

Especificidad de la determinación de PCA3 en orina para la detección de cáncer de próstata en pacientes mexicanos

Saavedra-Briones Dorian V,¹ Rodríguez-Dorantes Mauricio,² Morales-Montor Jorge G,¹ Salido-Guadarrama Iván,² Merayo-Chalico Claudio E,¹ Hernández-Castellanos Víctor A,¹ Sánchez-Turati Gustavo J,¹ Santana-Ríos Zael, Urdiales-Ortiz Alejandro, Fulda-Graue Santiago, Ahumada-Tamayo Samuel,¹ Fernández-Noyola Gerardo,¹ Martínez José A,¹ Cantellano-Orozco Mauricio,¹ Pacheco-Gahbler Carlos.¹



■ RESUMEN

Introducción: El cáncer de próstata ocupa el primer lugar de causa de muerte por neoplasias; supera al cáncer de tráquea, bronquios y pulmón. La especificidad del antígeno prostático específico (APE) y el tacto rectal (TR) va de 24% a 37%. Más de 75% de los hombres con valores de APE en el rango de 2.5 a 10 ng/mL o con TR sospechoso, tienen una primera biopsia negativa. Por ello, el valor predictivo positivo de la biopsia es muy bajo. La determinación del gen PCA3 en orina ha mostrado una especificidad de 72% y una sensibilidad de 58%.

Objetivo: Establecer la utilidad clínica mediante la medición de la especificidad de la determinación del PCA3 en orina para el diagnóstico de CaP en la biopsia de pacientes mexicanos en el Hospital General Dr. Manuel Gea González.

Métodos: Se incluyeron 157 pacientes con un APE sérico mayor a 4 ng/mL o tacto rectal anormal. Se recolectaron los primeros 20 a 30 mL de orina posterior al masaje prostático previo a la realización de la BxTRUS, tomando 12 cilindros en cada paciente. Las muestras se

■ ABSTRACT

Background: Prostate cancer holds first place as cause of death from neoplasms, ahead of cancer of the trachea, bronchial tubes, and lung. Specificity of prostate specific antigen and rectal examination varies from 24-37%. First biopsy is negative in over 75% of men with prostate specific antigen values ranging from 2.5-10 ng/mL or with suspicious rectal examination. Thus biopsy positive predictive value is very low. PCA3 gene determination in urine has shown 72% specificity and 58% sensitivity.

Objective: To establish clinical usefulness through measuring the specificity of PCA3 determination in urine for prostate cancer diagnosis in biopsy of Mexican patients at the Hospital General "Dr. Manuel Gea González".

Methods: A total of one hundred and fifty-seven patients with serum prostate specific antigen above 4 ng/mL or abnormal rectal examination were included in the study. The first 20-30 mL of urine were collected after prostate massage prior to transrectal ultrasound-guided biopsy. Twelve cores were taken from each patient. Samples were deposited in tubes containing 20 mL of nucleic acid stabilizing

¹División de Urología e Investigación. Hospital General Dr. Manuel Gea González, Secretaría de Salud, México D. F.

²Instituto Nacional de Medicina Genómica, México D. F.

Correspondencia: Dr. Dorian V. Saavedra Briones. Calzada de Tlalpan 4800. Col. Sección XVI. Delegación Tlalpan. C. P. 14000, México. D. F. Teléfono: 40003044. Correo electrónico: valfre2000@yahoo.com.mx.

depositaron en tubos que contenían 20 mL de una solución estabilizadora de ácidos nucleicos. El puntaje de PCA3 fue calculado con la expresión relativa de mRNA PCA3. El rendimiento del PCA3 fue evaluado en términos de sensibilidad y especificidad al comparar los resultados de este con los resultados de la biopsia.

