

Trabajo Fin de Grado

Nuevas estrategias en el manejo del glioblastoma
basadas en las células tumorales circulantes

New strategies for the management of glioblastoma based on
circulating tumor cells

Autor: Carlos Fabio Lorente Calvo

Directora: Sara Oliván García

Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza

Curso 2017/2018

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN/PALABRAS CLAVE	2
ABSTRACT/KEY WORDS	3
INTRODUCCIÓN	4
OBJETIVOS	6
MATERIAL Y MÉTODOS	7
REVISIÓN	8
1. EL GLIOBLASTOMA MULTIFORME	8
1.1 Aspectos epidemiológicos	8
1.2 Aspectos anatomopatológicos	9
1.2 Clasificación	11
2. LAS CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES	13
3. TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE CTCs	17
3.1 Detección de marcadores específicos de superficie	18
3.2 Adenovirus telomerasa	19
3.3 CTC-iChip	20
3.4 CEP8-FISH para la detección de la aneuploidía del cromosoma 8	22
4. APLICACIONES DE LAS CTCs EN EL MANEJO DEL GBM	23
4.1 Monitorización de respuesta al tratamiento	23
4.2 Diagnóstico diferencial de recurrencia tumoral frente a radionecrosis o pseudoprogresión tras radioterapia	24
4.3 Sistema inmune y CTCs	27
CONCLUSIONES	29
BIBLIOGRAFÍA	32

RESUMEN

El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor intracraneal primario más frecuente y, a su vez, el que peor pronóstico tiene debido a su elevada malignidad, con una media de supervivencia que apenas supera el año. Se trata de un tumor que puede aparecer *de novo* o desarrollarse sobre una lesión preexistente.

Actualmente, el principal tratamiento para el GBM consiste en la resección quirúrgica del tumor, siempre que sea posible, seguido por la aplicación de radioterapia y un tratamiento adyuvante de quimioterapia con temozolamida. Sin embargo, la respuesta al tratamiento es poco satisfactoria, siendo un tumor con una elevada tasa de recurrencia postquirúrgica y con un elevado riesgo de necrosis tras la aplicación de la radioterapia.

El aislamiento y caracterización de las células tumorales circulantes (CTCs) es un aspecto de creciente interés ya que podría estar estrechamente relacionado con el manejo de los pacientes con GBM. En la actualidad se están desarrollando técnicas más sensibles y específicas para poder aislar y estudiar estas células de sangre periférica. Dentro de estas nuevas tecnologías destacan los que se basan en el reconocimiento de marcadores de superficie o genes específicos para estas células, así como sistemas basados en mecanismos microfluídicos, como los CTC-iChip. También el empleo de métodos para la detección de células tumorales basados en adenovirus, que localizan la actividad telomerasa incrementada, o el análisis mediante FISH de la poliploidía del cromosoma 8 son algunas de estas tecnologías.

Estos sistemas de detección podrían jugar un papel fundamental en algunos aspectos clínicos significativos del manejo del GBM, como podrían ser la respuesta al tratamiento quimioterápico, principalmente con temozolomida, así como el pronóstico de la enfermedad o la diferenciación entre recurrencia y radionecrosis podrían ser analizados en función de los CTCs presentes en la sangre de los pacientes.

PALABRAS CLAVE

GBM, CTC, biomarcador, CTC-iChip, CEP8-FISH, monitorización

ABSTRACT

GBM (glioblastoma multiforme) is the most frequent primary intracranial tumor, and in turn, the one with the worst prognosis due to its high malignancy, with an average survival of just over a year. It is a tumor that can appear de novo or develop over a preexisting lesion.

The main treatment for GBM is surgical resection of the tumor whenever possible, followed by radiotherapy and adjuvant treatment of chemotherapy with temozolamide. However, the response to treatment is unsatisfactory, being a tumor with a high postoperative recurrence rate and with a high risk of necrosis after radiotherapy.

The isolation and characterization of circulating tumor cells (CTCs) is an aspect of growing interest since it could be closely related to the management of patients with GBM. At present, more sensitive and specific techniques are being developed to isolate and study these peripheral blood cells. These new technologies include those based on the recognition of surface markers or genes specific for these cells, as well as systems based on microfluidic mechanisms, such as the CTC-iChip. Also the use of methods for the detection of tumor cells based on adenoviruses, which localize the increased telomerase activity, or the analysis by FISH of the polyploidy of chromosome 8 are some of these technologies.

These detection systems could play a fundamental role in some significant clinical aspects of the management of GBM, such as the response to chemotherapy treatment, mainly with temozolomide, as well as the prognosis of the disease or the differentiation between recurrence and radionecrosis could be analyzed in function of the CTCs present in the blood of patients.

KEY WORDS

GBM, CTC, biomarker, CTC-iChip, CEP8-FISH, monitoring.

INTRODUCCIÓN

El GBM ocupa un lugar preeminente dentro de los tumores del sistema nervioso central, siendo el tumor cerebral más frecuente en la población adulta, contando con un pico de incidencia entre los 45 y los 60 años.

Se distingue clásicamente entre GBM primario y secundario, dependiendo de si el tumor aparece *de novo* o sobre una lesión ya existente. La WHO (World Health Organization) clasifica al GBM en: GBM IDH-wildtype (90%), GBM IDH-mutant (10%) y GBM NOS, en función de su perfil genético y de la existencia o no de lesiones preexistentes.

La característica histológica de este tumor es la presencia de un elevado índice mitótico en las células con confluencia de áreas sanas con zonas de tejido tumoral sobre el que se desarrolla una neovascularización defectuosa, que favorece un entorno de hipoxia. Su histología junto con su progresión rápida, convierten al GBM en uno de los tumores más agresivos que existe actualmente, siendo su media de supervivencia de apenas un año desde que el paciente ha sido diagnosticado.

Actualmente, el tratamiento del GBM se centra en la cirugía, asociada a radioterapia y quimioterapia con administración de temozolamida. Este abordaje terapéutico conlleva no obstante limitaciones importantes. Por una parte, no siempre es posible realizar cirugía debido a la anatomía cerebral, caracterizada por su delicadeza; y, por otra parte, a que la eficacia de la temozolamida queda menguada por el desarrollo de resistencias por parte de las células tumorales. Este hecho justifica el gran esfuerzo que se está realizando para conseguir, como mínimo, la mejora de la oscura perspectiva que plantea este tumor.

Las CTCs son células liberadas por el tumor primario y por las regiones metastásicas que se localizan en sangre periférica. Estas células poseen un tremendo potencial en la comprensión del proceso en cascada de la metástasis de tumores sólidos, desde el propio paso de éstas a la sangre hasta la detección clínica de la metástasis.

Si bien es excepcional que el GBM genere metástasis, estas células circulantes pueden ser detectadas en sangre y otorgarnos una información de gran valor como predictor del comportamiento del tumor, adelantándonos a su comportamiento y mejorando sustancialmente, por tanto, el manejo desde el punto de vista terapéutico.

Distintos métodos de detección han sido desarrollados en los últimos años con el objetivo de crear un test no invasivo que localice de forma precoz en la sangre a estas CTCs. De entre todas las estrategias de localización de estas células, una de las técnicas que mejores resultados han estado dando sería el método integrado de detección de la poliploidía del cromosoma 8 mediante CEP8-FISH. Esta tecnología ha mejorado enormemente el ratio de detección positiva en muchos tipos de tumores, no sólo en el GBM, dado que la poliploidía en este cromosoma se encuentra presente en la mayoría de los tumores sólidos. Pese a que la detección y relevancia clínica de las CTCs en el GBM ha sido poco discutida hasta el momento, gracias al desarrollo de la tecnología experimental, se han podido llevar a cabo grandes avances en este campo. Las investigaciones apuntan a que las CTCs podrían encontrarse en todos los subtipos patológicos de glioma y no ser únicamente una propiedad intrínseca del GBM, siendo consecuentemente de gran valor en la aplicación clínica.

De esta forma, la detección y cuantificación de las CTCs con una simple extracción de sangre permitiría dar un gran paso en el manejo del paciente afectado por GBM; ya que se llevaría a cabo un seguimiento de la evolución de la enfermedad, la monitorización de respuesta al tratamiento y el diagnóstico diferencial entre recurrencia y radionecrosis tras el tratamiento con radioterapia.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es analizar las estrategias que se están desarrollando para la detección de las CTCs procedentes del GBM, así como el estudio de dichas células para llevar a cabo un correcto manejo de la enfermedad.

