

Detección de células tumorales circulantes en mujeres con cáncer de mama temprano

Detection of circulating tumor cells
in women with early breast cancer

Eunice López-Muñoz^{1a}, José Eduardo Márquez-García^{2b}, Angélica Moncada-Morales^{2c}, Coral García-Rivera^{3d}, Miguel Ángel López-Valle^{3e}, Arturo Aguilar Rojas^{1f}

Resumen

Introducción: existen múltiples métodos y biomarcadores con diferentes tasas de detección de células tumorales circulantes (CTCs) en mujeres con cáncer de mama (CaMa), sin embargo, hasta donde tenemos conocimiento, no se ha realizado un estudio de detección de CTCs en mujeres con CaMa temprano en México.

Objetivo: calcular la tasa de detección de CTCs en sangre periférica de mujeres mexicanas con CaMa temprano mediante la cuantificación de la expresión relativa de *KRT19*, *MUC1* y *SCGB2A2*.

Material y métodos: estudio observacional, longitudinal, analítico, que incluyó a 62 mujeres mexicanas, mayores de 18 años, con CaMa en etapas clínicas 0, I y II. A partir de 4 mL de sangre periférica obtenida 24 horas antes de la cirugía, se aislaron las células con densidad < 1.077 g/mL, se extrajo RNA y se efectuó RT-qPCR para cuantificar la expresión relativa de *KRT19*, *MUC1* y *SCGB2A2*.

Resultados: se confirmó el diagnóstico de CaMa en el estudio patológico definitivo en 59 mujeres. 1 caso (1.7%) expresó *KRT19*, 18 casos (30.5%) *MUC1*, 2 casos (3.4%) *SCGB2A2* y 19 casos (32.2%) expresaron al menos uno de los 3 biomarcadores.

Conclusiones: las tasas de detección de CTCs fueron similares a las reportadas en otras poblaciones cuando se usó *MUC1*, pero menores cuando se usó *KRT19* y *SCGB2A2*. Es importante la estandarización de la obtención y procesamiento de las muestras sanguíneas, así como del análisis de expresión de los biomarcadores para reducir la variabilidad en la detección de CTCs en poblaciones específicas.

Abstract

Background: There are multiple methods and biomarkers with different detection rates to circulating tumor cells (CTCs) in women with breast cancer (BC). However, to the best of our knowledge, no study has been carried out to detect CTCs in women with early BC in Mexico.

Objective: Calculate the detection rate of CTCs in peripheral blood of Mexican women with early BC by quantification of the relative expression of *KRT19*, *MUC1* and *SCGB2A2*.

Material and methods: Observational, longitudinal, analytical study, which included 62 Mexican women, over 18 years of age, with BC clinical stage 0, I and II. Cells with a density < 1.077 g/ml were isolated from 4 mL of peripheral blood obtained 24 h before surgery, RNAs were extracted and RT-qPCR was performed to quantify the relative expression of *KRT19*, *MUC1* and *SCGB2A2*.

Results: The diagnosis of BC was confirmed in the definitive pathological study in 59 women. 1 case (1.7%), expressed *KRT19*, 18 cases (30.5%) *MUC1*, 2 cases (3.4%) *SCGB2A2*, and 19 cases (32.2%) expressed at least one of the three biomarkers.

Conclusions: CTCs detection rates were like those reported in other populations when *MUC1* was used, but lower when *KRT19* and *SCGB2A2* were used. Standardization of blood sample collection and processing, as well as biomarker expression analysis, is important to reduce variability in the detection of CTCs in specific populations.

¹Instituto Mexicano del Seguro Social, Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 "Luis Castelazo Ayala", Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva. Ciudad de México, México

²Secretaría de Salud, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Subdirección de Investigación Biomédica, Unidad de Biología Molecular. Ciudad de México, México

³Instituto Mexicano del Seguro Social, Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 "Luis Castelazo Ayala", Servicio de Oncología Mamaria. Ciudad de México, México

ORCID: 0000-0002-6552-170X^a, 0000-0003-2172-0114^b, 0000-0001-7114-7550^c, 0009-0003-7367-1438^d, 0000-0001-5221-5087^e, 0000-0002-8026-0552^f

Palabras clave

Neoplasias de la Mama
Células Neoplásicas Circulantes
Biomarcadores de Tumor
ARN Mensajero

