

## EL USO DE LA DETECCIÓN DE CÉLULAS PROSTÁTICAS EN LA CIRCULACIÓN SANGUÍNEA PODRÍA DISMINUIR EL NÚMERO DE BIOPSIAS PROSTÁTICAS NECESARIAS PARA DETECTAR CÁNCER PROSTÁTICO

### DETECTION OF CIRCULATING PROSTATE CELLS COULD AVOID PROSTATE BIOPSIES

NIGEL P. MURRAY<sup>1,2,3</sup>, LEONARDO BADÍNEZ V<sup>4,5</sup>, NELSON ORELLANA S<sup>6</sup>, RICARDO DUEÑAS R<sup>6</sup>, ORLANDO BADÍNEZ V<sup>5</sup>, EDUARDO REYES<sup>7</sup>.

<sup>1</sup>Subdivisión Hematología, Hospital de Carabineros de Chile. <sup>2</sup>Facultad de Medicina, Universidad Mayor. <sup>3</sup>Instituto de Bio-Oncología, Avda. Salvador 95, Oficina 513, Providencia, Santiago. <sup>4</sup>Fundación Arturo López Pérez. <sup>5</sup>INRAD. <sup>6</sup>División de Urología, Hospital de Carabineros de Chile. <sup>7</sup>Becado Urología, Universidad de Santiago.

### RESUMEN

*Introducción:* El uso del antígeno prostático específico como pesquisa para cáncer prostático ha significado según algunos estudios una disminución en la mortalidad y un cambio hacia las etapas más precoces. Pero, implica también que aproximadamente 70% de los hombres con un APE elevado tendrán una biopsia negativa para cáncer, asumiéndose los riesgos de hemorragia e infección del procedimiento. Presentamos un estudio sobre la detección de células prostáticas en la circulación sanguínea como examen complementario y los resultados de la biopsia prostática.

*Método y pacientes:* A hombres que cumplían con los criterios para someterse a una biopsia prostática, se les tomó una muestra de sangre. Las células mononucleares fueron separadas usando centrifugación diferencial y las células prostáticas detectadas usando anticuerpos monoclonales contra el APE y identificadas con inmunocitoquímica. Los resultados de la presencia o ausencia de las CPCs fueron comparados con los resultados de la biopsia. La biopsia fue dirigida por ecografía y tomada siguiendo la norma estándar en sextante.

*Resultados:* Participaron 358 hombres, de éstos, 91 pacientes cumplieron con los criterios para una biopsia, de los cuales 86 se les tomó una biopsia. La ausencia de CPCs fue asociada con una biopsia negativa en 94,7% (54/57) y hubo CPCs detectadas en 24/27 (89%) de los casos con una biopsia positiva para cáncer. En 3 casos biopsia positiva CPC negativa el cáncer fue de bajo grado y localizado. Hubo una sensibilidad de 91,5% y una especificidad de 89,0%.

*Conclusiones:* Hombres negativo para CPCs tienen una alta posibilidad de una biopsia prostática negativa (94,7%), en estos hombres es posible postergar la biopsia con un monitoreo cuidadoso del APE sérico. Evitando biopsias no necesarias disminuirán los riesgos asociados al paciente sin aumentar los riesgos de no detectar un cáncer agresivo.

*Palabras claves:* cáncer prostático, células prostáticas en la circulación, pesquisa de cáncer, APE sérico, biopsia prostática.

Correspondencia a: Dr. Nigel P Murray, Facultad de Medicina Universidad Mayor, Renato Sánchez 4369, Las Condes, Santiago. E-mail: nigelpetermurray@gmail.com

Recibido: 29 de mayo de 2009. Aceptado: 28 de julio de 2009.