De modo más específico se podrían definir los siguientes objetivos:

- Conocer las características del GBM: su clasificación y sus principales rasgos histológicos, así como su evolución, su comportamiento y las causas que hacen que este tumor sea tan agresivo.
- Estudiar las CTCs en el GBM: su comportamiento migratorio desde el tumor principal, su actividad en el organismo y por qué son tan diferentes a las células circulantes de otros tumores.
- Analizar los principales métodos de detección de las CTCs existentes hasta el momento: funcionamiento, marcadores empleados, ventajas y limitaciones existentes en los modelos actuales.
- Conocer las posibles aplicaciones clínicas de las CTCs. Su utilidad en la monitorización del comportamiento del GBM y en el manejo del tratamiento de los pacientes, así como su papel en el diagnóstico diferencial entre radionecrosis o pseudoprogresión tumoral y recidiva.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización del presente trabajo, se ha llevado a cabo una revisión sistemática de la literatura disponible relacionada con las CTCs y el GBM. Para ello, se han utilizado distintas bases de datos del ámbito biomédico como Medline, PubMed y Scieloo, además de consultar revistas clínicas, como la española Elsevier, libros de texto como The WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System (cuarta edición, 2016) y páginas webs oficiales de la Sociedad Española de Neurología (www.sen.es) y de la American Brain Tumor Association (www.abta.org).

La búsqueda se ha realizado exclusivamente en inglés, filtrando los resultados a aquellos documentos publicados en los últimos ocho años y accesibles a texto completo de manera gratuita. Se han utilizado principalmente dos operadores booleanos “AND” y “OR” para acotar la búsqueda a palabras clave en las bases de datos.

El principal criterio de exclusión ha sido prescindir de aquellos artículos que pese a estar relacionados con el tema de búsqueda, tenían un año de publicación que excedía los ocho años.

1. EL GLIOBLASTOMA MULTIFORME

1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

El GBM es el tumor primario más frecuente del sistema nervioso central, caracterizado por ser altamente agresivo, de rápido crecimiento, infiltrante y de frecuente recurrencia. Se origina a partir de los astrocitos, que son las células de sostén del sistema nervioso. Su incidencia se estima en 2-3 casos por cada 100.000 habitantes y año. Se puede presentar a lo largo de toda la vida; sin embargo, es más frecuente en la sexta y séptima décadas de la vida, con una mayor incidencia en el sexo masculino.^{1,15.}

Respecto a su localización, se trata de un tumor con predilección por la zona supratentorial, afectando sobre todo a los lóbulos parietal y temporal. Su aparición es excepcional en pacientes pediátricos, pero si aparece suele localizarse preferentemente en la fosa posterior.¹

Corresponde a un tumor de grado IV según la clasificación de la WHO, es decir, su grado de malignidad es el más alto. Esta clasificación se basa en la existencia o no de una lesión preexistente, así como en el perfil genético e histológico tumoral. Una de sus principales características, que lo definen como letal, es la extrema rapidez de crecimiento infiltrativo, siendo capaz de llevar a cabo la invasión y migración a otras zonas del cerebro en un escaso período de tiempo. Pese a ello, el GBM rara vez metastatiza.^{1,15.}

En cuanto a la semiología, puede agruparse dentro de dos grupos: la general y la topográfica, dependiente de la localización del cáncer. La semiología general engloba la clínica secundaria al aumento de la presión intracraneal de forma rápida: cefalea, que típicamente aparece por la mañana o por la noche, de intensidad moderada-grave, muy influenciada por los cambios posturales, que

interrumpe el sueño del paciente; náuseas, vómitos, convulsiones y somnolencia. El edema papilar es un hallazgo clínico muy característico del síndrome de hipertensión intracraneal que puede aparecer en la mitad de los pacientes. Sin embargo, es la localización del tumor la que determinará de forma capital la aparición de otros síntomas: hipostesias o parestesias hemilaterales, visión borrosa, y el conjunto de alteraciones mentales como los cambios en la personalidad, depresión, trastornos cognitivos, del lenguaje y de la memoria reciente y otras funciones superiores. Cabe destacar que el GBM no ofrece síntomas exclusivos, sino que más bien todos los gliomas ofrecen unos hallazgos similares; si bien, sí que es característico en este cáncer el empeoramiento y el deterioro cerebral de rápida progresión.¹⁵

Como consecuencia de esta gran agresividad, la media de supervivencia es de unos 10-12 meses y con menos del 30% de los pacientes vivos a los 2 años del diagnóstico. La supervivencia está muy influenciada por factores pronósticos, como la edad o el estado funcional del paciente, que probablemente afectan la decisión y modalidad de tratamiento ofrecida al mismo. Dicho tratamiento consistente habitualmente en cirugía para reseca el tumor seguida de radioterapia y quimioterapia con temozolamida concomitante y adyuvante.¹

1.2 ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS

Desde el punto de vista histológico, en este tipo de lesiones es característica la presencia de un elevado número de mitosis y áreas de neovascularización con fenómenos de trombosis que forman vasos anómalos “agujereados” (figura 1A). También la presencia de áreas de necrosis con núcleos de las células tumorales en empalizada (figura 1B) y una intensa proliferación endotelial, llegando a la formación de vasos de aspecto glomeruloide (figura 1C); así como una importante heterogeneidad en la muestra de la biopsia. Otros hallazgos microscópicos factibles son la presencia de células lipidizadas, células gigantes multinucleadas y células granulares. Además de la presencia de áreas de tejido con distintos grados de diferenciación, encontrando focos de neovascularización, elevada densidad celular, abundantes núcleos

atípicos y elevado índice mitótico frente a otros focos sin vasos neoformados y con células tumorales solitarias invasoras de tejido sano, siendo precisamente éstas últimas las que juegan el papel infiltrante del GBM.

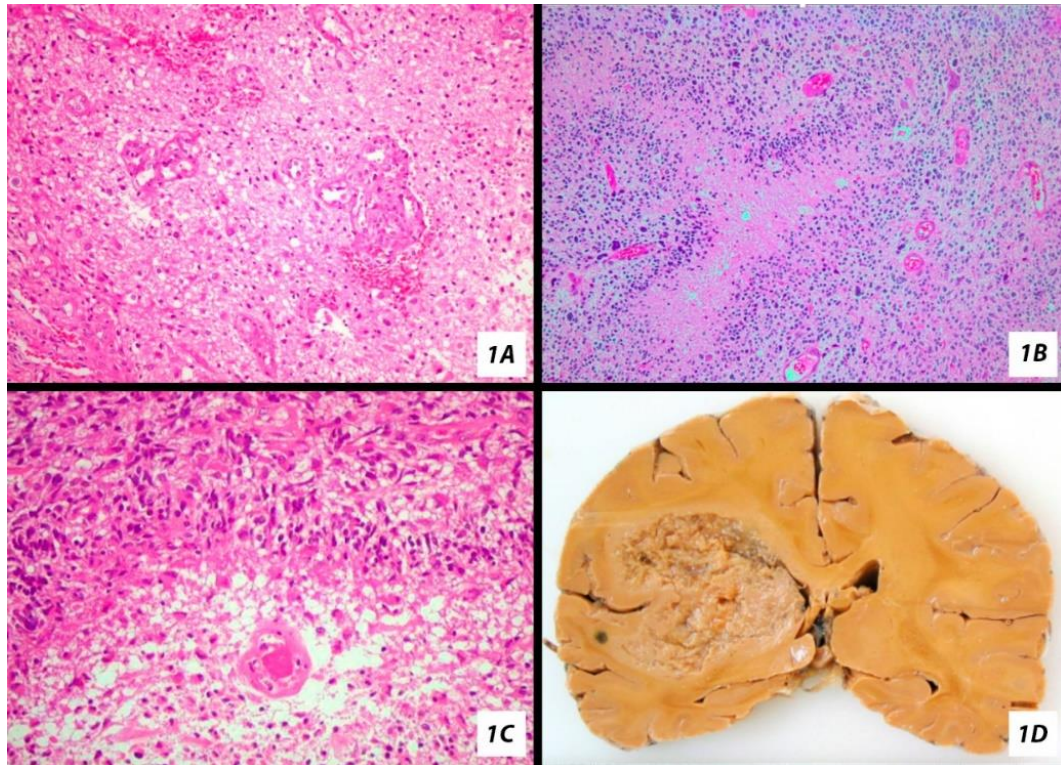


FIGURA 1. Principales hallazgos en la anatomía patológica del GBM. Neovascularización, trombosis y formación de vasos “agujereados” (**imagen 1A**). Necrosis con núcleos de células tumorales en empalizada (**imagen 1B**). Vasos de aspecto glomeruloide (**imagen 1C**). Macroscopía del GBM. Tumor localizado en la región frontotemporal izquierda, de apariencia infiltrativa, comprime el ventrículo lateral izquierdo hacia el hemisferio contrario (**imagen 1D**).