Resultados: De los 157 pacientes, 39 (25%) resultaron con biopsias positivas para cáncer, tres con PCA3 indeterminados o negativos. La suma de Gleason 3 + 3 se identificó en 19 pacientes (49%), 4 + 3 en uno (2.5%), 3 + 5 = 8 en uno (2.5%), 4 + 3 = 7 en tres (8%) 4 + 4 en 10 (26%), 5 + 4 en uno (2.5%) 5 + 5 en uno (2.5%). El AUC en la curva ROC para PCA3 fue 0.72. (IC 95% 0.59 a 0.85) con $p = 0.005$. El APE total sérico mostró una AUC de 0.69 (IC 95% 0.52 a 0.86). La curva ROC fue usada para determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba para el PCA3 con diferentes puntos de corte. Usando como corte 26, la prueba mostró una sensibilidad de 68% y especificidad de 74%. El valor predictivo positivo para PCA3 es de 45%, el valor predictivo negativo es de 94%.

Conclusiones: La especificidad y el valor predictivo negativo de la prueba PCA3 muestran que puede ser utilizada como un marcador tumoral en orina que aumenta la precisión en el diagnóstico del CaP.

Palabras clave: Cáncer de próstata, detección, mRNA PCA3, mRNA APE, APEt, zona gris, %flAPE, México.

solution. PCA3 rate was calculated with relative expression of PCA3 mRNA. PCA3 performance was evaluated in terms of sensitivity and specificity when comparing results with biopsy results.

Results: Of the one hundred and fifty-seven patients, thirty-nine of them (25%) had biopsies that were positive for cancer, and three patients had undetermined or negative PCA3. Gleason score was 3+3 in nineteen patients (49%), 4+3 in one patient (2.5%), 3+5 in one patient (2.5%), 4+3 in three patients (8%), 4+4 in ten patients (26%), 5+4 in one patient (2.5%), and 5+5 in one patient (2.5%). Area under the curve in the receiver operating characteristic curve for PCA3 was 0.72 (95% CI 0.59-0.85) with a $P=0.005$. Total serum prostate specific antigen showed an area under the curve of 0.69 (95% CI 0.52-0.86). Receiver operating characteristic curve was used to determine sensitivity and specificity of the test for PCA3 with different cut-off points. Using 26 as cut-off point, the test showed 68% sensitivity and 74% specificity. Positive predictive value for PCA3 was 45% and negative predictive value was 94%.

Conclusions: Specificity and negative predictive value for the PCA3 test showed it can be useful as a tumor marker in urine, increasing precision in prostate cancer diagnosis.

Keywords: Prostate cancer, biopsy, detection, PCA3 mRNA, PSA mRNA, total PSA, gray zone, percent-free PSA, Mexico.

■ INTRODUCCIÓN

En el último año, 186 320 hombres en Estados Unidos y 345 900 hombres en Europa fueron diagnosticados con cáncer de próstata (CaP) y alrededor de 28 600 en Estados Unidos y 87 400 en Europa, murieron por esta condición.¹ En México, el CaP ocupa el primer lugar de causa de muerte por neoplasias, superando al cáncer de tráquea, bronquios y pulmón.²

El antígeno prostático específico (APE) ha sido la herramienta más valiosa en la detección, estadificación y vigilancia de esta enfermedad. Aunque el uso rutinario del APE ha aumentado sin duda la detección de cáncer, uno de sus principales inconvenientes es la falta de especificidad, lo que se traduce en una tasa muy alta de biopsias prostáticas negativas, ya que una elevación del APE, no es un evento exclusivo del CaP, esto es especialmente cierto en pacientes con APE sérico entre 3 ng/mL a 10 ng/mL cuya tasa de biopsia negativa es de

aproximadamente 60% a 75%.³ Sabemos que la especificidad del APE y el tacto rectal (TR) va de 24% a 37%.³ Sin embargo, continua existiendo un importante debate sobre los niveles óptimos del APE para la detección del CaP; con este propósito, se llevan a cabo mediciones alternas como el porcentaje de la fracción libre del APE, rangos del APE para la edad, la velocidad de duplicación del APE, pero estas se ven limitadas por sus similitudes con el propio APE. Aunque la biopsia de próstata se considera el estándar de oro para el diagnóstico de CaP, son necesarias pruebas más precisas que puedan estratificar a los pacientes según su riesgo de desarrollar CaP e identificar aquellos que requieren repetir la biopsia de próstata. La recomendación si persiste la sospecha de CaP es una biopsia de repetición,^{4,5} sin olvidar que, hasta 80% de éstas resultarán nuevamente negativas; el costo financiero y las complicaciones asociadas a las biopsias deben considerarse.⁶

El implemento de marcadores para CaP en fluidos corporales es necesario para mejorar la especificidad en

el diagnóstico; uno de los bio-marcadores más analizados, por su potencial utilidad clínica, como una herramienta para predecir el resultado de la biopsia es el PCA3.