## ABSTRACT

*Introduction: The widespread use of PSA screening for prostate cancer has decreased mortality and increased early stage detection. However, approximately 70% of biopsies will be negative in men with an increased PSA, incurring in the associated risks of haemorrhage and infection. We report the use of circulating prostate cells (CPCs) as a complementary test and compare the results with the associated prostate biopsy.*

*Patients and Methods: Men fulfilling biopsy criteria had a blood sample taken, the mononuclear cells were separated using differential centrifugation and detected using monoclonal antibodies against PSA and identified using monoclonal antibodies against PSA and identified using immunocytochemistry. Standard ultrasound guided sextant biopsy was used. The presence or absence of CPCs was compared with prostate biopsy results.*

*Results: Of 358 men participating in the study 91 fulfilled biopsy criteria of which 86 underwent biopsy. The absence of CPCs was seen in 94.7% of cases (54/57) with a negative biopsy. In the 3 remaining cases the CPC negative patient had a low grade local cancer. Overall there was a sensitivity of 91.5% and specificity of 89.0%.*

*Conclusions: Men with negative CPC have a high probability of a negative biopsy, in these patients the biopsy could be deferred with close monitoring of PSA levels, thus avoiding biopsy complications. This would avoid unnecessary risks without jeopardizing early stage cancer detection.*

*Key words: prostate cancer, cancer screening, circulating prostate cells, prostate biopsy, PSA.*

## INTRODUCCIÓN

El antígeno prostático específico sérico (APE) es el único marcador utilizado como rutina para la detección precoz de cáncer prostático, pero no es un examen perfecto. Aun el APE es altamente específico para la próstata, un nivel elevado no es específico para cáncer y puede ser el resultado de una hiperplasia benigna o prostatitis<sup>1,2</sup>. Por lo tanto la mayoría de los hombres con un APE sérico elevado no tienen cáncer prostático, y como consecuencia tendrán una biopsia prostática innecesaria.

Cifras desde EE.UU. estiman que de las millones de biopsias de la próstata cada año, hay 235.000 casos de cáncer prostático detectado, o más de 750.000 varones tuvieron una biopsia basada en un APE sérico elevado por enfermedades benignas<sup>3,4</sup>. Data del estudio *Prostate Cancer Prevention Trial* mostró que no hay un punto de corte para el APE sérico; por los valores del APE sérico hasta 4 ng/ml la sensibilidad tuvo una variación entre 21% a 83% y la especificidad de 39% a 94% con un valor de predicción positivo de entre 7% a 27%<sup>5</sup>.

La búsqueda de nuevos marcadores como porcentaje APE sérico libre<sup>6</sup>, APE intacto sérico<sup>7</sup>, pro-APE sérico<sup>8</sup> y kallikreina<sup>9</sup> generalmente ha sido de utilidad en la detección de cáncer prostático. Aun-

que un marcador pueda mejorar la precisión de la pesquisa es posible que no haga una diferencia en la práctica clínica por la necesidad de muestras frescas, de alta tecnología o costos<sup>10</sup>.

En este artículo analizamos una cohorte de pacientes quienes participaron en un estudio de detección de cáncer prostático comparando el APE sérico con la presencia de células prostáticas en la circulación sanguínea (CPCs), y los resultados de la biopsia prostática. El objetivo es determinar la utilidad de la ausencia de CPCs y la asociación con una biopsia negativa para descartar cáncer prostático.

## PACIENTES Y MÉTODOS

Todos los hombres mayores de 45 años, sin una historia previa de cáncer prostático y cumpliendo con los criterios para una biopsia prostática fueron incluidos en el estudio. Los criterios para una biopsia prostática fueron, un APE sérico >4,0 ng/ml, un examen rectal anormal o una velocidad de APE sérico >0,75 ng/ml/año. Por cada paciente se registraron los siguientes datos; edad, APE sérico, resultados del examen rectal y resultados de la ecografía pelviana masculina cuando estuvo disponible.

Después de una autorización por escrito una muestra de 4 ml de sangre venosa fue obtenida de la vena cubital usando una aguja de 21G y colectada en un tubo con EDTA como anticoagulante (Beckinson-Vacutainer®). Cada paciente fue identificado con un código de 3 números, permitiendo un estudio ciego a los detalles clínicos.

