
Trabajos Originales

PREMIO BIOQUÍMICO DRA. JOSEFINA VARELA ACCESIT

Células tumorales circulantes en pacientes con carcinoma mamario: detección de mamaglobina A

Dr. Sergio Ghersevich¹, Lic. Paula Ceballos¹, Dra. Lorena Tozzi², Bioq. Carlos Zumoffen¹, Dr. Germán Cipulli², Dr. Carlos Capitaine Funes², Alfonso Benítez Gil³, Dr. Cristian Morales⁴, Dr. Roberto Tozzini²

¹Laboratorio de Estudios Reproductivos. Área Bioquímica Clínica. Facultad Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR

²Servicio de Mastología, Hospital Provincial del Centenario, Rosario.

³Servicio de Mastología, Hospital Provincial, Rosario.

⁴Servicio de Mastología, Hospital Eva Perón, Granadero Baigorria.

Dirección postal: Dr. Sergio Ghersevich, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR Suipacha 531. (2000) Rosario, Email: sghersev@fbioyf.unr.edu.ar

Resumen

Aproximadamente el 30% de las pacientes con carcinoma mamario desarrollan metástasis. La proteína denominada mamaglobina A (MGA) es parte de la familia de las secretoglobinas y su expresión es altamente específica del epitelio mamario normal y neoplásico. Con el objetivo de detectar células tumorales circulantes se investigó la expresión de MGA en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama de los hospitales provinciales de la zona de Rosario, y se analizó la correlación entre la detección de MGA y la presencia de metástasis ganglionares, el tamaño tumoral, y la presencia de receptores hormonales en el tumor. Las células nucleadas de sangre venosa de las pacientes (n=54) o de los donantes sanos (n=15) se obtuvieron mediante un gradiente de densidad de Percoll. El ARN total de cada muestra se aisló mediante el reactivo TriZol. La expresión de MGA se detectó mediante RT-PCR, con cebadores específicos para amplificar una secuencia de 201 bp del ADNc. Como control positivo se utilizó ARN obtenido

de tejido de mama normal. El análisis de correlación se realizó mediante el uso de tablas de contingencia aplicando el test de Fisher. No se encontró asociación significativa entre la detección de la MGA y el compromiso ganglionar axilar (p=0.7), el tamaño tumoral (p=0.7) o la presencia de receptores de estrógenos (p=0.1) o de progesterona (p=0.7). No se detectó MGA en ninguna de las muestras de sangre de individuos sanos indicando alta especificidad. La detección de MGA podría ser un marcador pronóstico independiente de la enfermedad, y podría contribuir en la evaluación del tipo de tratamiento a brindar a las pacientes.

Introducción

El cáncer esporádico surge principalmente a partir de mutaciones en células somáticas, y es el resultado de un desarreglo genético, acumulado a través del tiempo¹. El cáncer puede desarrollar el proceso de metástasis tumoral, que comprende la diseminación de células neoplásicas, por vía sanguínea o linfática, a sitios

secundarios, cercanos o distantes, donde proliferan para formar una masa extravascular de células tumorales². Se estima que solamente 1 de cada 10⁵-10⁶ células neoplásicas diseminadas va a ingresar a tejidos distantes del tumor primario, y que sólo un pequeño porcentaje de estas células, va a desarrollar una enfermedad metastásica^{3,4}. Las células tumorales circulantes (CTC) incluyen células quiescentes o dormidas y microresiduos celulares desprendidos del tumor primario⁵.

El carcinoma mamario sigue siendo el tipo de cáncer más frecuentemente diagnosticado en las mujeres alrededor del mundo, y se encuentra entre las principales causas de muerte por cáncer en la mujer^{6,7}. A pesar de las mejoras en la detección y en el tratamiento del cáncer de mama, aproximadamente un 30-40 % de las pacientes finalmente fallece por la enfermedad. El desarrollo de una enfermedad metastásica es la principal causa de estas muertes⁸. Las CTC serían detectables antes del desarrollo de metástasis⁹.

Las células de cáncer de mama expresan comúnmente varios marcadores como las citoqueratinas, el antígeno carcinoembriogénico, el CA 15.3, el receptor del factor de crecimiento epidérmico y el c-erbB-2, entre otros^{8,10}. Sin embargo, estos marcadores presentan una sensibilidad y/o especificidad insuficiente para detectar CTC provenientes del carcinoma mamario¹¹.