Bussemaker en 1999, fue el primero en describir el gen del cáncer de próstata 3, llamado inicialmente DD3 y actualmente PCA3, el cual es uno de los genes más específicos para el cáncer de próstata. Su transcripción es un mRNA no codificante localizado en el cromosoma 9 (9q21.22) que es sobre-expresado de 60 a 100 veces más en el CaP comparado con el tejido prostático benigno.⁷⁻⁹ En 2003, Hessels reportó que el PCA3 es sobre-expresado en 95% de las células examinadas y demostró la potencial utilidad clínica de la prueba para PCA3 en orina generando un score con un punto de corte de 35.¹⁰ En la actualidad, existen varias pruebas en orina para PCA3 realizadas con diferentes metodologías, como fluorescencia resuelta en el tiempo (TRF), reacción en cadena en tiempo real cuantitativa de la polimerasa (RT-PCR) y amplificación del RNA mediada por transcripción; esta última, con un primer valor de corte fijado en 50 mostró una sensibilidad de 69% y especificidad de 79%. La versión TRF arrojó una sensibilidad de 65% a 67%, especificidad de 66% a 83% y un valor predictivo negativo de 80% a 90%. La prueba uPM3 con un punto de corte de 0.5 mostró una sensibilidad de 66% a 82%, especificidad de 76% a 89%. Hasta el momento la prueba de PCA3 en orina no está considerada, por si sola, como escrutinio para CaP, su utilidad ha sido investigada en relación con el APE en la mayoría de los estudios realizados. Este gen muestra una especificidad superior al APE a diferentes cortes e incrementa la probabilidad de una biopsia de positiva, especialmente en la zona gris del APE.¹¹⁻¹⁷

■ OBJETIVO

Establecer la utilidad clínica mediante la medición de la especificidad de la determinación del PCA3 en orina para el diagnóstico de CaP en la biopsia de pacientes mexicanos en el Hospital General Dr. Manuel Gea González.

■ MÉTODOS

Es un estudio prospectivo, experimental, longitudinal, de cohorte, realizado entre abril de 2008 y septiembre de 2010. Se incluyeron a 157 pacientes con un APE sérico elevado (mayor a 4 ng/mL) o tacto rectal anormal programados a biopsia prostática trans-rectal guiada por ultrasonido (BxTRUS), sin importar primera serie o de repetición, siendo estos los criterios de inclusión. La aprobación fue obtenida por el Comité Institucional de Ética y por escrito el consentimiento informado de

Tabla 1. Características generales de los casos incluidos.

Variables	Total	CaP	No CaP
Nº de Pacientes (%)	157 (100)	39 (25)	118 (75)
Edad			
Promedio	64	64	67
APE ng/mL			
Menos de 4	4(2.6%)	15(38.5%)	3(2.5%)
4 a 10	86(54.8%)	11(28%)	73(61.8%)
10 a 20	44(28%)	13(33.5%)	32(27.2%)
más de 20	23(14.6%)		10(8.5%)
Tacto rectal :			
Sospechoso	58(37%)	26(66.6%)	32(27%)
No sospechoso	99(63%)	13(33.3%)	86(73%)
PCA3:			
Positivo N° pacientes %	89	36 (92.4%)	53(45%)
Score	31	20	34
Negativo	68	3 (7.6%)	65(55%)

participación de cada paciente. Los pacientes con alguna manipulación transuretral reciente, retención aguda de orina, radioterapia, terapia hormonal, portadores de catéter transuretral permanente o infección urinaria aguda antes de la biopsia fueron excluidos del estudio.