Las células mononucleares fueron obtenidas por centrifugación diferencial usando Histopaque 1,077® (Sigma-Aldrich) y los frotis secados en aire y fijados como se describió previamente<sup>11,12</sup>.

#### *Inmunocitoquímica*

Los CPCs fueron detectados usando un anticuerpo monoclonal dirigido contra APE clon 28A4 (Novocastro Laboratory, Reino Unido) e identificado con un sistema basado en fosfatasa alcalina-antifosfatasa alcalina con neo-fuscina como cromogen.

Muestras positivas tuvieron un segundo proceso con anti-P504S clon 13H4 (DAKO, EE.UU.) e identificado con un sistema de peroxidasa y DAB como cromogen (por detalles ver 11,12). Una CPC fue definida según los criterios de ISHAGE<sup>13</sup> y para la expresión de P504S según el Consenso de la Asociación de Patólogos de EE.UU.<sup>14</sup>.

#### *Análisis estadístico*

Se usaron las estadísticas descriptivas para las variables demográficas, la prueba de t Student para las diferencias en promedio entre pacientes y la prueba de Chi-cuadrado y de Fisher para las diferencias de proporciones. Se consideró un error alfa de 0,05, un error beta de 0,20 y  $p < 0,05$  como significativo.

#### *Consideraciones éticas*

El estudio estuvo dirigido con la completa conformidad de los principios de la Declaración de Helsinki

(como las modificaciones de Tokio, Venecia y de Hong Kong) y la aprobación del Comité de Ética del Hospital de Carabineros de Chile.

## RESULTADOS

Trescientos cincuenta y ocho hombres participaron con una edad promedio de  $64,51 \pm DE 9,82$  años y un APE sérico promedio de  $2,84 \text{ ng/ml} \pm DE 2,36 \text{ ng/ml}$ . De estos pacientes, 91 cumplieron con los criterios de una biopsia prostática de los cuales 86 tuvieron una biopsia. Los 5 hombres excluidos fueron por la edad,  $>85$ , en 4 y comorbilidad en el paciente restante. Los hombres con una biopsia tuvieron una edad promedio de  $66,79 \pm DE 8,96$  años y un APE sérico promedio de  $6,38 \pm 6,14 \text{ ng/ml}$  (rango 0,02-40,0 ng/ml).

La asociación de la detección de las CPCs con los resultados de la biopsia se demuestra en la Tabla 1. La sensibilidad es 91,5% y la especificidad de 89,0%.

Los 3 hombres con CPC negativa pero con una biopsia positiva, tuvieron adenocarcinoma, con un índice de Gleason de 4 en 2 casos y 5 en el restante, con 10%, 15% y 20% de la muestra con cáncer. La estadificación en los 3 pacientes fue etapa T1N0M0 en 2 casos y T2N0M0 en el tercer caso.

No hubo diferencias en la edad promedio entre los pacientes con una biopsia positiva y negativa,  $66,96 \pm 9,93$  años y  $66,71 \pm 8,57$  años, respectivamente ( $p = 0,90$  prueba t Student 2 colas). En cambio sí hubo diferencia entre los pacientes con una biopsia positiva que tuvieron en promedio un APE sérico más elevado,  $9,29 \pm DE 10,3$  contra  $5,06 \pm 3,35 \text{ ng/ml}$ , respectivamente en los que no se encontró cáncer ( $p < 0,0058$ , Student T, 2 colas).

**Tabla 1. La asociación de la presencia de CPCs con la biopsia prostática**

	Biopsia positiva	Biopsia negativa	Total
CPC positiva	24 (89%)	5	29
CPC negativa	3	54 (91,5%)	57
Total	27	59	86

## DISCUSIÓN

Los pacientes en el estudio se sometieron a una biopsia siguiendo el patrón de mapeo en sextante, algunos centros utilizan las biopsias extendidas como de 12 muestras. El número de biopsias negativas, 68,6% es semejante a los resultados obtenidos en 2 estudios publicados recientemente<sup>15,16</sup>. Los riesgos de una biopsia prostática son: hemorragia e infección, Rietbergen et al en un estudio de 5.802 pacientes con una biopsia transrectal obtuvieron una incidencia de complicaciones de: 0,5% hospitalizaciones, 2,1% hemorragia rectal, 2,3% fiebre y 7,2% hematuria persistente<sup>17</sup>.