Fuente: <http://anatpat.unicamp.br/nptglioblastoma7.html> y Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina. Universidad de Zaragoza.

Por otro lado, a nivel macroscópico, se aprecia una lesión irregular con bordes mal delimitados y de una localización variable, siendo no obstante más frecuente su asentamiento en hemisferios cerebrales frente a la médula espinal y/o el tronco del encéfalo. Cabe destacar también la heterocromía, ya que se puede visualizar la alternancia de áreas grisáceas, rojizas y amarillas, junto con áreas hemorrágicas en diferentes estadios evolutivos (figura 1D).^{15,20}

1.3 CLASIFICACIÓN

La WHO clasifica el GBM en:

- GBM IDH-wildtype o primario (90%): asociado a la aparición de novo sin lesión preexistente y caracterizado por una historia clínica súbita y más agresiva, en pacientes en torno a los 60 años. Dentro de esta clasificación existen unos subtipos especiales del GBM:
 - GBM de células gigantes (<1%): histológicamente caracterizado por la presencia de células gigantes multinucleadas y mejor pronóstico que la forma ordinaria.
 - Gliosarcoma (2%): caracterizado por un tejido bifásico con un componente glial y otro sarcomatoso.
 - GBM epiteliode: forma prácticamente exclusiva de la población pediátrica, con una población de células epitelioides que simulan una metástasis en varios focos.
- GBM IDH-mutant o secundario (10%): desarrollándose a partir de un astrocitoma de menor grado y en pacientes más jóvenes, en torno a los 45 años.
- GBM NOS: aglutina aquellos casos de GBM cuyo estado de mutación IDH no es concluyente o no ha podido ser demostrado.

La media de supervivencia de los GBM primarios es de un año aproximadamente, mientras que en el caso de los secundarios el pronóstico es algo mejor. La evolución a la forma de peor pronóstico dependerá fundamentalmente de la acumulación de mutaciones de genes supresores tumorales y de oncogenes, alteraciones genéticas que son diferentes en función de la clasificación del tumor.

Atendiendo a su perfil genético, el GBM primario se caracteriza por presentar:

- Mutaciones del promotor TERT (80%)
- Deleción de CDKN2A/CDKN2B (60%)

- Pérdida de cromosomas 10p (50%) y 10q (70%)
- Alteraciones en EGFR (mutaciones, reordenamientos y/o amplificaciones.
- Mutaciones/ deleciones de PTEN (40%)
- Mutaciones del TP53 (25-30%)
- Mutaciones del PI3K (25%)

Además, dentro de los GBM primarios existen varios subtipos con diferencias significativas en la respuesta al tratamiento. Se trata de cuatro estirpes diferentes en función de su perfil molecular: clásico, proneural, neural y mesenquimatoso. De esta forma, la probabilidad de supervivencia es de unos 12,2 meses en el GBM clásico; de 15 meses, tanto en la variante neural como en el mesenquimatoso; y de 16,2 meses en el caso de la variante proneural. Esta clasificación se realizó identificando distintos grupos de pacientes que eran separados de acuerdo a patrones de expresión genética, según el tipo de anomalías genéticas que portan, así como de las características clínicas de dichos pacientes.

El GBM secundario posee un perfil genético diferente del primario, basado en la presencia de mutaciones IDH que están asociadas con la hipermetilación. Estas alteraciones pueden detectarse de una forma más temprana en la forma precursora del GBM, es decir, en el astrocitoma de bajo grado. Otras alteraciones genéticas observables son las mutaciones del TP53 y ATRX y la pérdida del 10q.^{15,20,21}

2. LAS CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES o CTCs

Las CTCs son células liberadas por el tumor primario y por las regiones metastásicas que se localizan en sangre periférica. Se trata de una población celular relativamente rara, con aproximadamente un CTC por 10^5 - 10^8 de glóbulos blancos. Poseen un gran potencial como herramienta para comprender los pasos en la evolución de la denominada cascada metastásica, desde el transporte a la sangre de las células tumorales hasta la formación de una metástasis clínicamente detectable. Esto ha llevado a numerosos investigadores a aunar esfuerzos para crear programas de análisis del genoma y de la capacidad de transcripción que tienen estas CTCs, con el objetivo de mejorar a niveles predictivos y pronósticos del manejo del tumor ^{1,2}

Se trata de un tema de actualidad que despierta gran interés en el ámbito de la investigación. Gracias al desarrollo de tecnologías innovadoras es posible estudiar tanto las características funcionales de las CTCs como la capacidad de invasión, su cinética y su respuesta a la selección de barreras, base de la teoría de siembra y sustrato que Paget ya formuló en 1889. Sin embargo, el verdadero avance de esta tecnología consiste en la capacidad de identificar uno o varios marcadores de CTCs en sangre y así poder asociar su presencia con la evolución del tumor; otorgando información tanto predictiva como pronóstica, de gran utilidad en el manejo clínico, especialmente en el GBM.¹

Es importante en este punto aclarar el hecho de que las CTCs en este tumor concreto funcionan de una manera muy diferente al del resto de tumores con capacidad metastásica, debido a que proceden de un tumor primario de origen glial cuyas CTCs, para escapar al sistema circulatorio, han de sufrir una serie de cambios que los investigadores han definido como “Reversión”. Este proceso consiste en que las células malignas llevan a cabo una transdiferenciación a un genotipo mesenquimal, adquiriendo así una forma intermedia epitelio-mesenquimatosa que produce cambios significativos en las células:²

- Pérdida de marcadores epiteliales: E-Cadherina, Claudina y Plakoglobina.
- Adquisición de marcadores mesenquimales: Fibronectina , 2-Cadherina y SERPIN 1 (serina-proteinasa inhibidora 1).

- Otros factores alterados debido a su paso por el estroma son: TGFB (Factor de Crecimiento Transformante Beta), WNT, PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) y la IL-6. ²

Los estudios más recientes muestran evidencias de que, además de las CTCs, los fragmentos tumorales aparecen en la sangre como microémbolos que contienen células del estroma, leucocitos y plaquetas, creando un “microambiente flotante”. Estos microfragmentos son capaces de evadir su eliminación por parte del sistema inmune del torrente sanguíneo, promoviendo la adhesión e invasión de tejidos sanos. Uppal *et al.* estudió este mecanismo demostrando que la administración de aspirina era capaz de alterar la adherencia de los microémbolos tumorales en tejidos periféricos. Además, las CTCs son, desde el punto de vista fenotípico, una población heterogénea; ya que cada célula muestra una expresión variable de los marcadores anteriormente mencionados.

Todos estos cambios otorgan a las CTCs originarias del GBM unas características únicas que explican por qué la mayoría de estos CTCs fracasan en su capacidad migratoria y perecen a la hora de infiltrar órganos a distancia. Aunque los cambios sufridos por las células tumorales les permiten salir del tumor primario glial a la sangre periférica, son estos mismos cambios los que aumentan su dificultad para adaptarse al nuevo medio que suponen los tejidos a los que llegan convirtiéndose en “microambientes hostiles”. Este término ha sido acuñado por Pantel *et al.* para explicar cómo los objetivos de la metástasis bloquean su extravasación, su capacidad para injertarse y para colonizar. ¹

El fenómeno contrario puede apreciarse en el entorno del tumor primario donde las CTCs pueden reinfiltrarse y permitir la progresión tumoral en el cerebro, en un proceso definido por Speicher *et al.* como “autosiembra tumoral”.

Dos situaciones determinantes para explicar la agresividad y recurrencia del tumor en el tejido cerebral han sido recientemente identificadas. Por un lado, la capacidad de las CTCs para evadir la defensa celular del medio que trata de invadir y por otro, la unión que llevan a cabo con los capilares sanguíneos.