Se recolectaron 20 mL a 30 mL de la primera orina posterior a masaje prostático, previo a la realización de la BxTRUS. Las BxTRUS fueron realizadas por urólogos con un equipo de ultrasonido ALOKA Pro Sound SSD-400 plus tomando 12 cilindros en cada paciente y analizadas por el servicio de patología de la institución. Las muestras se depositaron en tubos que contenían 20 mL de una solución estabilizadora de ácidos nucleicos y enviadas al INMEGEN en donde fueron procesadas y analizadas. Los tubos se centrifugaron a 3000 rpm, desecharon el sobrenadante, el botón celular se lavó dos veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Una vez obtenido el botón celular se inició la extracción de RNA total por medio del RNeasy Mini Kit (Qiagen). La cuantificación de RNA obtenidos se llevó a cabo empleando el equipo espectrofotométrico NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc). Se realizó la transcripción reversa (RT) para la obtención de cDNA. Se emplearon 6 µL del

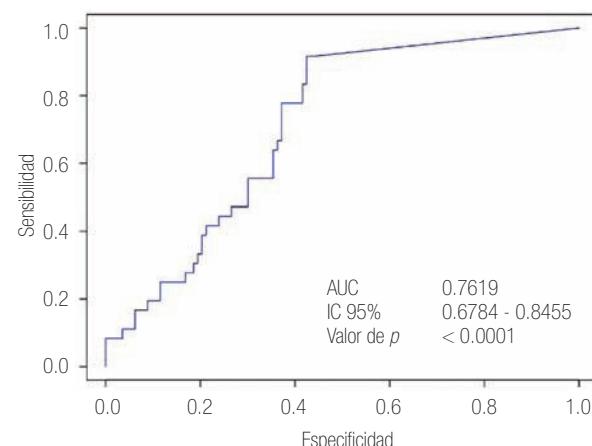
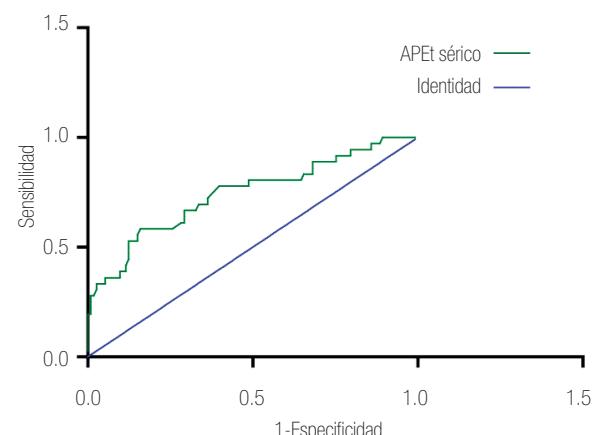
Tabla 2. Sensibilidad y especificidad para la prueba PCA3.

PCA3 Corte	Sen (%)	Esp (%)	APEt sérico	Sen (%)	Esp (%)
15	95	68	5	88	80
31	68	74	10	66	23
32	56	77	15	50	11
33	45	88	20	38	7
34	30	94	30	33	1

producto de la RT para realizar una reacción de pre-amplificación, con la finalidad de obtener un mayor número de copias de cDNA, lo que permite una mejor detección durante el análisis de expresión relativa. Se utilizaron 5 μ L de cDNA pre-amplificado para medir la expresión por PCR en tiempo real del gen PCA3 utilizando el equipo ABI 7900 y sondas Taqman (Applied Biosystems). Con los datos de Ct obtenidos como resultados se procedió a hacer el análisis y la construcción de las Curvas ROC para establecer las condiciones de especificidad y sensibilidad de la prueba. La habilidad del puntaje de PCA3 para predecir el resultado de la biopsia fue evaluada y comparada con el APEt sérico, APE en zona gris.