Keywords

Breast Neoplasms
Neoplastic Cells, Circulating
Biomarkers, Tumor
RNA, Messenger

Fecha de recibido: 24/05/2024

Fecha de aceptado: 31/07/2024

Comunicación con:

Eunice López Muñoz

 astridkaryme2001@yahoo.com.mx

 55 5550 6060, extensión 28039

Cómo citar este artículo: López-Muñoz E, Márquez-García JE, Moncada-Morales A *et al.* Detección de células tumorales circulantes en mujeres con cáncer de mama temprano. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2024;62(6):e6244. doi: 10.5281/zenodo.13306736

Introducción

El cáncer de mama (CaMa) es la neoplasia más frecuente en el mundo y en México. Los principales factores que influyen en su recurrencia y mortalidad son la metástasis a distancia y el estadio clínico.^{1,2} Lo anterior concuerda con lo propuesto por Fisher que sostiene que el CaMa es una enfermedad sistémica desde el momento del diagnóstico,³ por lo que se han evaluado diversos métodos para la detección temprana de células tumorales circulantes (CTCs). Las CTCs se consideran biomarcadores de enfermedad mínima residual y precursores de metástasis con potenciales implicaciones diagnósticas, terapéuticas y pronósticas.⁴ Sin embargo, dada su rareza en la circulación (1 CTC x 10⁶-10⁷ leucocitos),⁵ su aislamiento y análisis requiere de métodos accesibles, tecnología sensible y biomarcadores con alta sensibilidad y/o especificidad.⁶

Uno de los métodos para aislar CTCs de otros componentes sanguíneos que no requiere gran equipamiento se basa en las diferencias de densidad. Las células mononucleares (MNCs) y las CTCs tienen una densidad < 1.077 g/mL, mientras que el resto de las células sanguíneas tienen una densidad mayor, por lo que Ficoll-Hypaque, cuya densidad es de 1.077 g/mL, favorece la separación de estos tipos celulares, siendo la interfase la que contiene las MNCs y CTCs.⁷

En cuanto a la técnica para detectar una baja cantidad de ácido ribonucleico mensajero (mRNA) de los genes que se expresan en las células de CaMa (biomarcadores), la de mayor sensibilidad es la transcripción reversa (RT) - reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) utilizando ensayos *TaqMan* específicos (*Applied Biosystems Waltham, Massachusetts, USA*).⁵ Su efectividad en la detección de CTCs se relaciona directamente con la especificidad de los biomarcadores.⁵

En CaMa, los biomarcadores más utilizados se expresan en células epiteliales y en células mamarias^{8,9} como *KRT19* (del inglés *cytokeratin-19*), *MUC1* (del inglés *mucina 1*) y *SCGB2A2* (del inglés *mammaglobin*).^{10,11} El objetivo de este trabajo es calcular la tasa de detección de CTCs en sangre periférica de un grupo de mujeres mexicanas con CaMa temprano (estadios 0, I y II) mediante la cuantificación de la expresión relativa de *KRT19*, *MUC1* y *SCGB2A2*, ya que, hasta donde tenemos conocimiento, no se ha realizado un estudio de dicha índole en México.

Material y métodos

Diseño del estudio

Estudio observacional, longitudinal, analítico derivado de los proyectos de investigación aprobados por el Comité Local de Investigación en Salud 3606 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) con los números R-2019-3603-018 y R-2023-3606-026. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con la Declaración de Helsinki de 1964 y sus enmiendas. Todos los participantes otorgaron su consentimiento por escrito.

