokinase plasminogen activator receptor in serum and cytosol of tumor tissue from patients with primary breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2002;8(5):1132-41.
20. Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Saboorian H, Haley B, et al. uPAR and HER-2 gene status in individual breast cancer cells from blood and tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2006;103(46):17361-5.
21. Friedl P, Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2009;10(7):445-57.
22. Friedl P, Wolf K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *The Journal of cell biology.* 2010;188(1):11-9.
23. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Current opinion in cell biology.* 2003;15(6):740-6.
24. Lozano E, Betson M, Braga VM. Tumor progression: Small GTPases and loss of cell-cell adhesion. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology.* 2003;25(5):452-63.
25. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature reviews Cancer.* 2009;9(4):239-52.
26. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature.* 2007;449(7162):557-63.

27. Orimo A, Gupta PB, SgROI DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 2005;121(3):335-48.
28. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 2001;410(6824):50-6.
29. Cabioglu N, Yazici MS, Arun B, Broglio KR, Hortobagyi GN, Price JE, et al. CCR7 and CXCR4 as novel biomarkers predicting axillary lymph node metastasis in T1 breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(16):5686-93.
30. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*. 2005;438(7069):820-7.
31. Psaila B, Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nature reviews Cancer*. 2009;9(4):285-93.
32. Zhan M, Zhao H, Han ZC. Signalling mechanisms of anoikis. *Histology and histopathology*. 2004;19(3):973-83.
33. Fidler IJ. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer research*. 1978;38(9):2651-60.
34. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *The American journal of pathology*. 1998;153(3):865-73.
35. Palumbo JS, Kombrinck KW, Drew AF, Grimes TS, Kiser JH, Degen JL, et al. Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells. *Blood*. 2000;96(10):3302-9.
36. Palumbo JS, Barney KA, Blevins EA, Shaw MA, Mishra A, Flick MJ, et al. Factor XIII transglutaminase supports hematogenous tumor cell metastasis through a mechanism dependent on natural killer cell function. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2008;6(5):812-9.
37. Akl EA, van Doormaal FF, Barba M, Kamath G, Kim SY, Kuipers S, et al. Parenteral anticoagulation for prolonging survival in patients with cancer who have no other indication for anticoagulation. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2007(3):CD006652.
38. Zielinski CC, Hejna M. Warfarin for cancer prevention. *The New England journal of medicine*. 2000;342(26):1991-3.
39. Fuster MM, Brown JR, Wang L, Esko JD. A disaccharide precursor of sialyl Lewis X inhibits metastatic potential of tumor cells. *Cancer research*. 2003;63(11):2775-81.
40. Kirwan CC, McDowell G, McCollum CN, Kumar S, Byrne GJ. Early changes in the haemostatic and procoagulant systems after chemotherapy for breast cancer. *British journal of cancer*. 2008;99(7):1000-6.
41. Mego M, De Giorgi U, Broglio K, Dawood S, Valero V, Andreopoulou E, et al. Circulating tumour cells are associated with increased risk of venous thromboembolism in metastatic breast cancer patients. *British journal of cancer*. 2009;101(11):1813-6.
42. Norton L. Cancer stem cells, self-seeding, and decremented exponential growth: theoretical and clinical implications. *Breast disease*. 2008;29:27-36.
43. Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S, Nguyen DX, Zhang XH, Norton L, et al. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell*. 2009;139(7):1315-26.

44. Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta anatomica*. 1995;154(1):8-20.
45. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008;133(4):704-15.
46. Hollier BG, Evans K, Mani SA. The epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells: a coalition against cancer therapies. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 2009;14(1):29-43.
47. Ota I, Li XY, Hu Y, Weiss SJ. Induction of a MT1-MMP and MT2-MMP-dependent basement membrane transmigration program in cancer cells by Snail1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(48):20318-23.
48. Bonnomet A, Brysse A, Tachsidis A, Waltham M, Thompson EW, Polette M, et al. Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 2010;15(2):261-73.
49. Shih JY, Tsai MF, Chang TH, Chang YL, Yuan A, Yu CJ, et al. Transcription repressor slug promotes carcinoma invasion and predicts outcome of patients with lung adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(22):8070-8.
50. Peinado H, Marin F, Cubillo E, Stark HJ, Fusenig N, Nieto MA, et al. Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. *Journal of cell science*. 2004;117(Pt 13):2827-39.