■ RESULTADOS

Las características de los pacientes se muestran en la **Tabla 1**. De los 157 pacientes sometidos a biopsias, el promedio de edad fue de 64 años, los rangos del APE fueron de 0.8 ng/mL a 1160 ng/mL (promedio: 30.9 ng/mL). Noventa y nueve pacientes (67%) tuvieron un tacto rectal no sospechoso, ocho pacientes tenían el antecedente de una biopsia previa, tres con dos series de biopsias previas negativas. La media del score para PCA3 fue 31 (7 a 39). El diagnóstico de CaP se realizó en 39 pacientes (25%), la distribución por el grado de Gleason se muestra en la **Tabla 2**. La suma de Gleason en la biopsia no se correlacionó con el score de PCA3. En los 118 pacientes (75%) negativos a cáncer, el diagnóstico histopatológico más común fue el de atrofia simple y parcial, seguido por inflamación crónica. El punto de corte en el análisis para evaluar la precisión en predecir el diagnóstico de CaP con la prueba PCA3 en orina fue 31, identificado como el corte o score estadísticamente más significativo comparado con el resultado de la biopsia como método de referencia (estándar de oro) (**Imagen 1**). La curva ROC mostró un área bajo la curva (ABC) para PCA3 de 0.76. (IC 95% 0.67 a 0.85) con una $p = 0.0001$ (**Imagen 1**). El ABC del APE total sérico fue de 0.69 (IC 95% 0.52 a 0.86) indicando una menor precisión para el diagnóstico

**Imagen 1.** Curva ROC que muestra el ABC del PCA3.**Imagen 2.** Antígeno prostático total sérico y su tendencia en su especificidad y sensibilidad.

de CaP en esta población. La sensibilidad y especificidad para PCA3 en la curva ROC fue medida a diferentes puntos de corte; considerando el score de 31, la prueba mostró una sensibilidad de 68% y especificidad de 76% con un valor predictivo positivo (VPP) de 45%, y valor predictivo negativo (VPN) de 95%, con Odds ratio de 9.3 (**Imagen 2** y **Tablas 2 a 4**). El APE mostró sensibilidad de 33%, especificidad de 26%, valor predictivo positivo de 13% y valor predictivo negativo de 53% (**Tabla 5**). De los 39 pacientes con biopsias positivas, 15 (38%) se encontraron con APE en zona gris. El promedio de edad fue de 64 años (rango 51 a 81), el APE promedio fue 7 ng/mL (rango 4.08 ng/mL a 9.8 ng/mL), la %flAPE promedio fue 13% (rango 7% a 28%). En los 39 pacientes el PCA3 amplificó y con un punto de corte de 26 mostró sensibilidad de 88% y especificidad de 74% con una ABC 0.76 (IC 95% 0.67 - 0.84; $p = 0.0001$).

Tabla 3. Sensibilidad y especificidad de la prueba PCA3 en orina.

		IC 95%	
	Valor	Inferior	Superior
Sensibilidad (%)	68.89	58.21	80.00
Especificidad (%)	76.92	67.84	87.55
Valor predictivo + (%)	45.02	22.87	55.18
Valor predictivo - (%)	95.10	82.16	100.00

■ DISCUSIÓN

Existen varios trabajos publicados con metodologías diferentes para la obtención de la amplificación del mRNA PCA3, así como puntajes diferentes para éste, pero con una especificidad y sensibilidad similares. La metodología empleada para la prueba en este estudio y la cantidad de pacientes ya analizados muestran gran semejanza con diversas investigaciones realizadas. En los pacientes con una biopsia positiva, el análisis de la curva ROC para PCA3 como indicador diagnóstico usando la biopsia como método de referencia, mostró una AUC de 0.76 (IC 0.67 – 0.84).

Chun y colaboradores en su análisis univariado y multivariado determinó al PCA3 como factor predictor independiente para riesgo de CaP con significancia estadística ($p < 0.001$).¹⁷ El análisis y la precisión diagnóstica del PCA3 es independiente del nivel de APE sérico y sin importar si el paciente se somete a una primera biopsia o una de repetición, existen controversias sobre las puntuaciones de PCA3 y la correlación con el volumen prostático y la puntuación de Gleason en la biopsia, en nuestro estudio el score de PCA3 no se correlaciona con el Gleason en la biopsia. Otros análisis realizados con score de PCA3 y los resultados histopatológicos en la prostatectomía radical han abierto la posibilidad para determinar que pacientes podrían ser candidatos a vigilancia activa, esto podría ser útil en pacientes que persisten con APE elevados, ya con una serie de biopsia negativa y un score de PCA3 negativo o que sugiera canceres clínicamente insignificantes, por lo que en nuestra serie el seguimiento de pacientes con biopsia previa negativa y PCA3 positivo o negativo se está llevando a cabo.