Población de estudio

Se incluyeron 62 mujeres mexicanas con ascendientes mexicanos en por lo menos 3 generaciones previas, mayores de 18 años, con diagnóstico histopatológico inicial de CaMa, etapa clínica 0, I y II de acuerdo con la clasificación T (Tumor), N (Ganglios) y M (Metástasis) (TNM) del *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*¹² y programadas para cirugía oncológica en la UMAE Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 "Luis Castelazo Ayala" (HGO No. 4), del IMSS, entre el 1 de enero de 2022 y el 31 de diciembre de 2023. Se excluyeron las mujeres con antecedente de otro cáncer primario, de quimioterapia o radioterapia en algún momento de su vida u hormonoterapia en los últimos 12 meses. Las mujeres en quienes no se confirmó el diagnóstico histopatológico de CaMa en la pieza quirúrgica fueron consideradas como controles sin CaMa para efectuar la cuantificación de la expresión génica. Tres semanas después de la cirugía se recolectó información sobre las variables demográficas, antropométricas, clínicas y patológicas relacionadas con el diagnóstico inicial y definitivo de CaMa (etapa clínica y patológica, diámetro tumoral clínico y patológico, tipo histológico, grado histológico,¹³ estado ganglionar, índice ganglionar metastásico, necrosis, invasión linfovascular, márgenes quirúrgicos, receptores de estrógenos [RE], receptores de progesterona [RP], HER2 [del inglés *human epidermal growth factor receptor 2*] e inmunofenotipo).^{14,15}

Muestras de sangre

Se obtuvieron 4 mL de sangre mediante punción venosa periférica 24 horas antes de la cirugía oncológica, se colectaron en tubo BD (Becton Dickinson) Vacutainer K2 EDTA (Dickinson & Company)¹⁰ y fueron procesados en los 30 minutos posteriores a la toma.

Aislamiento de células mononucleares mediante gradiente de centrifugación

En dos tubos de ensayo de poliestireno de alta calidad (13 x 100 mm) (CRM Globe) se colocaron 3 mL de *Ficoll-Paque PLUS* (GE HealthCare) y se agregaron 2 mL de sangre previamente mezclada y homogenizada suavemente por inversión. Las muestras se centrifugaron a 400 x g durante 25 minutos a 4 °C y se recolectó la interfase localizada entre el plasma y la capa de *Ficoll-Paque PLUS*. Las células se colocaron en un microtubo de polipropileno de 1.5 mL (Eppendorf SE, Hamburgo, Alemania). Se centrifugaron a 500 x g durante 10 minutos a 4 °C y se almacenaron a -20 °C por 2 horas y posteriormente a -80 °C.

Extracción de RNA

A cada tubo con células se le agregaron 50 µL de *DNA/RNA Shield* (Zymo Research Corporation, Irvine, CA, EUA). Para la extracción de RNA se utilizó un proceso automatizado con el instrumento *QIAcube* y el *RNeasy Mini Kit* (Qiagen N.V. Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras de RNA fueron eluidas en 50 µL. Se estimó la concentración del RNA en 1 µL por absorbancia ultravioleta a 260 nm y la pureza mediante una relación de absorbancia a 260/280 nm entre 1.4 y 2.4 con un *Nano-Drop 2000 spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA). Las muestras se almacenaron a -80 °C.

Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se efectuó a partir de 350 ng de RNA en un sistema de PCR ProFlex, 2 x 96 pocillos y el *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se almacenaron a -80 °C.

Amplificación del cDNA

El cDNA se amplificó por triplicado para cada muestra mediante qPCR con el equipo *StepOnePlus Real-Time PCR System* y los siguientes reactivos: *TaqMan Fast Advanced Master Mix* y *TaqMan Assay* (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA) específicos para el gen control *GAPDH* (del inglés *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) (*TaqMan GAPDH Pre-developed Assay Reagent Human*) y para los genes de interés (*TaqMan Assay Hs00761767_s1 KRT19 FAM-MGB*, *TaqMan Assay Hs00159357_m1 MUC1 FAM-MGB*, *TaqMan Assay Hs00935948_m1 SCGB2A2 FAM-MGB*), y 2 µL de cDNA

diluido en una reacción *singleplex* de 10 µL. Las condiciones de amplificación fueron: incubación a 50 °C por 2 minutos, desnaturalización inicial a 95 °C por 20 segundos, 40 ciclos de desnaturalización inicial a 95 °C por 1 segundo, seguido por alineación y extensión de un solo paso a 60 °C por 20 segundos. Los controles de la PCR incluyeron reacciones independientes en donde el cDNA fue omitido. La detección del mRNA para *GAPDH*, *KRT19*, *MUC1* y *SCGB2A2* se estimó mediante el ciclo umbral (C_T) definido por el *StepOnePlus Software v2.3*, el cual se consideró como detección positiva cuando fue < 40.