En 1996 Watson y Fleming aislaron el ADNc de la mamaglobina A (MGA), obtenido a partir de una muestra de adenocarcinoma mamario¹². La mamaglobina exhibe homología con varias proteínas secretorias epiteliales, formando así parte de la superfamilia de las secretoglobinas^{13,14}. La MGA y la mayoría de los otros miembros humanos de la superfamilia se localizan en el cromosoma 11q12.3-13.1, donde se encuentran de manera agrupada^{13,15}. Estudios previos sugieren que la expresión de MGA no estaría asociada con la lactancia sino con la proliferación de la glándula mamaria y la diferenciación terminal¹³. Sin embargo, hasta el día de hoy la función de la MGA continúa siendo desconocida¹⁶.

Entre los factores pronóstico en el cáncer de mama, la presencia o ausencia de metástasis en los ganglios linfáticos es el más importante a la hora de decidir el tratamiento a seguir en dicho cáncer^{17,18}. Respecto del tamaño tumoral, un tumor de diámetro máximo de 2 cm implica un pronóstico y una supervivencia mejores que si se lo compara con tumores más grandes¹⁹. En tanto que las pacientes con tumores que expresan receptores de estrógeno y de progesterona, presentan un mejor pronóstico que aquellas con receptores hormonales negativos²⁰.

En este estudio se investigó la expresión de MGA en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama de los hospitales provinciales de la zona de Rosario, con el objetivo de detectar CTC. Además se analizó la correla-

ción entre la detección de MGA y la presencia de metástasis ganglionares, el tamaño tumoral, y la presencia de receptores hormonales en los tumores estudiados.

Materiales y Métodos

Pacientes

Se utilizaron muestras de sangre de pacientes con cáncer de mama (sin antecedentes familiares de cáncer ginecológico), que concurren a los servicios de Patología Mamaria de los Hospitales Centenario y Provincial de la ciudad de Rosario, y del Hospital Eva Perón de Granadero Baigorria. Dichas muestras se obtuvieron por punción venosa y se colectaron en tubos con heparina, al realizarse el diagnóstico de cáncer. Se utilizaron, además, muestras de tejido de mama normal de pacientes sometidas a mamoplastías y muestras de sangre heparinizada de donantes sanos.

En todos los casos se solicitó el consentimiento escrito de las pacientes o de los donantes para el uso de las muestras con fines de investigación. El presente trabajo fue aprobado por el Comité de Bioética del Hospital Provincial del Centenario de Rosario.

Separación de células nucleadas de circulación periférica

Las células nucleadas de sangre venosa de las pacientes o de los donantes sanos se obtuvieron mediante un gradiente de densidad de Percoll. La preparación de las soluciones de Percoll (Fluka, Steinheim, Alemania) se adaptó del manual de instrucciones de Amersham Biosciences²¹. Se recuperaron las células de la interfase entre el Percoll y la sangre por aspiración con pipeta Pasteur. Luego de los lavados, se utilizó el pellet con las células para la extracción del ARN total.

Obtención del ARN total

El ARN total de cada muestra de células y de tejido mamario normal se aisló mediante el reactivo comercial TriZol (según recomendaciones del fabricante). La concentración y la pureza de las muestras de ARN se estimaron mediante mediciones de absorbancia en un espectrofotómetro Ultrospec 2000 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) a las longitudes de onda de 260 y 280 nm.

Detección de la expresión de MGA

La expresión de MGA se detectó mediante RT-PCR. La retrotranscripción se llevó a cabo utilizando la transcriptasa reversa M-MLV (Promega, Madison, WI, USA). La amplificación del ADNc de MGA se realizó mediante una PCR anidada, utilizando la enzima Taq ADN polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), con 2 pares de cebadores específicos para amplificar una secuencia de 201 bp del ADNc²². Como control positivo en la RT-PCR

se utilizó también ARN obtenido de tejido de mama normal. Como control de contaminación se utilizó H₂O en lugar de las muestras. Se utilizó además la amplificación de β -actina como control de la RT-PCR. La amplificación de β -actina se realizó con cebadores específicos (Biodynamics, Buenos Aires, Argentina) para obtener un fragmento de 289 bp. Los productos se analizaron en geles de agarosa al 2% y se tiñeron con bromuro de etidio. Los geles se visualizaron por fluorescencia en un transiluminador UV (UVI tec, Cambridge, MA, USA). Como marcador de peso molecular se empleó el marcador CienMarker (100-1000 pb, Biodynamics, Buenos Aires, Argentina).

Análisis estadístico

El análisis de correlación entre la presencia de MGA en sangre periférica de las pacientes y los factores pronósticos investigados se realizó mediante el uso de tablas de contingencia aplicando el test exacto de Fisher. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

Características de las pacientes

Se evaluaron muestras de sangre provenientes de 54 pacientes con cáncer de mama. En la tabla 1 se indican las características de los tumores del grupo de pacientes estudiadas.

