



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ"**

**“ESPECIFICIDAD DE LA DETERMINACIÓN DE PCA3 EN ORINA PARA LA
DETECCIÓN DE CÁNCER DE PRÓSTATA EN PACIENTES MEXICANOS EN
EL HOSPITAL GENERAL DR MANUEL GEA GONZÁLEZ”.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER LA ESPECIALIDAD EN
UROLOGÍA.**

P R E S E N T A

Dr. Dorian Valfré Saavedra Briones.

**Dr. Carlos Pacheco Gahbler
Asesor**



JULIO 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado en el Hospital General Dr. Manuel Gea González, en la División de Urología bajo la Dirección del Dr. Carlos Pacheco Gahbler y el Instituto Nacional de Medicina Genómica a través del Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes.

Este trabajo de Tesis con No. 28-53-2010, presentado por el alumno Dorian Valfré Saavedra Briones se presenta en forma con visto bueno por el Tutor principal de la Tesis Dr. Carlos Pacheco Gahbler, y a cargo de la División de Enseñanza e Investigación Dr. Octavio Sierra Martínez y por con fecha del 31 de julio 2010 para su impresión final.

Director de Enseñanza e Investigación.
Dr. Octavio Sierra Martínez.

Tutor principal.
Dr. Carlos Pacheco Gahbler.

Autorizaciones

Dr. Octavio Sierra Martínez
Director de enseñanza e Investigación
Hospital General "Dr. Manuel Gea González"

Dr. Carlos Pacheco Gahbler
Jefe de la División de Urología.
Hospital General "Dr. Manuel Gea González"

Dr. Jorge Gustavo Morales Montor.
Médico adscrito a la División de Urología
Hospital General "Dr. Manuel Gea González".

Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes
Investigador invitado del INMEGEN

**ESPECIFICIDAD DE LA DETERMINACION DE PCA3 EN ORINA PARA LA
DETECCIÓN DE CÁNCER DE PRÓSTATA EN PACIENTES MEXICANOS EN EL
HOSPITAL GENERAL "DR MANUEL GEA GONZÁLEZ".**

Colaboradores:

Nombre: Dr. Carlos Pacheco Gahbler.

Firma: _____

Nombre: Dr. Jorge Gustavo Morales Montor.

Firma: _____

Nombre: Dr. Mauricio Cantellano Orozco.

Firma: _____

Nombre: Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes

Firma: _____

Nombre: Dr. Dorian Valfré Saavedra Briones.

Firma: _____

INDICE

Índice.....	IV
Glosario.....	V
Relación de figuras y tablas.....	VI
Resumen.....	XI
Abstract.....	XII
1. Antecedentes.....	1
2. Justificación.....	2
3. Hipótesis.....	3
4. Objetivo.....	4
5. Material y Métodos.....	5
5.1. Tipo de estudio	
5.2. Criterios de selección de la muestra	
5.3. Variables	
5.4. Tamaño de la muestra	
5.5. Análisis estadístico	
5.6. Descripción operativa del estudio	
6. Resultados.....	8
7. Discusión.....	9
8. Conclusiones.....	11
9. Perspectivas.....	12
10. Bibliografía.....	13

GLOSARIO

mRNA: Acido ribonucleico mensajero

cDNA: Acido desoxirribonucleico complementario.

Ct: numero de ciclos.

APeT: Antígeno prostático específico total

%fIAPE: Porcentaje de la fracción libre del antígeno prostático específico.

AUC: Área bajo la curva

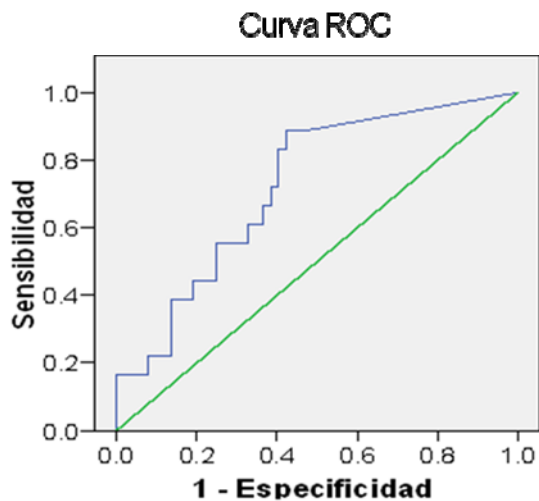
CaP: Cáncer de próstata.