51. Labelle M, Schnittler HJ, Aust DE, Friedrich K, Baretton G, Vestweber D, et al. Vascular endothelial cadherin promotes breast cancer progression via transforming growth factor beta signaling. *Cancer research*. 2008;68(5):1388-97.
52. Qi J, Chen N, Wang J, Siu CH. Transendothelial migration of melanoma cells involves N-cadherin-mediated adhesion and activation of the beta-catenin signaling pathway. *Molecular biology of the cell*. 2005;16(9):4386-97.
53. Milsom C, Anderson GM, Weitz JI, Rak J. Elevated tissue factor procoagulant activity in CD133-positive cancer cells. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2007;5(12):2550-2.
54. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*. 2004;117(7):927-39.
55. Tsuji T, Ibaragi S, Shima K, Hu MG, Katsurano M, Sasaki A, et al. Epithelial-mesenchymal transition induced by growth suppressor p12CDK2-AP1 promotes tumor cell local invasion but suppresses distant colony growth. *Cancer research*. 2008;68(24):10377-86.
56. Chaffer CL, Brennan JP, Slavin JL, Blick T, Thompson EW, Williams ED. Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: role of fibroblast growth factor receptor-2. *Cancer research*. 2006;66(23):11271-8.
57. Husemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, Burghart E, et al. Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer cell*. 2008;13(1):58-68.
58. Stoecklein NH, Hosch SB, Bezler M, Stern F, Hartmann CH, Vay C, et al. Direct genetic analysis of single disseminated cancer cells for prediction of outcome and therapy selection in esophageal cancer. *Cancer cell*. 2008;13(5):441-53.
59. Weckermann D, Polzer B, Ragg T, Blana A, Schlimok G, Arnholdt H, et al. Perioperative activation of disseminated tumor cells in bone marrow of patients with prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(10):1549-56.

60. Enderling H, Hlatky L, Hahnfeldt P. Migration rules: tumours are conglomerates of self-metastases. *British journal of cancer*. 2009;100(12):1917-25.
61. Ginestier C, Liu S, Diebel ME, Korkaya H, Luo M, Brown M, et al. CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(2):485-97.
62. Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, Ulkus L, Brannigan B, Collura CV, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *The New England journal of medicine*. 2008;359(4):366-77.
63. Tarin D. New insights into the pathogenesis of breast cancer metastasis. *Breast disease*. 2006;26:13-25.
64. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2004;351(8):781-91.
65. Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, et al. 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.
66. de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(19):6302-9.
67. Aktas B, Tewes M, Fehm T, Hauch S, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast cancer research : BCR*. 2009;11(4):R46.
68. Reuben JM, Lee BN, Li C, Gao H, Broglio KR, Valero V, et al. Circulating tumor cells and biomarkers: implications for personalized targeted treatments for metastatic breast cancer. *The breast journal*. 2010;16(3):327-30.
69. Rack BKea. Use of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood of breast cancer patients before and after adjuvant chemotherapy to predict risk for relapse: the SUCCESS trial. [abstract] *J Clin Oncol*. 2010;28((15 Suppl.)):a1003.
70. Ignatiadis M, Kallergi G, Ntoulia M, Perraki M, Apostolaki S, Kafousi M, et al. Prognostic value of the molecular detection of circulating tumor cells using a multimarker reverse transcription-PCR assay for cytokeratin 19, mammaglobin A, and HER2 in early breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(9):2593-600.
71. Meo Mea. Circulating tumor cells (CTCs) and epithelial mesenchymal transition (EMT) in breast cancer: describing the heterogeneity of microscopic disease. [abstract] *Cancer Res*. 2009;69((573 Suppl.)): a3011.
72. Van der Auwera I, Peeters D, Benoy IH, Elst HJ, Van Laere SJ, Prove A, et al. Circulating tumour cell detection: a direct comparison between the CellSearch System, the AdnaTest and CK-19/mammaglobin RT-PCR in patients with metastatic breast cancer. *British journal of cancer*. 2010;102(2):276-84.

73. Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, Stopeck A, Borden E, Miller MC, et al. Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(21):6403-9.
74. Nakamura S, Yagata H, Ohno S, Yamaguchi H, Iwata H, Tsunoda N, et al. Multi-center study evaluating circulating tumor cells as a surrogate for response to treatment and overall survival in metastatic breast cancer. *Breast cancer*. 2010;17(3):199-204.
75. Nole F, Munzone E, Zorzino L, Minchella I, Salvatici M, Botteri E, et al. Variation of circulating tumor cell levels during treatment of metastatic breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2008;19(5):891-7.