Cuantificación de la expresión génica

Se realizó cuantificación relativa de la expresión génica mediante el método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$ donde $= [C_T \text{ de } KRT19, MUC1 \text{ o } SCGB2A2 - C_T \text{ de } GAPDH]$ casos de CaMa - $[C_T \text{ de } KRT19, MUC1 \text{ o } SCGB2A2 - C_T \text{ de } GAPDH]$ controles sin CaMa,¹⁶ y se consideraron con positividad a CTCs aquellos casos cuya expresión fue mayor a 0 en cualquiera de los tres biomarcadores.

Análisis estadístico

Se calculó el tamaño de muestra necesario para un estudio descriptivo, con un rango de expresión esperado para *SCGB2A2* del 8¹⁷ al 75%,¹⁸ un margen de error del 5%, un intervalo de confianza (IC) del 95% y una población aproximada de 400 mujeres con CaMa temprano atendidas anualmente en la UMAE HGO No. 4 del IMSS, estimándose 39 casos.

Los datos se capturaron y analizaron con el programa informático SPSS v.25.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EUA). Se realizó estadística descriptiva de acuerdo con el tipo de variable y para los datos cuantitativos según su distribución (previa prueba de Kolmogorov-Smirnov). Se comparó la expresión relativa de *MUC1* según el estadio clínico y patológico mediante prueba de Kruskal-Wallis y se evaluó el coeficiente de correlación de Spearman de la expresión relativa de *MUC1* con el tamaño tumoral clínico, patológico e índice ganglionar metastásico.

Resultados

Características de la población de estudio

En 59 de las 62 mujeres se confirmó el diagnóstico de CaMa en el estudio patológico definitivo, mientras que en 3 mujeres se diagnosticó adenosis esclerosante, tumor phy-

lodos limítrofe y ausencia de tumor, respectivamente, por lo que fueron consideradas como controles sin CaMa para la cuantificación relativa de la expresión génica. No se observaron diferencias significativas en la mediana de la edad (55 [28 - 67] frente a 62 [37 - 63] años; $p = 0.618$), mediana del IMC (28.71 [19.05 - 38.67] frente a 26.01 [23.24 - 28.62] Kg/m²; $p = 0.147$) y frecuencia del antecedente heredo-familiar de cáncer (40.7 frente a 33.3%; $p = 1.0$) entre las mujeres con y sin CaMa, respectivamente.

La media del tamaño tumoral clínico fue de 15 ± 6 mm y el tamaño tumoral patológico fue de 15.8 ± 8.2 mm. La frecuencia de la etapa clínica y patológica del CaMa se muestra en el cuadro I.

La clasificación histológica fue de tipo único en 33 casos (55.9%) y de tipo mixto en 26 casos (44.1%). Los tipos histológicos más frecuentes fueron carcinoma ductal invasor en 43 casos (72.8%), carcinoma lobulillar infiltrante en 12 casos (20.3%), carcinoma ductal *in situ* en 5 casos (8.4 %) o con componente ductal *in situ* en 13 casos (22.0%), otros tipos (carcinoma canalicular infiltrante, mucinoso invasor, comedo, tubular, sólido o células en anillo de sello) en 8 casos (13.55%). La frecuencia de los hallazgos patológicos en la pieza quirúrgica se muestra en el cuadro II.

El estado positivo de los RE y RP, el estado negativo de HER2 y el inmunofenotipo luminal A fueron los más frecuentes (cuadros III y IV).

Cuadro I Etapa clínica y patológica del CaMa

Etapa patológica	Etapa clínica					
	0		I		II	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
0	5	71.4	0	0.0	0	0.0
I	2	28.6	21	58.3	3	20.0
II	0	0.0	11	30.6	9	60.0
III	0	0.0	4	11.1	3	20.0

Cuadro II Hallazgos patológicos del CaMa en la pieza quirúrgica

	<i>n</i>	%
Grado histológico	1	18.6
	2	61.0
	3	20.3
Necrosis	No	86.4
	Sí	13.6
Invasión linfovascular	No	50.8
	Sí	49.2
Márgenes quirúrgicos	Negativos	89.8
	Positivos	10.2

Cuadro III Estado de los receptores hormonales y HER2

	<i>n</i>	%
RE	Negativo	13.6
	Positivo	86.4
RP	Negativo	8.5
	Positivo	91.5
HER2	Negativo	86.4
	Positivo	13.6