El uso de la detección de CPCs en combinación con el APE sérico, podría eliminar 91,5% de las biopsias negativas, a riesgo de no detectar los cánceres CPC negativos (11% de los cánceres detectados por la biopsia). Los cánceres no detectados por la presencia de CPCs fueron de bajo grado y localizados. Una elevación persistente del APE sérico durante el seguimiento en estos pacientes será una indicación de una biopsia irrespectiva de la presencia o ausencia de CPCs.

CPCs expresan APE pero no el antígeno CD45 (pan-leucocito), las CPCs malignas expresan la proteína P504S, a diferencia los leucocitos aún se expresan la proteína P504S, no expresan APE.

El uso de CPCs en pacientes con cáncer prostático aún es controversial. El FDA aprobó 2 sistemas para la detección de CPCs en 2007.

Hemos mostrado que en pacientes con cáncer prostático hay una asociación con la etapa y el índice de Gleason, pero ésta es la primera vez que evaluamos el método en hombres "sanos". Si los resultados son confirmados, la combinación de CPC detección con el APE sérico podría ser útil en hombres en los que se ha indicado tomar una biopsia prostática.

Los hombres con CPC negativas podrían ser observados durante el seguimiento y no sometidos a la biopsia. Esto es importante, considerando la variación del APE sérico con el tiempo.

No es nuestra intención sobreenfatizar nuestros resultados pero sí confirmarlos por estudios más extensivos, el costo-beneficio para el paciente podría ser importante y como el cáncer prostático es parte del Plan GES, el ahorro de recursos del sistema público podría ser considerable.

El examen es simple y podría ser implementado en el laboratorio de rutina, puede ser automatizado y computarizado con microscopía digital.

En resumen hombres con sospecha de cáncer prostático y negativos para CPCs tienen alta posibilidad de que una biopsia sea negativa para cáncer y, por lo tanto, podrían ser observados por un tiempo para determinar los cambios en el APE sérico.

Los cánceres detectados en pacientes CPC negativos son de bajo grado y una demora moderada en hacer la biopsia, con un adecuado seguimiento para evaluar la evolución del caso, no debería ser perjudicial para el paciente.

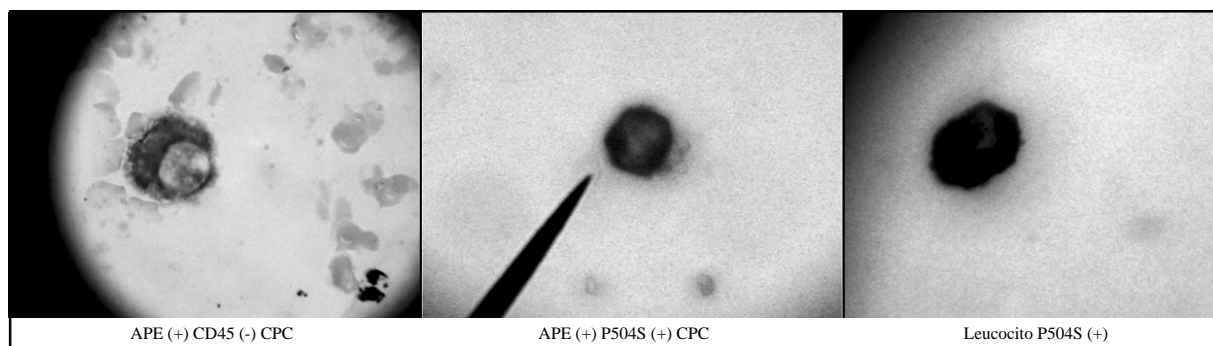


Figura 1. Fotomicrografías de CPCs y leucocitos (x400).