76. Liu MC, Shields PG, Warren RD, Cohen P, Wilkinson M, Ottaviano YL, et al. Circulating tumor cells: a useful predictor of treatment efficacy in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(31):5153-9.
77. De Giorgi U, Valero V, Rohren E, Dawood S, Ueno NT, Miller MC, et al. Circulating tumor cells and [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography for outcome prediction in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(20):3303-11.
78. Bidard FC, Mathiot C, Degeorges A, Etienne-Grimaldi MC, Delva R, Pivot X, et al. Clinical value of circulating endothelial cells and circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients treated first line with bevacizumab and chemotherapy. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2010;21(9):1765-71.
79. Meo M. Predictive value of circulating tumor cells (CTCs) in metastatic breast cancer patients treated by bevacizumab-based therapy.[Abstract]. *Cancer Res*. 2009;69 ((Suppl,)):a3013.
80. Giordano A, Giuliano M, De Laurentiis M, Arpino G, Jackson S, Handy BC, et al. Circulating tumor cells in immunohistochemical subtypes of metastatic breast cancer: lack of prediction in HER2-positive disease treated with targeted therapy. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2012;23(5):1144-50.
81. Pierga JY, Bidard FC, Mathiot C, Brain E, Delalogue S, Giachetti S, et al. 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. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(21):7004-10.
82. Bidard FC, Mathiot C, Delalogue S, Brain E, Giachetti S, de Cremoux P, et al. Single circulating tumor cell detection and overall survival in nonmetastatic breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2010;21(4):729-33.
83. Eroles P, Bosch A, Perez-Fidalgo JA, Lluch A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer treatment reviews*. 2012;38(6):698-707.
84. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(16):2784-95.
85. Lonning PE, Eikesdal HP. Aromatase inhibition 2013: clinical state of the art and questions that remain to be solved. *Endocrine-related cancer*. 2013;20(4):R183-201.

86. Osborne CK, Schiff R. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annual review of medicine*. 2011;62:233-47.
87. Mouridsen H, Gershanovich M, Sun Y, Perez-Carrion R, Boni C, Monnier A, et al. Phase III study of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy of advanced breast cancer in postmenopausal women: analysis of survival and update of efficacy from the International Letrozole Breast Cancer Group. *J Clin Oncol*. 2003;21(11):2101-9.
88. Herynk MH, Fuqua SA. Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocrine reviews*. 2004;25(6):869-98.
89. Kurbel S. Selective reduction of estrogen receptor (ER) positive breast cancer occurrence by estrogen receptor modulators supports etiological distinction between ER positive and ER negative breast cancers. *Medical hypotheses*. 2005;64(6):1182-7.
90. Esserman LJ, Ozanne EM, Dowsett M, Slingerland JM. Tamoxifen may prevent both ER+ and ER- breast cancers and select for ER- carcinogenesis: an alternative hypothesis. *Breast cancer research : BCR*. 2005;7(6):R1153-8.
91. Garcia-Becerra R, Santos N, Diaz L, Camacho J. Mechanisms of Resistance to Endocrine Therapy in Breast Cancer: Focus on Signaling Pathways, miRNAs and Genetically Based Resistance. *International journal of molecular sciences*. 2012;14(1):108-45.
92. van de Ven S, Smit VT, Dekker TJ, Nortier JW, Kroep JR. Discordances in ER, PR and HER2 receptors after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Cancer treatment reviews*. 2011;37(6):422-30.
93. Thompson AM, Jordan LB, Quinlan P, Anderson E, Skene A, Dewar JA, et al. Prospective comparison of switches in biomarker status between primary and recurrent breast cancer: the Breast Recurrence In Tissues Study (BRITS). *Breast cancer research : BCR*. 2010;12(6):R92.
94. Aktas B, Muller V, Tewes M, Zeitz J, Kasimir-Bauer S, Loehberg CR, et al. Comparison of estrogen and progesterone receptor status of circulating tumor cells and the primary tumor in metastatic breast cancer patients. *Gynecologic oncology*. 2011;122(2):356-60.
95. Fehm T, Hoffmann O, Aktas B, Becker S, Solomayer EF, Wallwiener D, et al. 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 research : BCR*. 2009;11(4):R59.
96. Tewes M, Aktas B, Welt A, Mueller S, Hauch S, Kimmig R, et al. 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 research and treatment*. 2009;115(3):581-90.