La expresión de MGA se detectó en el 40,7 % (22/54) del total de muestras de pacientes analizadas (figura 1). La figura 2 muestra los resultados del análisis de las muestras de 3 de las pacientes estudiadas. En ninguna de las muestras de sangre de individuos sanos se detectó la expresión de MGA. En todas las muestras estudiadas se encontró la expresión de β -actina (figura 3).

El 39,1 % (9/23) de las pacientes con metástasis en ganglios axilares y el 44 % (11/25) de las pacientes sin metástasis ganglionar presentaron MGA.

De las pacientes que presentaron un tamaño tumoral > 2 cm, un 43,5 % (10/23) eran MGA (+).

Un 61,5 % (8/13) de las pacientes con receptores de estrógeno negativos y un 36,4 % (8/22) con receptores de progesterona negativos, expresaron el marcador en sangre.

No se encontró asociación significativa entre la detección de MGA y el compromiso ganglionar axilar ($p=0.77$), el tamaño tumoral ($p=0.77$) o la presencia de receptores de estrógenos ($p=0.09$) o de progesterona ($p=0.76$) (tabla 2).

Discusión

El curso clínico de las pacientes podría estar afectado negativamente por la presencia de CTC en san-

gre periférica, no detectadas fácilmente con las técnicas anatomopatológicas tradicionales¹⁶. La posibilidad de detectar una diseminación maligna en sus etapas iniciales sería muy valiosa, debido a que podría tener implicaciones pronósticas y terapéuticas importantes³. La mamaglobina A sería un candidato prometedor como marcador pronóstico de cáncer de mama, considerando su especificidad tumoral y su sensibilidad, permitiendo la detección de CTC en sangre de pacientes con carcinoma mamario primario y metastásico²³.

En el presente estudio la expresión de MGA se detectó en sangre periférica en el 40,7 % de las pacientes. Por el contrario, MGA no se detectó en muestras de sangre de individuos sanos, confirmando una alta especificidad para MGA como marcador de células derivadas de tejido mamario. Estos resultados coinciden con los reportados por trabajos previos que demuestran la especificidad del marcador, al detectar el mismo en las pacientes con carcinoma mamario pero no en los individuos sanos²²⁻²⁵.

En este estudio no se encontraron asociaciones significativas entre la presencia de MGA en sangre periférica de las pacientes y otros factores pronósticos del tumor, lo cual concuerda con resultados obtenidos por otros autores^{11,22-25}. Es importante destacar que un 44 % de las pacientes que no presentaron metástasis ganglionar resultaron positivas para MGA, indicando que aun en ausencia de metástasis ganglionar las CTC son detectables. Este hecho, sumado a que MGA sería un marcador independiente, apoya la potencial utilidad de MGA para detectar CTC en sangre de pacientes con cáncer de mama no metastásico.

Respecto de los receptores hormonales, un 61,5 % de las pacientes con receptores de estrógeno negativos, expresaron el marcador MGA. Si bien existió una tendencia hacia una mayor expresión de MGA en pacientes sin receptores de estrógeno (factor pronóstico desfavorable), la asociación no alcanzó a ser significativa. Estos resultados concuerdan con la tendencia descrita por Lin y col.²⁵.

Los resultados de este trabajo apoyan la hipótesis de que MGA es un marcador independiente de los factores pronósticos tradicionalmente utilizados en el cáncer de mama. La detección de la expresión del ARNm de MGA en sangre periférica de pacientes con carcinoma mamario como marcador de CTC, principalmente en pacientes sin evidencia de enfermedad metastásica, podría contribuir en el manejo terapéutico de las pacientes, en el seguimiento luego de la cirugía y en la elección del tratamiento a seguir para prevenir la recidiva de la enfermedad.

En conclusión, la determinación de MGA mostró una gran especificidad para detectar células tumorales

Tabla 1: Características tumorales de las pacientes con carcinoma mamario antes del tratamiento. %: porcentaje de tumores que presentaron la característica indicada.

Característica	%	Característica	%
Tipo de tumor		Tamaño tumoral, cm	
Mucoso	1,9	≤ 2	51,9
Ductal	75,5	> 2	48,1
Medular	5,7	Receptor de Estrógeno	
Lobular	16,9	Positivo	74,5
Metástasis Ganglionar		Negativo	25,5
Negativa	50,9	Receptor de Progesterona	
Positiva	49,1	Positivo	52,9
		Negativo	47,1

Tabla 2: Análisis de asociación entre la expresión de MGA y las características tumorales analizadas. MGA (+) y MGA (-): número de pacientes que expresó o no el marcador respectivamente, dentro de la característica indicada. *p*: probabilidad.