BxTRUS: Biopsias prostáticas transrectales guiadas por ultrasonido.

INMEGEN: Instituto Nacional de Medicina Genómica

RELACION DE TABLAS Y GRÁFICAS

Gráfica 1.



Grafica 1. Análisis Curva ROC usando el score de PCA3 como indicador diagnóstico y biopsia prostática como método de referencia.

Tabla 1.

Tabla 1. Sensibilidad y especificidad para la prueba PCA3

PCA3 Corte	Sen (%)	Esp (%)	APEt sérico	Sen (%)	Esp (%)
15	88	48	5	88	80
31	88	46	10	66	23
32	88	42	15	50	11
33	77	40	20	38	7
34	66	38	30	33	1

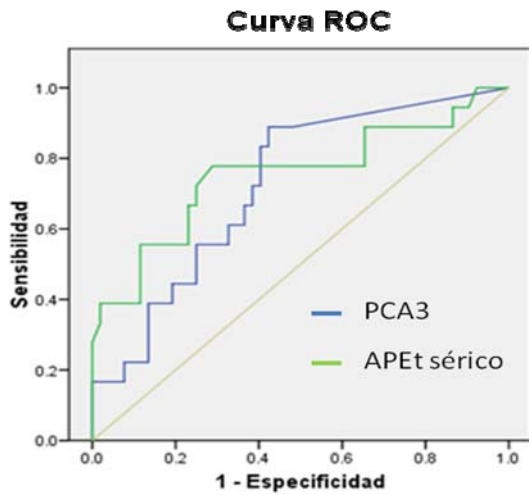
Tabla 2. Sensibilidad y especificidad de la prueba PCA3 en orina.

Tabla 2. Sensibilidad y especificidad para la prueba PCA3 y APE total sérico							
	Valor	Inferior	Superior		Valor	Inferior	Superior
	IC 95%				IC 95%		
Sensibilidad (%)	88.89	71.59	100.00	Sensibilidad (%)	33.33	8.78	57.89
Especificidad (%)	51.92	37.38	66.46	Especificidad (%)	26.92	13.91	39.94
Valor predictivo + (%)	39.02	22.87	55.18	Valor predictivo + (%)	13.64	2.36	24.91
Valor predictivo - (%)	93.10	82.16	100.00	Valor predictivo - (%)	53.85	32.76	74.93

Tabla 3. Estimación de Riesgo.

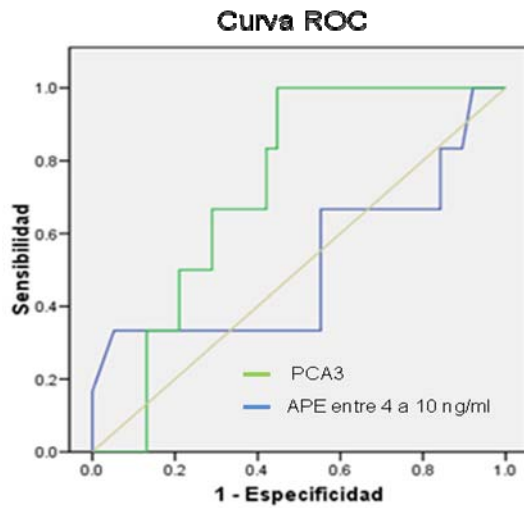
	IC 95%		
Valor	inferior	superior	
Odds ratio	9.33	1.94	44.76

Gráfica 2.



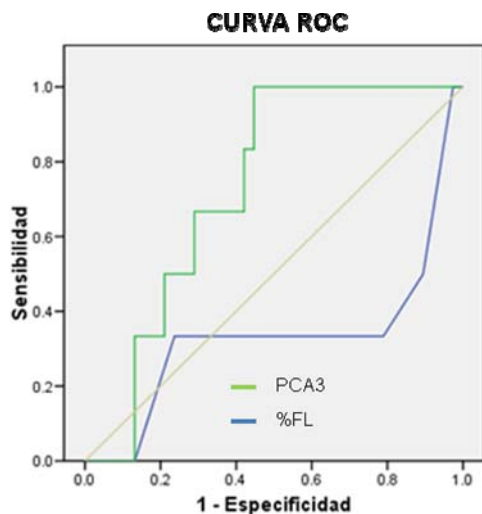
Gráfica 2. Análisis curva ROC usando score de PCA3 y APE sérico como indicador diagnóstico y biopsia prostática como método de referencia

Gráfica 3.