97. Babayan A, Hannemann J, Spotter J, Muller V, Pantel K, Joosse SA. Heterogeneity of estrogen receptor expression in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients. *PloS one*. 2013;8(9):e75038.
98. Leyland-Jones B. Human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer and central nervous system metastases. *J Clin Oncol*. 2009;27(31):5278-86.
99. Pestalozzi BC, Zahrieh D, Price KN, Holmberg SB, Lindtner J, Collins J, et al. Identifying breast cancer patients at risk for Central Nervous System (CNS) metastases in trials of the International Breast Cancer Study Group (IBCSG). *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2006;17(6):935-44.

100. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235(4785):177-82.
101. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *The New England journal of medicine*. 2001;344(11):783-92.
102. Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Press M, et al. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2011;365(14):1273-83.
103. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2005;353(16):1659-72.
104. Baselga J, Bradbury I, Eidtmann H, Di Cosimo S, de Azambuja E, Aura C, et al. Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet*. 2012;379(9816):633-40.
105. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2006;355(26):2733-43.
106. Swain SM, Kim SB, Cortes J, Ro J, Semiglazov V, Campone M, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. *The lancet oncology*. 2013;14(6):461-71.
107. Perez EA. Breast cancer management: opportunities and barriers to an individualized approach. *The oncologist*. 2011;16 Suppl 1:20-2.
108. Baselga J, Perez EA, Pienkowski T, Bell R. Adjuvant trastuzumab: a milestone in the treatment of HER-2-positive early breast cancer. *The oncologist*. 2006;11 Suppl 1:4-12.
109. Puztai L, Viale G, Kelly CM, Hudis CA. Estrogen and HER-2 receptor discordance between primary breast cancer and metastasis. *The oncologist*. 2010;15(11):1164-8.
110. Riethdorf S, Muller V, Zhang L, Rau T, Loibl S, Komor M, et al. Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(9):2634-45.
111. Ignatiadis M, Rothe F, Chaboteaux C, Durbecq V, Rouas G, Criscitiello C, et al. HER2-positive circulating tumor cells in breast cancer. *PloS one*. 2011;6(1):e15624.
112. Hayes DF, Walker TM, Singh B, Vitetta ES, Uhr JW, Gross S, et al. Monitoring expression of HER-2 on circulating epithelial cells in patients with advanced breast cancer. *International journal of oncology*. 2002;21(5):1111-7.
113. Hayashi N, Nakamura S, Tokuda Y, Shimoda Y, Yagata H, Yoshida A, et al. Prognostic value of HER2-positive circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer. *International journal of clinical oncology*. 2012;17(2):96-104.
114. Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Haley B, Perkins S, et al. HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(25):9393-8.

115. Solomayer EF, Becker S, Pergola-Becker G, Bachmann R, Kramer B, Vogel U, et al. Comparison of HER2 status between primary tumor and disseminated tumor cells in primary breast cancer patients. *Breast cancer research and treatment*. 2006;98(2):179-84.
116. Esteva FJ, Guo H, Zhang S, Santa-Maria C, Stone S, Lanchbury JS, et al. PTEN, PIK3CA, p-AKT, and p-p70S6K status: association with trastuzumab response and survival in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *The American journal of pathology*. 2010;177(4):1647-56.
117. Fehm T, Muller V, Aktas B, Janni W, Schneeweiss A, Stickeler E, et al. HER2 status of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: a prospective, multicenter trial. *Breast cancer research and treatment*. 2010;124(2):403-12.
118. Pestrin M, Bessi S, Galardi F, Truglia M, Biggeri A, Biagioni C, et al. Correlation of HER2 status between primary tumors and corresponding circulating tumor cells in advanced breast cancer patients. *Breast cancer research and treatment*. 2009;118(3):523-30.
119. Sieuwerts AM, Mostert B, Bolt-de Vries J, Peeters D, de Jongh FE, Stouthard JM, et al. mRNA and microRNA expression profiles in circulating tumor cells and primary tumors of metastatic breast cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(11):3600-18.
120. Punnoose EA, Atwal SK, Spoerke JM, Savage H, Pandita A, Yeh RF, et al. Molecular biomarker analyses using circulating tumor cells. *PloS one*. 2010;5(9):e12517.
121. Goswami S, Sahai E, Wyckoff JB, Cammer M, Cox D, Pixley FJ, et al. Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer research*. 2005;65(12):5278-83.