RE: receptores de estrógenos; RP: receptores de progesterona

Cuadro IV Inmunofenotipo

	<i>n</i>	%
Inmunofenotipo	HER2	3.4
	Luminal A	74.6
	Luminal B HER2 negativo	6.8
	Luminal B HER2 positivo	10.2
	Triple negativo	5.1

Cuantificación y análisis de la expresión génica

Se observó expresión positiva para *KRT19* en un caso (1.7%), para *MUC1* en 18 casos (30.5%) y para *SCGB2A2* en dos casos (3.4%). La coexpresión de los biomarcadores se observó en un caso (1.7%) que expresó *MUC1* y *SCGB2A2*, y un caso que expresó *KRT19* y *MUC1* (1.7%), es decir que 19 mujeres (32.2%) expresaron al menos uno de los biomarcadores.

Después de la etapificación patológica, 52 mujeres continuaron siendo clasificadas como CaMa temprano, de las cuales ningún caso expresó *KRT19*, 16 casos (30.8%) expresaron *MUC1* y 2 casos (3.4%) *SCGB2A2*. La coexpresión de los biomarcadores se observó en un caso (1.9 %) que expresó *MUC1* y *SCGB2A2*, es decir, 17 mujeres (32.7%) expresaron al menos 1 de los biomarcadores.

Al evaluar la asociación de la expresión de *MUC1* con marcadores clínicos o patológicos de pronóstico en CaMa, no se observaron diferencias estadísticamente significativas según el estadio clínico ($p = 0.594$) o patológico ($p = 0.475$) y tampoco se observó correlación estadísticamente significativa con el tamaño tumoral clínico ($Rho = -0.104$, $p = 0.700$) o patológico ($Rho = -0.133$, $p = 0.599$) y el índice ganglionar metastásico ($Rho = -0.095$, $p = 0.707$).

Discusión

En este estudio cuantificamos la expresión relativa de

KRT19, *MUC1* y *SCGB2A2* para detectar CTCs en sangre periférica de mujeres mexicanas con CaMa temprano. Observamos que las tasas de positividad fueron menores a las reportadas en otras poblaciones cuando se usó individualmente *KRT19* (5.95 a 47.8%)^{9,19} y *SCGB2A2* (8 a 75%),¹⁸ y similares cuando se usó *MUC1* (20.3 a 28%).²⁰

Esta situación puede deberse a los siguientes factores:

1. El momento de la detección de las CTCs. En nuestro estudio fue previo al tratamiento quirúrgico y al inicio de quimioterapia o radioterapia, mientras que en otros estudios se ha realizado antes del inicio de la quimioterapia, pero entre 2 y 4 semanas después de la cirugía.⁹ Existe evidencia que la manipulación durante la cirugía oncológica puede permitir la entrada de células de CaMa a la circulación y su diseminación,¹⁸ con un incremento en los valores de expresión de los biomarcadores después de la cirugía.
2. La cantidad de sangre. En nuestro estudio se obtuvieron 4 mL de sangre sin desecho de muestra, mientras que en la mayoría de los estudios la cuantificación se ha realizado en 5 a 20 mL de sangre periférica, lo que incrementa la posibilidad de detectar más CTCs.
3. La sensibilidad y especificidad de los biomarcadores. En nuestro estudio seleccionamos como biomarcadores de CTCs a *KRT19*, *MUC1* y *SCGB2A2* por las siguientes razones:

KRT19 codifica para una proteína que se expresa de forma estable y abundante en la mayoría de las células epiteliales tumorales. Sin embargo, como marcador único tiene una tasa alta de falsos positivos que ha sido atribuida a la alta sensibilidad de la técnica que permite la detección de expresión ilegítima de *KRT19* en células mononucleares de la sangre o, incluso, de células de la piel que ingresan a la muestra al momento de la punción.¹⁹ La primera se ha resuelto con el diseño de sondas específicas y la segunda ha tratado de ser resuelta mediante el desecho de los primeros 3 a 8 mL de sangre recolectados.⁹ En nuestro estudio, similar a lo reportado por Milukova *et al.* y Oloomi *et al.*,^{21,22} no desechamos mL de sangre para efectuar la cuantificación. Consideramos que el método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ajusta la cuantificación de biomarcadores como *KRT19*, ya que toma en consideración un nivel basal de expresión en función de un gen control constitutivo y un nivel de expresión basal de *KRT19* derivado de células de la piel, que, en teoría, todas las muestras (con y sin cáncer) deberían tener. En nuestros datos al realizar el análisis de la expresión de *KRT19* sin el método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_T}$, todas las muestras serían catalogadas con expresión positiva; sin embargo, al sustraer el valor de la expresión en muestras

sin CaMa a las muestras con CaMa se ajustó el valor de expresión final, siendo positivo en un solo caso.