Gráfica 3. Análisis curva ROC usando el score PCA3 y APE en zona gris como indicador diagnóstico y biopsia prostática como método de referencia

Gráfica 4.



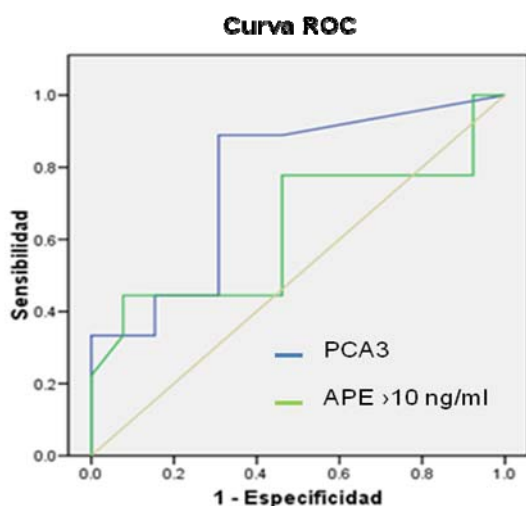
Gráfica 4. Análisis curva ROC usando el score PCA3 o %FL del APE en zona gris como indicador diagnóstico y biopsia prostática como método de referencia.

Tabla 4:

Tabla 4. Sensibilidad y especificidad para la prueba PCA3

PCA3 Corte	Sen (%)	Esp (%)	APE	Sen (%)	Esp (%)	FL	Sen (%)	Esp (%)
			4 y10ng/ml					
15	100	50	5	83	84	8	83	94
32	100	47	5.5	66	73	10	50	89
33	83	42	6.5	33	55	13	33	71
34	66	39	8.5	33	21	17	33	36
35	66	31	9.5	33	5	20	16	18

Gráfica 5.



Gráfica 5. Análisis Curva ROC usando PCA3 y APE mayor a 10ng/ml como Indicador diagnóstico y biopsia prostática como método de referencia

Tabla 5.

Tabla 6. Estudios de PCA3				
Autores	Año	PCA test	No de pacientes	AUC ROC
Hessels	2003	Flourescence-based RT-PCR	108	0.72 (0.58-0.85)
Tinzi	2004	uPM3	201	0.87 (0.81-0.92)
Fradet	2004	uPM3	443	0.86 (0.82-0.89)
Groskopf	2006	APTIMA	143	0.75 (0.57-0.92)
Marks	2007	APTIMA	226	0.68 (0.60-0.76)
Van Gils	2007	Flourescence-based	534	0.66 (0.61-0.71)
Haese	2008	PROGENSA	463	0.65
Saavedra	2009	INMEGEN PCA3	70	0.72 (0.59-0.85)

RESUMEN

ANTECEDENTES: El APE sérico carece de especificidad. El gen PCA3 es altamente específico para el cáncer de próstata (CaP) y detectable en orina posterior a masaje prostático. El ensayo para la prueba de PCA3 está basado en la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos para la detección del mRNA del gen PCA3, la cual ha mostrando una promesa como ayuda en el diagnóstico del CaP, identificando a pacientes con una alta probabilidad de una biopsia positiva.

OBJETIVO: Establecer la potencial utilidad clínica de la prueba de PCA3 en orina, desarrollada en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) para predecir el resultado de la biopsia prostática en la detección de CaP en pacientes mexicanos

MATERIAL Y METODOS: Es un estudio prospectivo, experimental, longitudinal y de cohorte, que incluye a pacientes programados a biopsia prostática con APE sérico mayor a 4ng/dl y/o tacto rectal sospechoso entre abril 2008 a agosto 2010. Posterior al masaje prostático se colectaron 30 ml de orina de 78 pacientes. Se realizó la extracción de RNA total y usando la retrotranscripción reversa para la obtención de cDNA. Los experimentos de PCR en tiempo real utilizando el cDNA para la amplificación del gen PCA3. 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, %flAPE y APE mayor a 10ng/ml

RESULTADOS:

Se reportan los resultados iniciales de 78 hombres incluidos con un valor de APE sérico mayor a 4ng/dl y/o tacto rectal sospechoso sometidos a biopsia prostática entre abril 2008 y agosto 2009. El rendimiento del RNA fue adecuado para el análisis de las muestras de orina en 70 de 78 pacientes. La biopsia reveló cáncer de próstata en 18 (25%) de los 70 pacientes. De estos 18, 16 amplificaron para PCA3. La curva ROC mostró un AUC de 0.72 para el PCA3, en contraste con el AUC del APE sérico que fue de 0.69. Usando el puntaje PCA3 de corte de 31, la sensibilidad de la prueba fue 83% y de especificidad del 44%. El valor predictivo positivo para la biopsia fue de 39% y el valor predictivo negativo del 93%. La especificidad del APE sérico en este mismo grupo de pacientes fue del 33%.

CONCLUSIONES:

El puntaje del PCA3 fue superior a la determinación del APE sérico para predecir el resultado de la biopsia en pacientes con sospecha de CaP. La alta especificidad indica que el PCA3 podría tener un papel importante en el diagnóstico, prometiendo ser una herramienta para el análisis molecular de la orina y para la reducción del número de biopsias de innecesarias. Hasta este momento no existe literatura latinoamericana con uso de PCA3 en orina como ayuda en la detección de cáncer de próstata. Con el desarrollo de esta prueba, de bajo costo y en corto tiempo, es necesario llevarla a cabo en un número mayor pacientes además de un mayor tiempo de seguimiento para considerar su potencial utilidad y aplicación como marcador tumoral.

ABSTRACT

BACKGROUND: The serum PSA lacks specificity. The gene PCA3 is highly specific for prostate cancer and detectable in urine after prostate massage. The test for PCA3 assay is based on amplification of nucleic acid sequences for the detection of gene PCA3 mRNA, which has shown promise as an aid in the diagnosis of prostate cancer, identifying patients with a high probability of a positive biopsy.

OBJECTIVE: To establish the potential clinical utility of the PCA3 urine assay urine samples developed at INMEGEN to predict the biopsy outcome to detect prostate cancer in Mexican patients

MATERIAL AND METHODS:

It is a prospective longitudinal, cohort study that involving men scheduled for prostate biopsy due to serum PSA 4ng/dl or greater, abnormal DRE. After prostatic massage were collected urine sample (30ml first catch) of 78 patients, the tubes were centrifuged at 3000 rpm, the supernatant was discarded and the cell pellets washed twice with phosphate-buffered saline (PBS). Once the start button cell total RNA extraction kit through easymini RNA kit (Quiagen). To check the amount and quality of RNA used a chip and bioanalyzer 2100 (Agilent). Reverse transcription was performed to obtain cDNA. Using 2 μ l of cDNA for amplification of the PCA3 gene and PSA (PSA) using Taqman probes (Applied Biosystems). The experiments of real-time PCR was performed with the ABI 7900HT equipment. Using CT data obtained as a result proceeded to do the analysis and the construction of ROC curves to establish the conditions of specificity and sensitivity of the test. The ability of the PCA3 score to predict the biopsy outcome was assessed and compared to serum PSA levels.

RESULTS:

We included 78 men with a serum PSA value greater than 4ng/dl and / or suspicious DRE underwent prostate biopsy between April 2009 and August 2009. The RNA yield was adequate for the analysis of urine samples from 70 of 78 patients. The biopsy revealed prostate cancer in 16 (25%) of 70 remaining subjects. Of these 16 patients, 14 amplified for mRNAPCA3. The ROC curve analysis yielded an area under the curve of 0.61 for the PCA3, in contrast the area under the curve of serum PSA was 0.42. Using the PCA3 score cutoff of 31, the assay sensitivity was 85% and specificity of 64% (Sensitivity: 52.17% (95% CI: 29.5 to 74.) Specificity: 90.91% (95% CI 76.62 to 100.00). The positive predictive value for biopsy was 85% and negative predictive value of 64%. The specificity of serum PSA in this patient group was 28%.

CONCLUSIONS:

The PCA3 score was superior to the determination of serum PSA to predict biopsy the outcome in patients with suspected prostate cancer. The high specificity suggest that PCA3 could have an important role in prostate cancer diagnosis, promising to be a tool for molecular urine analysis in Mexican patients, with great potential in reducing the number of unnecessary biopsies. Until now there is no Latin American literature with use of PCA3 in urine to aid in the detection of prostate cancer. With the development of this low cost and quick PCA3 assay, it is necessary to apply it in a great number of patients and a long time follow up of time to consider its utility and application as a tumor marker.