122. Liu Z, Fusi A, Schmittl A, Tinhofer I, Schneider A, Keilholz U. Eradication of EGFR-positive circulating tumor cells and objective tumor response with lapatinib and capecitabine. *Cancer biology & therapy*. 2010;10(9):860-4.
123. Kallergi G, Agelaki S, Kalykaki A, Stournaras C, Mavroudis D, Georgoulas V. Phosphorylated EGFR and PI3K/Akt signaling kinases are expressed in circulating tumor cells of breast cancer patients. *Breast cancer research : BCR*. 2008;10(5):R80.
124. Kasimir-Bauer S, Hoffmann O, Wallwiener D, Kimmig R, Fehm T. Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells. *Breast cancer research : BCR*. 2012;14(1):R15.
125. Kalykaki A, Agelaki S, Kallergi G, Xyrafas A, Mavroudis D, Georgoulas V. Elimination of EGFR-expressing circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer treated with gefitinib. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2014;73(4):685-93.
126. Fehm T, Becker S, Duerr-Stoerzer S, Sotlar K, Mueller V, Wallwiener D, et al. 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 research : BCR*. 2007;9(5):R74.
127. Payne RE, Yague E, Slade MJ, Apostolopoulos C, Jiao LR, Ward B, et al. Measurements of EGFR expression on circulating tumor cells are reproducible over time in metastatic breast cancer patients. *Pharmacogenomics*. 2009;10(1):51-7.

128. Kallergi G, Markomanolaki H, Giannoukaraki V, Papadaki MA, Strati A, Lianidou ES, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor expression in circulating tumor cells of breast cancer patients. *Breast cancer research : BCR*. 2009;11(6):R84.
129. Yu M, Bardia A, Wittner BS, Stott SL, Smas ME, Ting DT, et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science*. 2013;339(6119):580-4.
130. Raimondi C, Gradilone A, Naso G, Vincenzi B, Petracca A, Nicolazzo C, et al. Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from breast cancer patients. *Breast cancer research and treatment*. 2011;130(2):449-55.
131. Theodoropoulos PA, Polioudaki H, Agelaki S, Kallergi G, Saridaki Z, Mavroudis D, et al. Circulating tumor cells with a putative stem cell phenotype in peripheral blood of patients with breast cancer. *Cancer letters*. 2010;288(1):99-106.
132. Dontu G, El-Ashry D, Wicha MS. Breast cancer, stem/progenitor cells and the estrogen receptor. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2004;15(5):193-7.
133. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 2007;445(7123):111-5.
134. Zhu L, Gibson P, Currle DS, Tong Y, Richardson RJ, Bayazitov IT, et al. Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation. *Nature*. 2009;457(7229):603-7.
135. Vander Griend DJ, Karthaus WL, Dalrymple S, Meeker A, DeMarzo AM, Isaacs JT. The role of CD133 in normal human prostate stem cells and malignant cancer-initiating cells. *Cancer research*. 2008;68(23):9703-11.
136. Wright MH, Calcagno AM, Salcido CD, Carlson MD, Ambudkar SV, Varticovski L. Brca1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast cancer research : BCR*. 2008;10(1):R10.
137. Meyer MJ, Fleming JM, Lin AF, Hussnain SA, Ginsburg E, Vonderhaar BK. CD44posCD49fhiCD133/2hi defines xenograft-initiating cells in estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer research*. 2010;70(11):4624-33.
138. Pece S, Tosoni D, Confalonieri S, Mazzarol G, Vecchi M, Ronzoni S, et al. Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content. *Cell*. 2010;140(1):62-73.
139. Sansone P, Storci G, Giovannini C, Pandolfi S, Pianetti S, Taffurelli M, et al. p66Shc/Notch-3 interplay controls self-renewal and hypoxia survival in human stem/progenitor cells of the mammary gland expanded in vitro as mammospheres. *Stem cells*. 2007;25(3):807-15.
140. Chen X, Lingala S, Khoobyari S, Nolte J, Zern MA, Wu J. Epithelial mesenchymal transition and hedgehog signaling activation are associated with chemoresistance and invasion of hepatoma subpopulations. *Journal of hepatology*. 2011;55(4):838-45.
141. Chen YS, Wu MJ, Huang CY, Lin SC, Chuang TH, Yu CC, et al. CD133/Src axis mediates tumor initiating property and epithelial-mesenchymal transition of head and neck cancer. *PloS one*. 2011;6(11):e28053.