Independientemente de lo anterior, hasta donde tenemos conocimiento no hay estudios en CaMa que hayan demostrado diferencias en la expresión de los biomarcadores de células epiteliales en los primeros 3 a 8 mL en comparación con los 5 a 20 mL siguientes como para justificar el desecho de los primeros. Sin embargo, proponemos que, en caso de no desechar los primeros 3 a 8 mL de sangre periférica, es de suma importancia efectuar la sustracción del nivel de expresión en sangre de cada uno de los biomarcadores en individuos sin cáncer de mama (sanos o con tumores benignos) al valor de expresión en sangre periférica de los casos con cáncer de mama, particularmente cuando se utilizan biomarcadores de células epiteliales. Lo anterior con la finalidad de restar el valor de expresión de las células epiteliales de piel que pudieron ingresar a la muestra durante la punción.

Por otro lado, aunque el torniquete venoso facilita la punción de la vena periférica, dicha acción modifica temporalmente la resistencia y la presión coloidosmótica dentro del vaso, provocando que el agua y las sustancias de bajo peso molecular se desplacen del espacio extracelular al intersticio celular con aumento en la concentración de la sangre en los primeros mL obtenidos antes de la liberación del torniquete y una disminución en los mL siguientes.²³ El desecho de los primeros mL pudiera reducir el número de CTCs, de por sí raras en la circulación, y hacer necesaria la recolección de una mayor cantidad de sangre.

En cuanto a *SCGB2A2*, codifica para la proteína mamoglobina con expresión en glándula mamaria y sobreexpresión en CaMa.^{19,24} Es uno de los biomarcadores más específicos para la detección de CTCs, aunque se ha reportado variabilidad en su expresión con 59 a 100% en CaMa lobulillar y 25 a 94% en CaMa invasivo de tipo no específico.^{11,25} Como marcador único puede pasar por alto CTCs provenientes de tumores mamarios negativos a su expresión.^{11,26} En nuestro estudio no efectuamos la determinación de la expresión de *SCGB2A2* en tejido tumoral, por lo que desconocemos la proporción de mujeres en quienes no se esperaría expresión en sangre periférica. Por otro lado, se ha reportado una prevalencia de expresión de este marcador en sangre de mujeres con CaMa temprano a metastásico del 8 al 60%,²⁶ lo que pudiera explicar la baja frecuencia identificada en nuestro estudio al tratarse exclusivamente de CaMa temprano.

Respecto a *MUC1*, codifica una proteína anormalmente expresada en la mayoría de los adenocarcinomas, incluyendo cáncer de mama.²⁷ La expresión alterada de las mucinas se ha relacionado con el desarrollo, crecimiento, diferenciación, transformación, adhesión, invasión, metás-

taxis y vigilancia inmune en cáncer, lo que hace que *MUC1* sea un biomarcador altamente específico para la detección de CTCs. El uso de *MUC1*, al igual que *SCGB2A2* como marcador único, puede pasar por alto la detección de CTCs en casos con CaMa que no la expresan, aunque en una proporción considerablemente menor (en el 9 al 10%). Consideramos que por esta razón, la prevalencia de expresión de *MUC1* que observamos fue similar a la reportada en otros estudios de CTCs en CaMa.