Por el momento, la medición de PCA3 en orina es la primer prueba molecular en fluidos corporales que se está empleando como una herramienta valiosa para predecir el resultado de la biopsia, especialmente en hombres con elevación crónica del APE debido a inflamación crónica o prostatitis. El PCA3 puede ayudar a estratificar a los pacientes según su riesgo de desarrollar cáncer de próstata.

Tabla 4. Estimación de riesgo.

		IC 95%	
	Valor	inferior	superior
Odds ratio	9.33	1.94	44.76

Tabla 5. Sensibilidad y especificidad del APE total sérico.

		IC 95%	
	Valor	Inferior	Superior
Sensibilidad (%)	33.33	8.78	57.89
Especificidad (%)	26.92	13.91	39.94
Valor predictivo + (%)	13.64	2.36	24.91
Valor predictivo - (%)	53.85	32.76	74.93

■ CONCLUSIONES

Es indispensable un mayor número de pacientes para validar absolutamente esta prueba y con un seguimiento a largo tiempo en aquellos pacientes que amplificaron para PCA3 con biopsias negativas. Hasta este momento los resultados para la prueba PCA3 demuestran ser una prueba viable y que pueda ser considerada como apoyo en la detección de CaP en pacientes mexicanos.

BIBLIOGRAFÍA

1. INEGI. Febrero 2010, www.inegi.org.mx.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008. CA Cancer J Clin 2008;58:71-96.
3. Deras IL, Aubin SM, Blase A, et al. PCA3: a molecular urine assay for predicting prostate biopsy outcome. J Urol 2008;179:1587-92.
4. Haese A, De la Taille A, et al. Clinical Utility of the PCA3 Urine Assay in European Men Scheduled for Repeat Biopsy. Eur Urol 2008;54:1081-8.
5. Heidenreich A, Aus G, Bolla M, et al. EAU guidelines on prostate cancer. Eur Urol 2008;54:693-5.
6. Raja J, Ramachandran N, Munneke G, Patel U. Current status of transrectal ultrasound-guided prostate biopsy in the diagnosis of prostate cancer. Clin Radiol 2006;61:142-53.
7. Tinzl M, Marberger M, Horvath S, Chypre C. DD3PCA3 RNA analysis in urine—a new perspective for detecting prostate cancer. Eur Urol 2004;46:182-186.
8. Wright L, Lange P, et al. Newer Potential Biomarkers in Prostate Cancer. Rev Urol 2007;9:207-13.
9. Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Verhaegh GW, et al. A new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. Cancer Res 1999;59:5975-9.
10. Hessels D, Klein Gunnink JM, van Oort I, et al. DD3 (PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. Eur Urol 2003;44:8-15.
11. Schalken JA, Hessel D, Verhaegh G. New targets for therapy in prostate cancer: differential display code 3 (DD3 (PCA3)), a highly prostate cancer-specific gene. Urology 2003;62(5Suppl1):34-43.
12. De Kok JB, et al. DD3PCA3, a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. Cancer Res 2002;62:2695-8.
13. Groskopf J, Aubin SM, Deras IL, et al. APTIMA PCA3 molecular urine test: development of a method to aid in the diagnosis of prostate cancer. Clin Chem 2006;52:1089-95.

14. Marks LS, Fradet Y, Deras IL, et al. PCA3 molecular urine assay for prostate cancer in men undergoing repeat biopsy. *Urology* 2007;69:532-5.
15. Shappell SB. Clinical utility of prostate carcinoma molecular diagnostic tests. *Rev Urol* 2008;10:44-69.
16. Fradet Y, Saad F, Aprikian A, et al. uPM3, a new molecular urine test for the detection of prostate cancer. *Urology* 2004;64:311-5.
17. Chun F, De la Taille A, et al. Prostate cancer gene 3 (PCA3): Development and internal validation of a novel biopsy nomogram. *Eur Urol* 2010;57:e1.