La capacidad de las CTCs para evadir las señales reactivas del estroma es lo que se denomina “bloqueo de las sustancias protectoras” generadas por el

medio. En situaciones normales, el estroma crea como defensa frente a las CTCs señales de delección en el espacio perivascular cerebral. Estas señales de delección incluyen a los plasminógenos activadores (PAs) que convierten al plasminógeno neuro-derivado en plasmina que, a su vez, moviliza a FasL (citokina proapoptótica) permitiendo a los astrocitos eliminar a las CTCs. Sin embargo, cuando las CTCs expresan serpinas anti-PA, más concretamente la neuroserpina inhibidora PA y la serpina B2, la generación de plasmina es inhibida lo que permite la supervivencia de las CTCs (figura 2).¹

El otro proceso llevado a cabo por las CTCs y que explica la agresividad y grado de recurrencia del tumor, es la capacidad que tienen de atravesar los capilares sanguíneos en el proceso que se denomina “cooperación vascular”. La expresión de serpinas anti-PA previene la inactivación de L1CAM, un mediador de la siembra de células metastásicas en la estructura vascular, de forma que las CTCs pueden alcanzar la superficie capilar y avanzar a través de los vasos (figura 2).¹

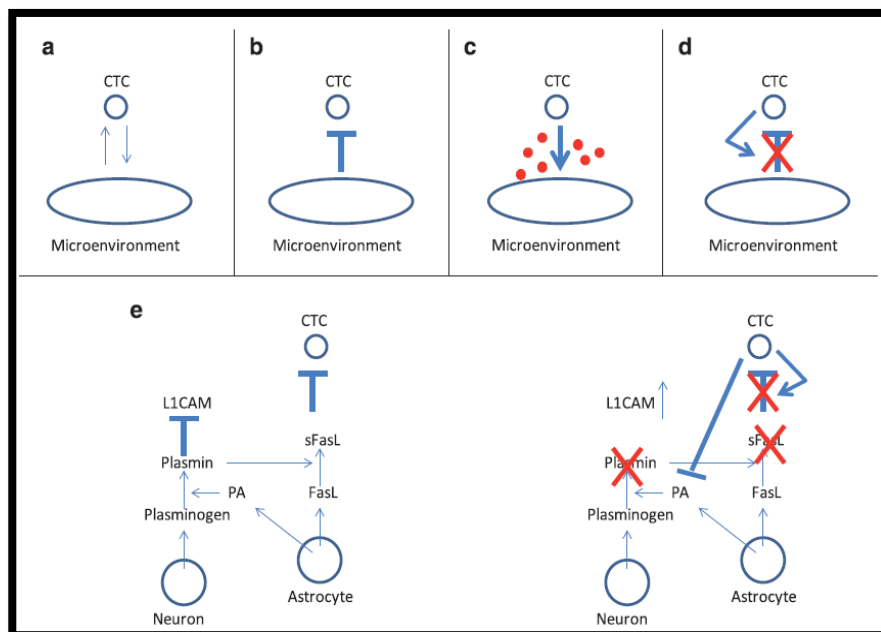


FIGURA 2. Proceso de siembra de las CTCs y actividad del microambiente frente a ellas.

(a): El microambiente es determinante para la supervivencia de las CTCs en el tejido de destino. (b): Microambiente hostil y bloqueo de CTCs. (c): Microambientes favorables a las CTCs para su anidamiento. (d): Bloqueo a las CTCs por sustancias protectoras del microambiente. (e): Cascada defensiva generada para bloquear a las CTCs (figura izquierda). Actividad de las CTCs para que su estructura deje de estar inhibida (figura derecha).

Fuente: *The biology of circulating tumor cells. Oncogene 2016*

Un tema controvertido en la capacidad de diseminación del GBM es el papel que la cirugía podría jugar en la siembra tumoral favoreciendo dicho proceso. Aunque está demostrado que puede existir una diseminación de células malignas durante la cirugía de tumores intracraneales, la ausencia de correlación estadísticamente significativa entre la cirugía y la incidencia de diseminación es frecuente en la literatura de los tumores gliales. En los últimos años se han realizado varios estudios que podrían relacionarlo con las CTCs. Gao *et al.* llevaron a cabo un estudio para confirmar la hipótesis de que la intervención quirúrgica podía promover la diseminación de células cancerígenas. Sus resultados revelaron que el conteo de CTCs en pacientes analizados antes o después de la operación era casi el mismo, lo cual es concordante con los resultados obtenidos en 2014 por Muller *et al.* Sin embargo, pudo observarse que 2 de los 10 casos analizados tuvieron un incremento significativo en el conteo de CTCs una semana después de la cirugía. Debido al pequeño tamaño de la muestra, los resultados no pueden ser considerados como clínicamente significativos; no obstante, futuros estudios que impliquen a un mayor número de individuos aplicando las nuevas tecnologías para la detección de CTCs, podrían arrojar luz a dicho tema.³

Todos estos fenómenos citados explican por qué el GBM es un tumor con baja capacidad metastásica, pero de elevada agresividad y recurrencia.

El principal objetivo de los nuevos estudios surgidos es encontrar un modelo óptimo, en el cual las CTCs expresarán marcadores no detectados en otras células propias del torrente sanguíneo y que no se perdieran en su paso por la transición mesenquimatosa y la propia sangre. De esta forma, estos marcadores serían divididos según su función: pronóstico, farmacodinamia, predicción, remisión y monitorización de la actividad de GBM.^{1,2}

3. LAS TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE CTCs

Las CTCs, uno de los componentes más útiles de la biopsia líquida, tienen un gran potencial como biomarcador, y ya ha sido validado como tal en diversos tipos de tumores sólidos incluyendo pulmón, melanoma, osteosarcoma, feocromocitoma y de paratiroides. Sin embargo, en la pasada década la aplicación de las CTCs en los gliomas cerebrales no ha sido de utilidad debido a la elevada malignidad y su baja capacidad invasiva, con muy pocos casos de metástasis extracraneal que hayan podido tener un seguimiento. Además de la dificultad añadida del microambiente tan especial del mismo cerebro, que limita la migración de las células del glioma a la circulación. A partir de los primeros estudios surgidos en 2014 que reportan la detección de CTCs en sangre periférica en pacientes afectados de GBM se formula la máxima de que las CTCs son una “propiedad intrínseca” de la biología del GBM. No obstante, los medios actuales para la detección de estas células siguen siendo escasos, lo cual unido a la inexistencia de una metodología idónea en dicha detección, tiene como consecuencia que los resultados obtenidos se limitan solo a los gliomas de alto grado.³

Las CTCs son una población celular muy heterogénea, en la que cada célula es capaz de mostrar distintos grados de expresión de marcadores, lo cual aumenta la dificultad en su detección. El caso más representativo de esta heterogeneidad es el de la molécula EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) que no sólo se expresa en las CTCs sino también en algunos leucocitos.²

En el caso de los tumores cerebrales, las CTCs tienen la gran ventaja de otorgar información por medio de métodos no invasivos. Se trataría de un test especialmente útil en casos en los que la cirugía se encuentra contraindicada, o bien cuando los resultados de la biopsia no son concluyentes, algo que sucede en casi el 25% de los pacientes. Además, en la recurrencia, entidad prácticamente inevitable en el GBM, menos de un 30% de los enfermos son candidatos a una segunda cirugía. Para estos pacientes inoperables, las CTCs podrían ser una fuente de información sobre el perfil molecular del resurgido tumor, permitiendo así a los clínicos identificar dianas terapéuticas potenciales en función de las alteraciones encontradas en las células.¹⁸

El gran desafío de las nuevas tecnologías para la detección de estas CTCs en sangre periférica se debe a su genuinidad y a la escasa frecuencia de aparición de éstas que no llega a una por milímetro de sangre. Debido a su rareza, deben ser analizadas en volúmenes grandes de sangre, de hasta 7ml. Las técnicas empleadas para su detección hacen uso de las propiedades biológicas y/o físicas de las células tumorales que ayudan a distinguir una CTC de cualquier célula normal de la sangre.^{13, 17}

3.1 DETECCIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE CELULAR

Las primeras metodologías para identificar CTCs del GBM se han basado en la detección de marcadores de superficie celular específicos del tumor como son: EpCAM, CKs (citoqueratinas) y GFAP (Gliar Fibrillary Acidic Protein). Estos métodos se basan en el reconocimiento antígeno-anticuerpo. Algunas de estas tecnologías se basan en el uso de bolas magnéticas recubiertas con anticuerpos específicos, columnas de afinidad y/o el método más reciente que constituiría el empleo de dispositivos microfluídicos o microchips, que también han sido funcionalizados con anticuerpos.