142. Uchida H, Arita K, Yunoue S, Yonezawa H, Shinsato Y, Kawano H, et al. Role of sonic hedgehog signaling in migration of cell lines established from CD133-positive malignant glioma cells. *Journal of neuro-oncology*. 2011;104(3):697-704.

143. Kirschmann DA, Seftor EA, Hardy KM, Seftor RE, Hendrix MJ. Molecular pathways: vasculogenic mimicry in tumor cells: diagnostic and therapeutic implications. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(10):2726-32.
144. Liu TJ, Sun BC, Zhao XL, Zhao XM, Sun T, Gu Q, et al. CD133+ cells with cancer stem cell characteristics associates with vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer. *Oncogene*. 2013;32(5):544-53.
145. Sauter G, Lee J, Bartlett JM, Slamon DJ, Press MF. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol*. 2009;27(8):1323-33.
146. Salido M, Tusquets I, Corominas JM, Suarez M, Espinet B, Corzo C, et al. 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 research : BCR*. 2005;7(2):R267-73.
147. Gaforio JJ, Serrano MJ, Sanchez-Rovira P, Sirvent A, Delgado-Rodriguez M, Campos M, et al. Detection of breast cancer cells in the peripheral blood is positively correlated with estrogen-receptor status and predicts for poor prognosis. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2003;107(6):984-90.
148. Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF, et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10(24):8152-62.
149. Lang JE, Mosalpuria K, Cristofanilli M, Krishnamurthy S, Reuben J, Singh B, et al. HER2 status predicts the presence of circulating tumor cells in patients with operable breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2009;113(3):501-7.
150. Pierga JY, Hajage D, Bachelot T, Delaloge S, Brain E, Campone M, et al. 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. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2012;23(3):618-24.
151. Shou J, Massarweh S, Osborne CK, Wakeling AE, Ali S, Weiss H, et al. Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004;96(12):926-35.
152. Font de Mora J, Brown M. AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(14):5041-7.
153. Creighton CJ, Massarweh S, Huang S, Tsimelzon A, Hilsenbeck SG, Osborne CK, et al. Development of resistance to targeted therapies transforms the clinically associated molecular profile subtype of breast tumor xenografts. *Cancer research*. 2008;68(18):7493-501.
154. O'Malley FP, Chia S, Tu D, Shepherd LE, Levine MN, Bramwell VH, et al. Topoisomerase II alpha and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *Journal of the National Cancer Institute*. 2009;101(9):644-50.
155. Glynn RW, Mahon S, Curran C, Callagy G, Miller N, Kerin MJ. TOP2A amplification in the absence of that of HER-2/neu: toward individualization of chemotherapeutic practice in breast cancer. *The oncologist*. 2011;16(7):949-55.

156. Ejlertsen B, Jensen MB, Nielsen KV, Balslev E, Rasmussen BB, Willemoe GL, et al. HER2, TOP2A, and TIMP-1 and responsiveness to adjuvant anthracycline-containing chemotherapy in high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol*. 2010;28(6):984-90.
157. Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, Manikhas A, Lluch A, Tjulandin S, et al. Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (the NOAH trial): a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *Lancet*. 2010;375(9712):377-84.
158. Wyckoff J, Wang W, Lin EY, Wang Y, Pixley F, Stanley ER, et al. A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer research*. 2004;64(19):7022-9.
159. Rimawi MF, Shetty PB, Weiss HL, Schiff R, Osborne CK, Chamness GC, et al. Epidermal growth factor receptor expression in breast cancer association with biologic phenotype and clinical outcomes. *Cancer*. 2010;116(5):1234-42.
160. Park SY, Lee HE, Li H, Shipitsin M, Gelman R, Polyak K. Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(3):876-87.
161. Tanei T, Morimoto K, Shimazu K, Kim SJ, Tanji Y, Taguchi T, et al. Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(12):4234-41.
162. Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, Munn LL. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(26):14608-13.
163. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *The American journal of pathology*. 1999;155(3):739-52.
164. Gupta PB, Onder TT, Jiang G, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg RA, et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell*. 2009;138(4):645-59.
165. Dong TT, Zhou HM, Wang LL, Feng B, Lv B, Zheng MH. Salinomycin selectively targets 'CD133+' cell subpopulations and decreases malignant traits in colorectal cancer lines. *Annals of surgical oncology*. 2011;18(6):1797-804.
166. Su M, Feng YJ, Yao LQ, Cheng MJ, Xu CJ, Huang Y, et al. Plasticity of ovarian cancer cell SKOV3ip and vasculogenic mimicry in vivo. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2008;18(3):476-86.