	MGA (+)	MGA (-)	<i>P</i>
Metástasis Ganglionar			0,77
Negativa	11	14	
Positiva	9	14	
Tamaño tumoral, cm			0,77
≤ 2	10	16	
> 2	10	13	
Receptor de Estrógeno			0,09
Positivo	11	23	
Negativo	8	5	
Receptor de Progesterona			0,76
Positivo	11	14	
Negativo	8	14	

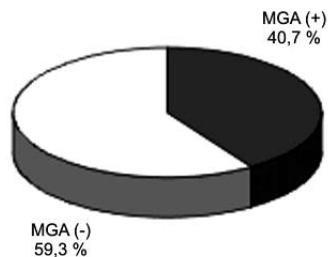


Figura 1: Expresión de MGA en las muestras de sangre de las pacientes analizadas.

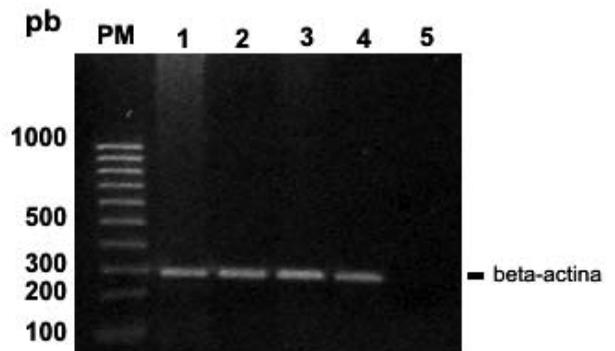


Figura 2: Expresión de la MGA detectada mediante RT-PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 2 %, teñido con bromuro de etidio. Muestras utilizadas: calle 1: H₂O, calles 2, 3 y 4: ADNc provenientes de muestras de sangre de 3 pacientes, calle 5: ADNc proveniente de una muestra de tejido de mama normal. MGA: indica la banda correspondiente al producto de MGA. PM: patrón de peso molecular, pb: pares de bases.

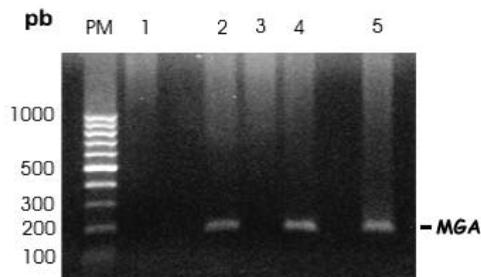


Figura 2: Expresión de la MGA detectada mediante RT-PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 2 %, teñido con bromuro de etidio. Muestras utilizadas: calle 1: H₂O, calles 2, 3 y 4: ADNc provenientes de muestras de sangre de 3 pacientes, calle 5: ADNc proveniente de una muestra de tejido de mama normal. MGA: indica la banda correspondiente al producto de MGA. PM: patrón de peso molecular, pb: pares de bases.

circulantes, al encontrarse presente en pacientes con carcinoma mamario y ausente en individuos sanos, y sería un marcador pronóstico independiente para establecer el avance de la enfermedad. La detección de MGA podría contribuir en la elección del tipo de tratamiento a suministrar a pacientes aún con ausencia de metástasis ganglionares y con otros factores pronósticos favorables.

Bibliografía

1. Sandal T. Molecular aspects of the mammalian cell cycle and cancer. *Oncologist* 2002;7:73-81

Welch DR. Do we need to redefine a cancer metastasis and staging definitions? *Breast Dis* 2006;26:3-12

2. Fabisiwicz A, Kulik J, Kober P, Brewczynska E, Pienkowski T, Siedlecki JA. Detection of circulating breast cancer cells in peripheral blood by a two-marker reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Acta Biochim Pol* 2004;51:747-55

3. Ring A, Smith IE, Dowsett M. Circulating tumour cells in breast cancer. *Lancet Oncol* 2004;5:79-88

4. Jiang WG, Martin TA, Mansel RE. Molecular detection of micro-metastasis in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002;43:13-31

5. Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, Doyle GV, Matera J, Allard WJ, Miller MC, Fritsche HA, Hortobagyi GN, Terstappen LWMM. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:1420-30

6. Chen CC, Hou MF, Wang JY, Chang TW, Lai DY, Chen YF, Hung SY, Lin SR. Simultaneous detection of multiple mRNA markers CK19, CEA, c-Met, Her2/neu and hMAM with membrane array, an innovative technique with a great potential for breast cancer diagnosis. *Cancer Lett* 2006;240:279-88