Muller *et al.* identificaron CTCs en sangre periférica en 29 de 141 (20,6%) de los pacientes analizados empleando anticuerpos directamente dirigidos contra GFAP acuñando entonces la máxima de que las CTCs son una “propiedad intrínseca” de la biología del GBM, ya que GFAP se encontraba ausente en todos los casos control excepto en 1; mientras que en los afectos se observó la presencia de amplificaciones del gen EGFR (GFAP = alta especificidad). Las anormalidades en el gen EGFR, que incluyen la amplificación y los reordenamientos, permiten identificar aquellas células que están iniciando el proceso de gliomagénesis. El proceso de amplificación pudo comprobarse en el tejido tumoral por medio de qPCR (PCR cuantitativa o a tiempo real) y adicionalmente por técnicas FISH (Hibridación Fluorescente In Situ) en los pacientes GFAP-positivos.^{2,3,13}

El estudio de Muller *et al.* también asociaba la amplificación del EGFR con la presencia de una variante EGFRvIII que promueve la transformación y tumorigénesis celular. La detección de CTCs con EGFR amplificado junto con

la presencia de la variante EGFRvIII identificaría además células de GBM resistentes a la quimioterapia. De esta forma la GFAP, principal intermediaria de la maduración y desarrollo de los astrocitos, es el marcador más específico para el diagnóstico de CTCs del GBM en la actualidad.

Sin embargo, surgió la problemática de que la expresión de GFAP no estaba restringida únicamente a las células de estirpe glial, por lo que era necesaria excluir la interferencia de aquellas células GFAP-positivas derivadas de una población celular no glial. Por otro lado, la qPCR es un método altamente sensible y presenta un elevado número de falsos positivos debido a la presencia de células contaminantes. Otra de las conclusiones de su estudio es que las células tumorales del sistema nervioso no expresan EpCAM, al contrario que la mayoría de tumores epiteliales que comúnmente metastatizan.^{2,3,8,14}

3.2 ADENOVIRUS TELOMERASA

En 2014, Macarthur *et al.* introdujeron una nueva estrategia para detectar CTCs del GBM a través de adenovirus-telomerasa. Esta técnica consiste en la expresión de GFP (Green fluorescent protein), así como la expresión de E1A y de E1B, genes necesarios para la replicación viral. Este vector permite detectar la actividad telomerasa, incrementada en células tumorales y por tanto, en las CTCs. Aquellas células marcadas en color verde serán CTC positivas (figura 3).

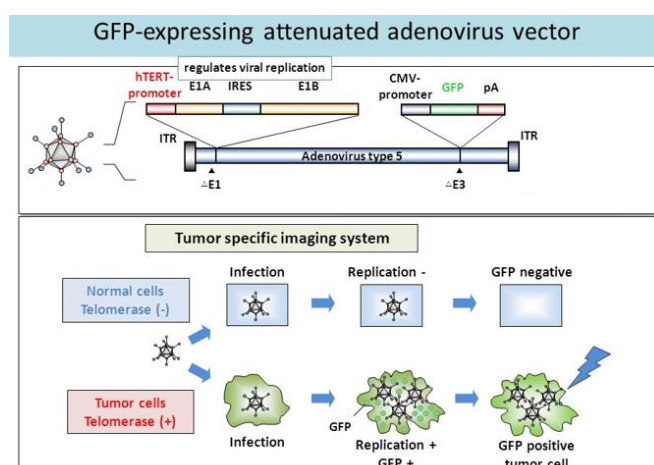


FIGURA 3. Adenovirus-telomerasa. Panel superior: construcción del adenovirus con los insertos para la expresión de material necesario para la replicación viral y para GFP. Panel inferior: producción de la expresión de GFP en las células tumorales. Se detecta la actividad telomerasa en las CTCs (color verde).

Fuente: Kishimoto H. *et al.* Nat Med 12

La actividad telomerasa es elevada en prácticamente todas las células tumorales, distinguiéndolas de las normales. Este sistema ofrece una mayor sensibilidad y especificidad que los sistemas basados en la detección de marcadores de superficie, pero requiere la inversión de mucho tiempo y su procedimiento es complicado. Este proceso se combinó con técnicas de inmunofluorescencia para la GFAP y la nestina, lo cual ayudó a delinear el origen glial de las CTCs. En el estudio de Macarthur *et al.* se identificaron CTCs en 8 de 11 pacientes (72%) afectados por gliomas de alto grado pre-radioterapia, frente a 1 de 8 (12%) en la post-radioterapia. Este hecho ha permitido demostrar la utilidad de la biopsia líquida para identificar pacientes con riesgo de recurrencia.^{2,3,14}

3.3 CTC-iCHIP

Es aproximadamente al mismo tiempo cuando Sullivan *et al.* aplican la técnica conocida con el nombre de CTC-iChip para verificar la presencia de CTCs en GBM, detectando al menos una de ellas en 13 de 33 (39%) de sus pacientes.

El CTC-iChip consiste en un dispositivo con dos componentes microfluídicos que permiten seleccionar las CTCs de una muestra de sangre. El primer componente o módulo recibe todas las células de la muestra y lleva a cabo la eliminación de células nucleadas en dependencia de su tamaño y deja a las restantes marcadas por medio de bolas inmunomagnéticas. De esta forma se realiza una primera criba celular, eliminando glóbulos rojos, plaquetas y a las bolas magnéticas sobrantes. Tanto los glóbulos blancos como las CTCs pasan el cribado (figura 4 superior).

Las células seleccionadas se mueven al segundo módulo, que realiza otro mecanismo de cribado, esta vez por medio de magnetoforesis. Este proceso consiste en la generación de un campo magnético que mueve a las células, previamente marcadas por bolas inmunomagnéticas, a través de microcanales. Ello permite un segundo cribado, aislando a las CTCs de los glóbulos blancos (figura 4 inferior).

Posteriormente se lleva a cabo la identificación de las CTCs por medio de anticuerpos fluorescentes de las proteínas SOX2, tubulina beta-3, EGFR, A2B5, y c-MET, detectables específicamente en los gliomas de alto grado.

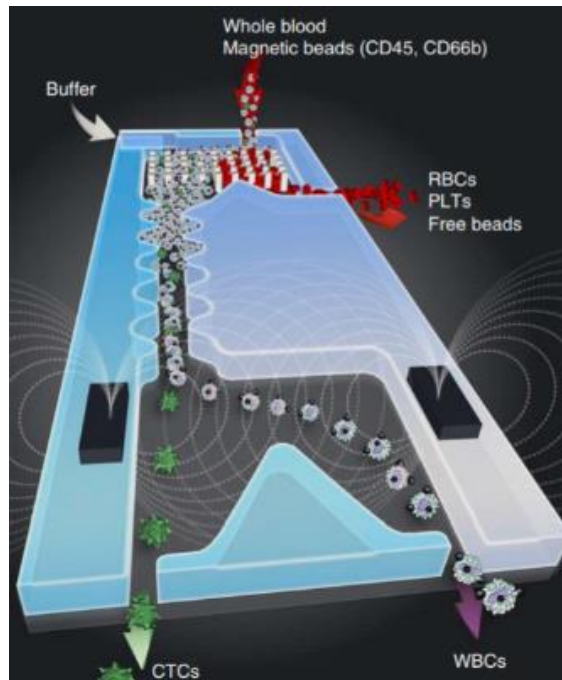


FIGURA 4. Funcionamiento del CTC-iChip. El primer módulo realiza una criba en dependencia del tamaño. Tras el marcaje con bolas magnéticas, el segundo módulo realiza una criba por magnetoforesis. De esta forma se logra aislar a población de CTCs. Fuente: Microfluidic, marker-free isolation of circulating tumor cells from blood samples. Nature America inc, 2014

Pese a sus no tan notables resultados, su estudio permitió comprobar que las células detectadas mostraban un perfil de expresión mesenquimal. Los hallazgos de la subsecuente RNA-FISH demostraron que subpoblaciones de células del GBM que expresaban un elevado perfil mesenquimal eran más proclives a la invasión del torrente sanguíneo y por tanto más agresivas, lo que ayudó a la comprensión del fenómeno. Dicha agresividad era observada en CTCs que presentaban una alta expresión de SERPINA1, TGFB1, TGFB2, y de vimentina; que se asociaban fundamentalmente al fenotipo mesenquimal agresivo. ^{2,3,14,23}

3.4 CEP8-FISH PARA LA DETECCIÓN DE LA ANEUPLOIDÍA DEL CROMOSOMA 8

Gao *et al.* llevaron a cabo en 2015 un proyecto para detectar las CTCs basado en la observación de la aneuploidía del cromosoma 8 por medio de la técnica CEP8-FISH (figura 5) Esta metodología ha permitido mejorar enormemente la ratio de detección de las CTCs en diversas estirpes tumorales, especialmente en aquellos pacientes que han dado negativo en la expresión de marcadores celulares en sangre. Es bien conocida que la poliploidía es una característica común de las células tumorales y los nuevos estudios han postulado que la aneuploidía puede contribuir o incluso conducir al desarrollo tumoral.