4. Variaciones individuales y poblacionales en la expresión génica. Las variaciones en la secuencia del DNA y las modificaciones epigenéticas pueden alterar las tasas de transcripción y producir variaciones naturales en los niveles de expresión génica entre individuos y, por lo tanto, entre poblaciones.²⁸ Aun cuando nuestro estudio se realizó en mujeres con ascendientes mexicanos, existe la posibilidad de variación en los niveles de expresión génica con respecto a otras poblaciones, ya que en México hay altos niveles de mestizaje y variaciones debidas a diferencias en la contribución ancestral europea, amerindia y, en menor proporción, africana.²⁹

Sin embargo, cuando se utilizaron los tres biomarcadores en conjunto se incrementó la tasa de detección de CTCs, siendo de 32.2% y 32.7% en los casos que clínica y patológicamente fueron confirmados con CaMa temprano, respectivamente. Dicha tasa es similar a la reportada cuando se usa un ensayo multimarcador que incluya *MUC1*.²¹

Por último, nuestros resultados fueron similares a los reportados para la mayoría de los biomarcadores de células epiteliales¹⁹ al no observar asociación estadísticamente significativa de la expresión de *MUC1* con el estadio clínico, patológico, tamaño tumoral o patológico en cáncer de mama temprano.

Conclusiones

Las tasas de detección de CTCs para cada marcador de forma individual fueron menores a las reportadas cuando se usó *KRT19* y *SCGB2A2*, pero similares cuando se usó *MUC1*. La tasa de detección de CTCs del conjunto de biomarcadores fue de 32.2% y 32.7% en las mujeres mexicanas que clínica y patológicamente fueron confirmadas con CaMa temprano, similares a las reportadas para algunas poblaciones.

La detección y caracterización de CTCs en sangre periférica de pacientes con CaMa temprano mediante RT-qPCR de *KRT19*, *MUC1* o *SCGB2A2* pudiera tener impacto clínico en la estratificación de riesgo en CaMa temprano, detección oportuna y monitorización de recurrencia después de un tratamiento exitoso en CaMa temprano, predicción de respuesta a tratamiento adyuvante y, en general, en la toma de decisiones terapéuticas antes o durante el inicio de la enfermedad metastásica.

Sin embargo, pudiera ser necesaria la identificación de biomarcadores adicionales, así como hacer énfasis en la importancia de estandarizar la obtención y procesamiento de las muestras sanguíneas y el método de análisis de expresión que se utilizará en cada uno de los grupos poblacionales específicos.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a la Coordinación de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social por el financiamiento otorgado al proyecto R-2019-3606-018 y a la Dra. Génesis García Ibarra por su apoyo en la recolección de los datos histopatológicos.

Declaración de conflicto de interés: los autores han completado y enviado la forma traducida al español de la declaración de conflictos potenciales de interés del Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas, y no fue reportado alguno que tuviera relación con este artículo.

Referencias

1. Dillekas H, Rogers MS, Straume O. Are 90% of deaths from cancer caused by metastases? *Cancer Med*. 2019;8(12):5574-6. doi: 10.1002/cam4.2474
2. Brewster AM, Hortobagyi GN, Broglio KR, et al. Residual risk of breast cancer recurrence 5 years after adjuvant therapy. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(16):1179-83. doi: 10.1093/jnci/djn233
3. Fisher B. Laboratory and clinical research in breast cancer--a personal adventure: the David A. Karnofsky memorial lecture. *Cancer Res*. 1980;40(11):3863-74.
4. Stathopoulou A, Vlachonikolis I, Mavroudis D, et al. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *J Clin Oncol*. 2002;20(16):3404-12. doi: 10.1200/JCO.2002.08.135
5. Mostert B, Sleijfer S, Foekens JA, et al. Circulating tumor cells (CTCs): detection methods and their clinical relevance in breast cancer. *Cancer Treat Rev*. 2009;35(5):463-74. doi: 10.1016/j.ctrv.2009.03.004