7. Lacroix M. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 2006;13:1033-67

8. Reinholz MM, Nibble A, Jonart LM, Kitzmann K, Suman VJ, Ingle JN, Houghton R, Zehentner B, Roche PC, Lingle WL. Evaluation of a panel of tumor markers for molecular detection of circulating cancer cells in women with suspected breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:3722-32

9. Grünwald K, Haun M, Urbanek M, Fiegl M, Müller-Holzner E, Gunsilius E, Dünser M, Marth C, Gastl G. Mammaglobin gene expression: a superior marker of breast cancer cells in peripheral blood in comparison to epidermal-growth-factor receptor and cytokeratin-19. *Lab Invest* 2000;80:1071-7

10. Suchy B, Austrup F, Driesel G, Eder C, Kusiak I, Uciechowski P, Grill HJ, Giesing M. Detection of mam-

maglobin expressing cells in blood of breast cancer patients. *Cancer Lett* 2000;158:171-8

11. Watson MA, Fleming TP. Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer. *Cancer Res* 1996;56:860-5

12. Watson MA, Darrow C, Zimonjic DB, Popescu NC, Fleming TP. (1998) Structure and transcriptional regulation of the human mammaglobin gene, a breast cancer associated member of the uteroglobin gene family localized to chromosome 11q13. *Oncogene* 1998;16:817-24

13. Klug J, Beier HM, Bernard A, Chilton BS, Fleming TP, Lehrer RI, Miele L, Pattabiraman N, Singh G. Uteroglobin/Clara cell 10-kDa family of proteins: nomenclature committee report. *Ann N Y Acad Sci* 2000;923:348-54

14. Ni J, Kalff-Suske M, Gentz R, Schageman J, Beato M, Klug J. All human genes of the uteroglobin family are localized on chromosome 11q12.2 and form a dense cluster. *Ann N Y Acad Sci* 2000;923:25-42

15. Gargano G, Agnese V, Calò V, Corsale S, Augello C, Bruno L, La Paglia L, Gullo A, Ottini L, Russo A, Fulfaro F, Rinaldi G, Crosta A, Cicero G, Majorana O, Palmeri L, Cipolla C, Agrusa A, Gulota G, Morello V, Di Fede G, Adamo V, Colucci G, Tomasino RM, Valerio MR, Bazan V, Russo A. Detection and quantification of mammaglobin in the blood of breast cancer patients: can it be useful as a potential clinical marker? Preliminary results of a GOIM (Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale) prospective study. *Ann Oncol* 2006;17:vii41-vii45

16. Mirza AN, Mirza NQ, Vlastos G, Singletary SE. Prognostic factors in node-negative breast cancer. A review of studies with sample size more than 200 and follow-up more than 5 years. *Ann Surg* 2002;235:10-26

17. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, Ruby SG, O'Malley F, Simpson JF, Connolly JL, Hayes DF, Edge SB, Lichter A, Schnitt SJ. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:966-78

18. Hurtado Estrada G, Sánchez Forgach E, Miranda Hernández H, Mares Corona JN, Medina Villaseñor E, Grifaldo Maldonado BI, González Parra JF. Factores de pronóstico en cáncer de mama. *Gamo* 2004;3:28-32

Hayes DF, Isaacs C, Stearns V. Prognostic factors in breast cancer: current and new predictors of metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001;6:375-92

19. Amersham Biosciences (2001) Percoll: Methodology and Applications, edición AC. Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden

20. Zach O, Kasparu H, Krieger O, Hehenwarter W, Girschikofsky M, Lutz D. Detection of circulating ma-

mmary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients via a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for mammaglobin mRNA. *J Clin Oncol* 1999;17:2015-9

21. Ntoulia M, Stathopoulou A, Ignatiadis M, Malamos N, Mavroudis D, Georgoulas V, Lianidou ES. Detection of mammaglobin A-mRNA-positive circulating tumor cells in peripheral blood of patients with operable breast cancer with nested RT-PCR. *Clin Biochem* 2006;39:879-87

22. Cerveira N, Torres L, Rocha P, Bizarro S, Pereira D, Abreu J, Henrique R, Teixeira MR, Castedo S. Highly sensitive detection of the MGB1 transcript (mammaglobin) in the peripheral blood of breast cancer patients. *Int J Cancer* 2004;108:592-5

23. Lin YC, Chen SC, Hsueh S, Lo YF, Chow-Wu YH, Liaw IC, Cheng AJ. Lack of correlation between expression of human mammaglobin mRNA in peripheral blood and known prognostic factors for breast cancer patients. *Cancer Sci* 2003;94:99-102