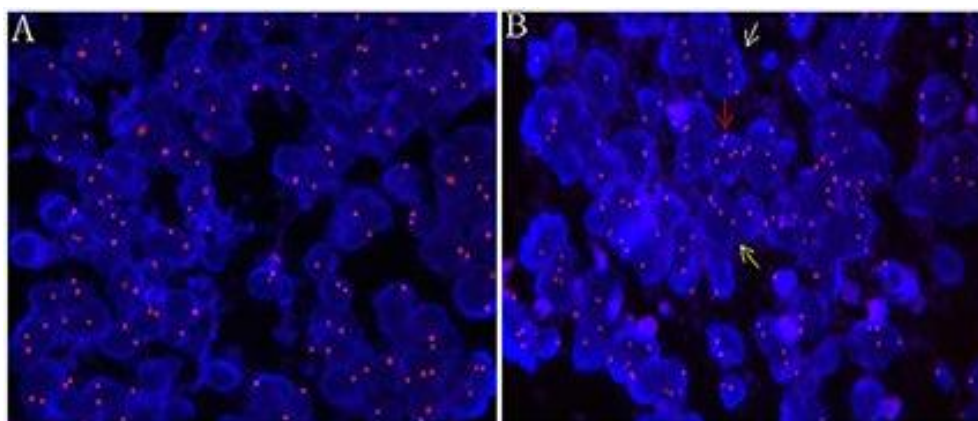


Figura 5. Detección de CTCs mediante CEP8-FISH: A y B muestran la detección de poliploidías en el cromosoma 8 (coloreadas de naranja) en células de individuo control y afectado tumoral respectivamente. Las flechas blanca, amarilla y roja muestran una célula con triploidía, tetraploidía y con más de 5 copias del cromosoma 8, respectivamente. *Fuente: Circulating tumor cells is a common property of brain glioma and promotes the monitoring system. Oncotarget 2016*

Para verificar la utilidad del CEP8-FISH en la detección de las CTCs del GBM Gao *et al.* estudiaron a 20 pacientes afectados; encontrando la poliploidía del cromosoma 8 en 10 de los individuos, incluyendo triploidías, tetraploidías e incluso más de 5 copias. El CEP8-FISH del cromosoma es un buen método de detección de las CTCs, y pese a existir muy pocos estudios al respecto, han demostrado tener un gran valor biológico y clínico con vistas a su aplicación en el futuro.³

4. LAS APLICACIONES DE LAS CTCs EN EL MANEJO DEL GBM

4.1 MONITORIZACIÓN DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO

El gran potencial de las CTCs recae principalmente en la monitorización de la enfermedad, la capacidad de poder usarlas como un biomarcador pronóstico. Su capacidad para proveer de información en tiempo real tanto de la heterogeneidad como de los cambios en la arquitectura subclonal del tumor, junto con el curso de la enfermedad, permitiría a los clínicos predecir su capacidad de adaptación e invasión, así como su resistencia al tratamiento.

Uno de los principales objetivos es el desarrollo de ensayos completos, como el iniciado en 2015 por científicos europeos llamado CANCER-ID, que incluye a más de 30 instituciones académicas y de la industria. Este estudio analiza no solo las CTCs de origen glial, sino también de muchos otros tumores sólidos. Su éxito supondría el desarrollo de estrategias de tratamiento personalizado frente al cáncer; de modo que, de cada paciente, con un simple test de sangre, se podría dar identificar sus CTCs. Esto es especialmente relevante ya que las biopsias repetidas de lesiones metastásicas son difíciles de obtener.^{1,18}

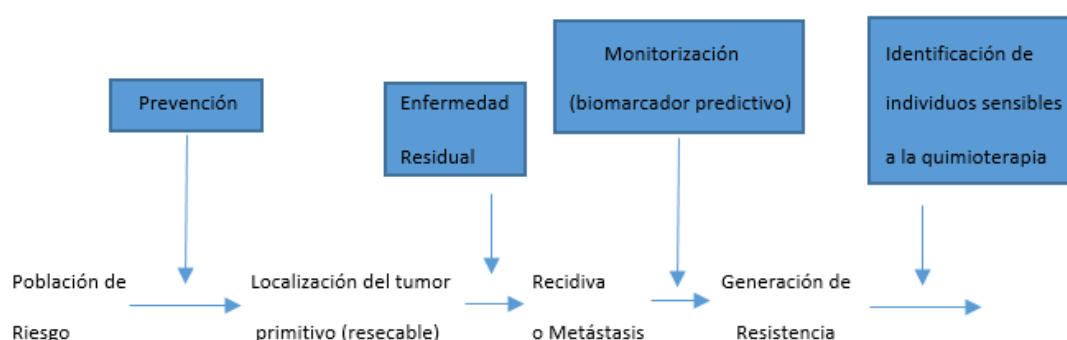


FIGURA 6. Aplicaciones de las CTCs en la práctica clínica y en el manejo de los pacientes afectados por GBM.

Según las investigaciones de Pantel *et al.* en función de la presencia y número de CTCs y del estadio de la enfermedad, se podrían llevar a cabo distintos abordajes terapéuticos. Por ejemplo, la detección de CTCs en individuos de alto riesgo de enfermedad maligna (prevención) es uno de los

objetivos de los futuros estudios planteados en las investigaciones sobre las CTCs. Otro caso es tras el diagnóstico del tumor primario y de su resección con intento curativo, donde las CTCs pueden ser localizadas para identificar una posible actividad residual de la enfermedad. En el caso de una recidiva o tras el diagnóstico de metástasis, las CTCs pueden emplearse en la monitorización de la progresión del tumor. Además, estas actuarían como biomarcadores predictivos, guiando las decisiones terapéuticas de los clínicos. Finalmente, si se desarrollan resistencias, las CTCs pueden identificar aquellos pacientes más sensibles a tratamientos con quimioterápicos (figura 6).¹

En cuanto al uso de la temozolomida, principal quimioterápico en el tratamiento adyuvante del GBM, Muller *et al.* pudieron detectar CTCs que poseían amplificaciones del gen EGFR, así como una variante EGFRvIII de delección, la cual sería capaz de conducir a la transformación y tumorigénesis de las células. Aquellos pacientes con CTCs positivas para estas alteraciones genéticas resultaron tener tumores gliales resistentes al tratamiento adyuvante con quimioterapia. De esta forma, con un simple test de sangre para la detección de CTCs con estas alteraciones, se podría evitar el uso de quimioterápicos para estos casos de resistencia y los terribles efectos secundarios que desencadena en los pacientes, pautando un manejo terapéutico diferente más beneficioso.⁸

4.2 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE RECURRENCIA TUMORAL y RADIONECROSIS O PSEUDOPROGRESIÓN TRAS RADIOTERAPIA

Es indiscutible que la monitorización de respuesta al tratamiento radioterápico y la progresión tumoral en pacientes afectados por GBM es actualmente un gran desafío.