6. Zhang J, Chen K, Fan ZH. Circulating Tumor Cell Isolation and Analysis. *Adv Clin Chem*. 2016;75:1-31. doi: 10.1016/bs.acc.2016.03.003
7. Morgan TM, Lange PH, Vessella RL. Detection and characterization of circulating and disseminated prostate cancer cells. *Front Biosci*. 2007;12:3000-9. doi: 10.2741/2290
8. Iakovlev VV, Goswami RS, Vecchiarelli J, et al. Quantitative detection of circulating epithelial cells by Q-RT-PCR. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;107(1):145-54. doi: 10.1007/s10549-007-9532-9
9. Park HS, Han HJ, Lee S, et al. Detection of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients Using Cytokeratin-19 Real-Time RT-PCR. *Yonsei Med J*. 2017;58(1):19-26. doi: 10.3349/ymj.2017.58.1.19
10. Van der Auwera I, Peeters D, Benoy IH, et al. Circulating tumour cell detection: a direct comparison between the Cell-Search System, the AdnaTest and CK-19/mammaglobin RT-PCR in patients with metastatic breast cancer. *Br J Cancer*. 2010;102(2):276-84. doi: 10.1038/sj.bjc.6605472
11. Gorbokon N, Timm P, Dum D, et al. Mammaglobin-A Expression Is Highly Specific for Tumors Derived from the Breast, the Female Genital Tract, and the Salivary Gland. *Diagnostics (Basel)*. 2023;13(6). doi: 10.3390/diagnostics13061202
12. Amin MB, Greene FL, Edge SB, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(2):93-9. doi: 10.3322/caac.21388
13. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991;19(5):403-10. doi: 10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x
14. 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 (unabridged version). *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134(7):e48-72. doi: 10.5858/134.7.e48
15. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013;31(31):3997-4013. doi: 10.1200/JCO.2013.50.9984
16. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101-8. doi: 10.1038/nprot.2008.73
17. Ignatiadis M, Kallergi G, Ntoulia 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. *Clin Cancer Res*. 2008;14(9):2593-600. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4758
18. Brown DC, Purushotham AD, Birnie GD, et al. Detection of intraoperative tumor cell dissemination in patients with breast cancer by use of reverse transcription and polymerase chain reaction. *Surgery*. 1995;117(1):95-101. doi: 10.1016/s0039-6060(05)80235-1
19. Grunewald K, Haun M, Urbanek M, et al. Mammaglobin gene expression: a superior marker of breast cancer cells in peripheral blood in comparison to epidermal-growth-factor receptor and cytokeratin-19. *Lab Invest*. 2000;80(7):1071-7. doi: 10.1038/labinvest.3780112
20. Hepp P, Andergassen U, Jager B, Trapp E, Alunni-Fabroni M, Friedl TW, et al. Association of CA27.29 and Circulating Tumor Cells Before and at Different Times After Adjuvant Chemotherapy in Patients with Early-stage Breast Cancer - The SUCCESS Trial. *Anticancer Res*. 2016;36:4771-6.
21. Mikulova V, Cabinakova M, Janatkova I, et al. Detection of circulating tumor cells during follow-up of patients with early breast cancer: Clinical utility for monitoring of therapy efficacy. *Scand J Clin Lab Invest*. 2014;74:132-42. doi: 10.3109/00365513.2013.864784
22. Oloomi M, Bouzari S, Mohagheghi MA, et al. Molecular markers in peripheral blood of Iranian women with breast cancer. *Cancer Microenviron*. 2013;6(1):109-16. doi: 10.1007/s12307-012-0118-7
23. Secomb TW. Hemodynamics. *Compr Physiol*. 2016;6(2):975-1003. doi: 10.1002/cphy.c150038
24. Cheng M, Chen Y, Zou D, et al. The clinical utility of circulating tumor cells in breast cancer patients: detection by a quantitative assay of h-MAM gene expression. *Int J Biol Markers*. 2014;29(3):e268-78. doi: 10.5301/ijbm.5000065
25. Milosevic B, Stojanovic B, Cvetkovic A, et al. The Enigma of Mammaglobin: Redefining the Biomarker Paradigm in Breast Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2023;24(17). doi: 10.3390/ijms241713407
26. Li G, Zhang J, Jin K, et al. Human mammaglobin: a superior marker for reverse-transcriptase PCR in detecting circulating tumor cells in breast cancer patients. *Biomark Med*. 2011;5(2):249-60. doi: 10.2217/bmm.11.20
27. Sun K, Chen P, Yan S, et al. Ultrasensitive Nanopore Sensing of Mucin 1 and Circulating Tumor Cells in Whole Blood of Breast Cancer Patients by Analyte-Triggered Triplex-DNA Release. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2021;13(18):21030-9. doi: 10.1021/acsaami.1c03538
28. Storey JD, Madeoy J, Strout JL, et al. Gene-expression variation within and among human populations. *Am J Hum Genet*. 2007;80(3):502-9. doi: 10.1086/512017
29. Silva-Zolezzi I, Hidalgo-Miranda A, Estrada-Gil J, et al. Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(21):8611-6. doi: 10.1073/pnas.0903045106