## BIBLIOGRAFÍA

1. PUNGALIA RS, D'AMICO AV, CATALONA WJ, ROEHL KA, KUNTZ KM. Impact of age, benign prostatic hyperplasia and cancer on prostate specific antigen level. *Cancer* 2006; 106: 1507-13.
2. BOZEMAN CB, CARVER BS, EASTHAM JA, VENEABLE DD. Treatment of chronic prostatitis lowers serum prostate specific antigen. *J Urol* 2002; 167: 1723-6.
3. FADARE O, WANG S, MARIAPPAN MR. Practice patterns of clinicians following isolated diagnoses of atypical small acinar proliferation on prostate biopsy specimens. *Arch Pathol Lab Med* 2004; 128: 557-60.
4. JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, MURRAY T, XU J, SMIGAL C, THUN MJ. Cancer statistics. *Cancer J Clin* 2006; 56: 106-30.
5. THOMPSON IM, ANKERST DP, CHI C, LUCIA MS, GOODMAN PJ, CROWLEY JJ, PARNES HL, COLTMAN CA JR. Operating characteristics of prostate specific antigen in men with an initial PSA level of 3,0ng/ml or lower. *JAMA* 2005; 294: 66-70.
6. LEE R, LOCALIO AR, ARMSTRONG K, MALKOWICZ SB, SCHWARTZ JS. A meta-analysis of the performance characteristics of the free prostate specific antigen test. *Urology* 2006; 67: 762-8.
7. STEUBER T, NURMIKKO P, HAESE A, PETTERSSON K, GRAEFEN M, HAMMERER P ET AL. Discrimination of benign from malignant prostate disease by selective measurements of single chain, intact free prostate specific antigen. *J Urol* 2002; 168: 1917-22.
8. LEIN M, SEMJONOW A, GRAEFEN M, KWIATKOWSKI M, ABRAMJUK C, STEPHAN C ET AL. A multicenter clinical trial of the use of (-5, -7) pro prostate specific antigen. *J Urol* 2005; 174: 2150-3.
9. STEPHAN C, JUNG K, LEIN M, SINHA P, SCHNORR D, LEONING SA. Molecular forms of prostate specific antigen and human kallikrein 2 as promising tools for early diagnosis of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 1133-47.
10. VILLANEUVA J, SCHAFFER DR, PHILLIP J, CHAPORRO CA, ERDJUMENT-BROMAGE H, OLSHEN AB, FLEISHER M ET AL. Differential exoprotease activities confer tumor-specific serum peptidome patterns. *J Clin Invest* 2006; 116: 271-84.
11. MURRAY NP. El uso de doble-inmunoconjugación para detectar células prostáticas en la circulación sanguínea (CPCs) en pacientes con cáncer prostático y las correlaciones con los parámetros clínicos. *Rev Chil Urol* 2006; 71: 135-40.
12. MURRAY NP, BADINEZ L. Las células prostáticas en la circulación sanguínea en pacientes con cáncer prostático expresan la proteína P504S: un estudio utilizando inmunocitoquímica. *Rev Chil Urol* 2008; 73: 54-7.
13. BORGES G. Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in bone marrow and blood: Establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells. *ISHAGE Cytotherapy* 1999; 5: 377-88.
14. RUBIN MA, ZHOU M, DHANASEKARAN SM. Alpha-methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. *JAMA* 2002; 287: 1662-70.
15. SCHRODER FH, HUGOSSON J, ROOBOL MJ, TAMMELA TLJ, CIATTO S, NELEN V ET AL. Screening and prostate cancer mortality in a randomized European Study. *NEJM* 2009; 360: 1320-8.
16. ANDIOLE GL, GRUBB RL III, BUYS SS, CHIA D, CHURCH TR, FOUAD MN ET AL. Mortality results from a randomized prostate cancer screening trial. *NEJM* 2009; 360: 1310-19.
17. RIETBERGEN JB, KRUGER AE, KRANSE R, SCHRODER F. Complications of transrectal ultrasound guided systematic sextant biopsies of the prostate: evaluation of complication rates and risk factors within a population based screening program. *Urology* 1997; 49: 875-80.