La radionecrosis o pseudoprogresión es una lesión cerebral producida por la radioterapia craneal en tumores o malformaciones vasculares cerebrales, aparentando una recidiva tumoral o un nuevo tumor. Como la radiación actúa sobre las células en división, los oligodendrocitos y las células endoteliales vasculares son las más vulnerables. El daño es más pronunciado si además se administra de forma concomitante quimioterapia. No siempre da lugar a

síntomas, y por ello se pueden encontrar pacientes afectados completamente asintomáticos.^{3,11,12}

Por otro lado, la pseudoprogresión es capaz de imitar el avance tumoral de la enfermedad o recurrencia, lo cual termina desembocando bien en el sobretratamiento o en el infratratamiento del paciente, dependiendo del manejo clínico que se haga del paciente. Puesto que la presencia de CTCs en sangre es una propiedad intrínseca del glioma, su detección sirve como evidencia directa de la migración del GBM. Los resultados del estudio de Gao *et al.* mostraron que el recuento de CTCs en pacientes sometidos a radioterapia y/o quimioterapia era significativamente menor que en aquellos pacientes en los que se llevó a cabo el recuento antes del tratamiento adyuvante; por lo que la detección de CTCs podría contribuir a diferenciar entre la radionecrosis postradioterápica y una verdadera progresión tumoral. En este estudio se comprobó que la detección de CTCs resultante era consistente con los hallazgos por diagnóstico de imagen, tanto para la radionecrosis como para la progresión.

El ejemplo más claro es el caso de un paciente con región rCBV (volumen sanguíneo cerebral relativo) disminuido en la zona peritumoral. Este volumen sanguíneo se encuentra elevado con el glioblastoma activo y disminuye tras el tratamiento con radioterapia o quimioterapia. Pese a que atendiendo a la rCBV se podría considerar que el tumor habría remitido, el estudio FISH demostró la presencia de CTCs en sangre, lo cual significaría un resultado positivo para progresión tumoral. En este paciente fue posteriormente confirmada la recurrencia tumoral por histopatología. La detección de CTCs puede ser el complemento diagnóstico perfecto para las técnicas de imagen e incluso ser superiores a ellas en la monitorización de la respuesta al tratamiento y análisis del microambiente del glioma.^{3,12}

No obstante, existen inevitables limitaciones de los estudios presentes, especialmente en lo que al tamaño de la muestra se refiere. Debido a lo novedoso de estos estudios, el tiempo de seguimiento de los pacientes es corto, por lo que el empleo de CTCs como potencial pronóstico en el GBM todavía no puede ser analizado. Las investigaciones actuales están orientadas además a

ampliar el número de individuos a estudio con el objetivo de tener una muestra mayor.³

El objetivo ideal de la aplicación de una técnica de detección de CTCs en sangre de los pacientes en los cuales el clínico requiere un diagnóstico diferencial entre recurrencia o radionecrosis, quedaría sintetizado en la siguiente figura (figura 7).

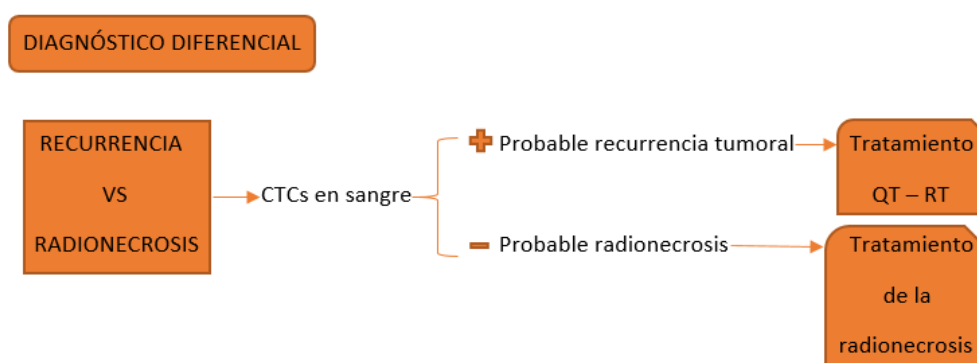


Figura 7. Manejo del GBM ante casos de duda entre la recurrencia y la radionecrosis.

En el caso de que el clínico se encuentre ante una radionecrosis o pseudoprogresión, tras determinar la ausencia de CTCs en sangre, se puede iniciar el tratamiento con corticoides, bevacizumab, oxígeno hiperbárico o cirugía.¹²

En resumen, una simple muestra de sangre permitiría el diagnóstico definitivo entre radionecrosis o progresión del tumor, evitando el consecuente abuso que existe en la actualidad respecto a la detección de estas entidades por medio de las técnicas de imagen radiológicas que, al no ser del todo concluyentes, terminan por requerir de una nueva cirugía invasiva para el diagnóstico.

4.3 SISTEMA INMUNE Y CTCs

En la última década se ha detectado la presencia de tumores metastásicos en pacientes trasplantados de donantes con GBM. Este hallazgo se ha visto reflejado en la literatura reciente, y ha permitido relacionarlo con el sistema inmune y más concretamente con el tratamiento inmunosupresor tras la cirugía del trasplante.

Existen dos clasificaciones internacionales recientes y vigentes de los donantes de órganos con tumores primarios del sistema nervioso central, una en la Unión Europea y otra en los EE.UU. La de la Unión Europea se basa en la clasificación histológica de la OMS del 2009. Por otro lado, la de los EE.UU. se establece a partir del Donor Malignancy Subcommittee (2011), un subcomité de expertos del DTAC (Disease Transmission Advisory Committee), que simplificó el enfoque sobre la donación de órganos en pacientes con tumores primarios del SNC. Esta clasificación internacional considera a los pacientes afectados por GBM como donantes de alto riesgo de transmisión tumoral a los receptores, por lo que sus órganos no deberían ser trasplantados excepto en circunstancias excepcionales y extremas. Los mecanismos que controlan el crecimiento de las células tumorales en localizaciones extracraneales no se conocen completamente y serán objeto de estudio en futuras investigaciones. Debido a que la transmisión de células de GBM y su crecimiento en fatales metástasis ha sido detectada en pacientes trasplantados, se ha sugerido que las células del GBM podrían haberse alojado en órganos extracraneales de los donantes en un estado de letargo no proliferativo.

Los resultados de historias clínicas previas sugieren que la inmunosupresión tras el trasplante permite a las células sobrevivir en un estado de proliferación activa dentro de los pacientes que han recibido un órgano de donante afectado por GBM. Pese a que la incidencia exacta es desconocida, se estima que alrededor del 10% y 20% de receptoras de donantes GBM afectados desarrollan tumores extracraneales en órganos tales como páncreas, riñón, hígado y corazón.

Esto confirma la hipótesis de que ciertas poblaciones de CTCs circulantes son capaces de sobrevivir y convertirse en huéspedes de distintos órganos,

donde su proliferación es controlada por el sistema inmune. Por ello la comprensión de los mecanismos que permiten mayor efectividad en el control del crecimiento de las poblaciones de CTCs, resultaría de gran valor en el diseño de tratamientos inmunoterápicos más efectivos. ^{1,19,22}

CONCLUSIONES

El descubrimiento de las CTCs y su aplicación en el manejo de los tumores sólidos, especialmente desde el punto de vista metastásico, ha sido objeto de interés de numerosos estudios en los últimos años tal y como queda demostrado por la amplia literatura presente en las principales bases de datos. Sin embargo, el GBM fue completamente apartado de estas investigaciones, ya que pese a ser un tumor de elevada malignidad y capacidad invasiva, su capacidad de metástasis es muy baja. No es hasta el año 2014, cuando los primeros investigadores identificaron CTCs procedentes de GBM en sangre periférica. Este hecho ha permitido determinar que las CTCs son una propiedad intrínseca al GBM, y gracias a ello, se han comenzado a desarrollar diversos estudios enfocados al empleo de estas células como biomarcador para la monitorización de la enfermedad, tanto a nivel pronóstico como en relación con la respuesta al tratamiento.

En un período de apenas cuatro años se han desarrollado nuevas tecnologías para la detección de estas CTCs procedentes del GBM. La identificación de marcadores de superficie, presentes de modo específico en estas células circulantes, fue de las primeras en ser descritas. Le siguieron métodos de detección más sofisticados, como la construcción de adenovirus que permiten localizar la actividad telomerasa, actividad que se encuentra incrementada en las células tumorales. Posteriormente se han creado sistemas de detección basados en dispositivos microfluídicos como el CTC-iCHIP. De entre los métodos más novedosos, destaca la detección de la poliploidía del cromosoma 8, que como se ha descrito anteriormente es un hecho también característico de estas células.

El ritmo de aparición de nuevos métodos de detección de CTC es de prácticamente uno por año, siendo el nuevo mejor que el anterior y con capacidad de complementar a sus antecesores, por lo que no resultaría extraño que en un período de cinco años surgiera un método que permitiera a las CTCs ocupar un lugar preeminente en la monitorización de la actividad tumoral.

Sin embargo, existe una serie de limitaciones, siendo una de las más importantes la escasa supervivencia de los pacientes afectados por esta enfermedad. Este hecho imposibilita llevar a cabo un adecuado seguimiento, al reducir el número de casos para su estudio a únicamente aquellos que consiguen una mayor supervivencia. Por ello, pese al desarrollo de nuevas tecnologías en la detección de CTCs, su aplicación en la práctica clínica no ha ido pareja a este desarrollo.

Por el momento, ya ha quedado demostrado su potencial en la identificación de pacientes resistentes al tratamiento quimioterápico, así como en la monitorización de la respuesta al tratamiento quirúrgico y radioterápico. Es un hecho que aquellos pacientes con un elevado recuento de CTCs en sangre periférica tras la intervención quirúrgica tienen una elevada probabilidad de sufrir recidivas.

Otro de los aspectos en los que las CTCs han demostrado tener una gran utilidad es en el diagnóstico diferencial entre progresión tumoral y radionecrosis tras radioterapia, superando incluso en especificidad y sensibilidad a las técnicas de imagen. Este hecho demuestra que su utilidad en la aplicación clínica es más que evidente. La posibilidad de que con un simple test de sangre se pueda saber ante qué momento de la enfermedad se encuentra el paciente, marcaría el correcto manejo de la enfermedad y evitaría procedimientos diagnósticos innecesarios, como la repetición de biopsias cerebrales invasivas. Además, por otro lado, se permitiría una mejor orientación hacia un tratamiento correcto; objetivo primordial de la medicina personalizada.

Por último, y para concluir, uno de los objetivos principales a futuros podría ser ampliar el número de individuos a estudio con el objetivo de demostrar, mediante estudios más robustos y con una muestra más amplia, la utilidad que tiene la determinación de CTCs por medio de un método no invasivo como es la biopsia líquida en la práctica clínica. También es importante señalar que la aplicación de las CTCs en el manejo clínico del GBM tiene como objetivo final, más allá de aumentar la esperanza de vida, la mejora de la calidad de vida de los pacientes a lo largo del transcurso de la enfermedad. Las CTCs podrían suponer un pilar fundamental en la medicina personalizada, por lo que es

necesario dotar de recursos a los hospitales para poder realizar el seguimiento de los individuos afectados por el GBM, en base a la detección de estas células.

BIBLIOGRAFÍA

1. K. Pantel, MR. Speicher. The biology of circulating tumor cells. *Oncogene* 2016; 35: 1216-1224.
2. LA Adamczyk, H. Williams, A. Frankow, HP. Ellis, HR. Haynes, C. Perks, et al. Current Understanding of Circulating Tumor Cells – Potential Value in Malignancies of Central Nervous System. *Frontiers in Neurology* 2015; 6: 174.
3. F. Gao, Y. Cui, H. Jiang, D. Sui, Y. Wang, Z. Jiang, et al. Circulating tumor cells is a common property of brain glioma and promotes the monitoring system. *Oncotarget* 2016 Nov 1; 7(44): 71330- 71240.
4. M. Fontanilles, A. Duran-Peña, A. Idbaih. Liquid Biopsy in Primary Brain Tumors: Looking for Stardust. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 2018; 18:13
5. JM. Kros, DM. Mustafa, L JM. Dekker, P AE. Sillevs Smith, TM. Luider, P. Zheng. Circulating glioma biomarkers. *Neuro-Oncology* 2015; 17 (3), 343-360.
6. M. Preusser, M Lim, DA. Hafler, A. Reardon, JH. Sampson. Prospects of immune checkpoint modulators in the treatment of glioblastoma. *Nat. Rev. Neurol.* 2015; 11: 504-514.
7. JP. Sullivan, BV. Nahed, MW. Madden, SM. Oliveira, S. Springer, D. Bheere, et al. Brain Tumor Cells in Circulation are Enriched for Mesenchymal Gene Expression. *Cancer Discov* 2014; 4 (11): 1299-1309.
8. C. Muller, J. Holtschmidt, M. Auer, E. Heitzer, K. Lamszus, A. Schulte, J. Matschke, et al. Hematogenous dissemination of glioblastoma multiforme. *Science Translational Medicine.org* 2014; Vol 6 Issue 247 247ra101.
9. S. Wu, S. Liu, Z. Liu, J. Huang, X. Pu, J. Li, et al. Classification of Circulating Tumor Cells by Epithelial-Mesenchymal Transition Markers. *PLoS One* 2015; 10 (4): e0123976.
10. Macarthur KM1, Kao GD, Chandrasekaran S, Alonso-Basanta M, Chapman C, Lustig RA, Wileyto EP, Hahn SM, Dorsey JF. Detection of brain tumor cells in the peripheral blood by a telomerase promoter-based assay. *Cancer Res.* 2014 Apr 15;74(8):2152-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0813. Epub 2014 Feb 13
11. Arbab, Ali S, Branislava Janic, Kourosh Jafari-Khouzani, A S M Iskander, Sanath Kumar, Nadimpalli R S Varma, Robert A Knight, Hamid Soltanian-Zadeh, Stephen L Brown, y Joseph A Frank. 2010. Differentiation of glioma and radiation injury in rats using in vitro produce magnetically labeled cytotoxic T-cells and MRI. *PLoS One* 5, nº. 2: e9365. doi:10.1371/journal.pone.0009365.
12. K.Parvez, A.Parvez, G.Zadeh. The Diagnosis an Treatment of Pseudoprogression, Radiation Necrosis and Brain Tumor Recurrence. *Int. J. Mol. Sci.* 2014; Jul, 15(7): 11832-11846.

13. A.Agarwal, M.Balic, D.El-Ashry, R.J. Cote. Circulating Tumor Cells: Strategies for Capture, Analyses and Propagation. *The Cancer Journal* 2018; volumen 24, number 2, March/April 2018.
14. MG. Best, N.Sol, S. Zijl, JC. Reijneveld, P. Wesseling, T. Wurdinger. Liquid biopsies in patients with diffuse glioma. *Acta Neurophatologica*, June 2015, Volume 129, issue 6, pp 849-86
15. DN. Louis, H.Ohgaki, OD. Wiestler, WK.Cavenee, DW. Ellison, D. Figarella-Branger et al. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, 4th edition. Lyon, France (2016)
16. M. Zachariah, JP Oliveira-Costa, B Carter, SL. Scott, BV. Nahed. Blood-Based Biomarkers for the Diagnosis and Monitoring of Gliomas. 2018. Published by by Oxford University Press on behalf of the Society for Neuro-Oncology.
17. H. Shao, J. Chung, K. Lee, L. Balaj, C. Min, BS Carter et al. Chip-based analysis of exosomal mRNA mediating drug resistance in glioblastoma. May 2015, *Nature Communications* 6; article number: 6999
18. M.Touat, A. Durán-Peña, A. Alentorn, L. Lacroix, C. Massard, A. Idhah. Emerging circulating biomarkers in glioblastoma: promises and challenges. 2015, *Expert review of Molecular Diagnostics*, 15:10, 1311-1323.
19. F. Caballero, R. Matesanz. Manual de donación y trasplante de órganos humanos. Coordinación de trasplantes Dic, 2015.
20. V.Kumar, AK. Abbas, JC. Aster. Robbins Patología Humana. Elsevier, 2018 (10ª edición). Barcelona, España.
21. Verhaak, R.G., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., Alexe, G., et al. (2010) Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 17(1):98-110
22. Council of European Publishing. Guide to Safety and Quality Assurance for the Transplantation of Organs, Tissues and Cells. 5th ed and addendum, 2013. Strasbourg, Germany: Council of Europe Publishing; 2013.
23. NM. Karabacak, PS. Spuhler, F. Fachin, EJ. Lim, V. Pai, E. Ozkumur, et al. Microfluidic, marker-free isolation of circulating tumor cells from blood samples. *Nature America inc*, VOL. 9 NO.3, 2014; doi:10.1038/nprot.2014.044