1. ANTECEDENTES

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. Su transcripción es un mRNA no codificante localizado en el cromosoma 9 (9q21.22) que es sobreexpresado de 60 a 100 veces más en el CaP comparado con el tejido prostático benigno ⁽⁹⁾.

Demostrando que las pruebas moleculares para la expresión de este gen tienen una mayor especificidad para la detección de cáncer comparándolas con el APE ⁽¹⁰⁾. Al análisis histopatológico la determinación de PCA3 puede separar tejidos benignos de las células malignas de la próstata con una precisión cercana al 100% ^(11,21). La posibilidad de realizar la prueba para el PCA3 en orina como marcador tumoral para CaP fue sugerida por Kok en 2002 ⁽¹²⁾.

En 2003, Hessels reportó que el PCA3 es sobreexpresado en el 95% de las células examinadas y demostró la potencial utilidad clínica para PCA3 en orina, generando un score con un punto de corte de 35 ⁽¹⁰⁾. Se menciona que este gen ha sido superior al APE logrando a una especificidad del 72% y una sensibilidad de 58%. Hasta la fecha diversos estudios reportan una alta especificidad y sensibilidad a diferentes cortes del score de PCA3, observando que el incremento en éste aumenta la probabilidad de una biopsia de positiva, determinando al PCA3 en orina, como una posible prueba que pueda mejora la exactitud en la detección del CaP, especialmente en la zona gris del APE ^(10,13,14,17).

Existen algunas pruebas en el mercado las cuales son costosas y por el momento sin disponibilidad en México (uPM3, APTIMA PCA3, PROGENSA PCA3.) El empleo de estas pruebas han sido limitadas principalmente para el análisis de la utilidad clínica del PCA3 en la predicción y detección del CaP en biopsias de repetición ⁽⁷⁻¹³⁾.

2. JUSTIFICACION

La detección de cáncer de próstata en Estados Unidos ha aumentado en las últimas dos décadas debido a que anualmente se realizan aproximadamente 1 millón de biopsias. A pesar de esto, durante el 2007 se registraron 28.000 muertes por esta enfermedad ⁽¹⁾.

En México es la segunda causa de muerte por cáncer en hombres, con una tasa de 17.9 por 100 000 habitantes ⁽²⁾. Sabemos que la especificidad del APE y el tacto rectal (TR) va del 24% al 37% ⁽³⁾. Más del 75% de los hombres con valores de APE en el rango de 2.5-10-ng/ml y/o con TR sospechoso tiene una primera biopsia negativa ⁽⁴⁾. Por lo que el valor predictivo positivo de la biopsia es muy bajo; de persistir la sospecha de CaP se recomienda una biopsia de repetición ⁽⁵⁾. Sin embargo, esta nueva muestra resultará nuevamente negativa a cáncer en aproximadamente el 80% de estas, aunado al costo económico, la ansiedad, malestar del procedimiento y las complicaciones asociadas a la misma ⁽⁶⁾.

El uso del APE para el diagnóstico de CaP de forma aislada o en sus combinaciones: la correlación del APE con el volumen de la próstata, el tiempo de duplicación, la densidad del APE y algunos modelos estadísticos, han permitido mejorar la especificidad, pero aún así no resuelven este problema.

El valor predictivo positivo del APE en “zona gris” (2.5 – 10ng/dl) es menor al 25% ^(7,8). La fracción libre del APE (% fl APE) solo ha proporcionado un incremento del 20% en la especificidad ⁽³⁾. Los hombres con niveles séricos elevados de APE y los resultados de la biopsia de próstata negativa presentan un dilema ante la carencia de un estudio diagnóstico exacto. Por la necesidad de pruebas para aumentar la probabilidad de la detección de CaP y reducir el número de biopsias de repetición innecesarias se han estudiado numerosos marcadores tumorales.

3. HIPOTESIS

La especificidad de la determinación del PCA3 para la detección del cáncer de próstata es mayor en un 44% cuando se compara con la especificidad del APE.

4. OBJETIVO

El objetivo principal es 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”.

5. MATERIAL Y METODOS

5.1. Tipo de Estudio

Descriptivo, abierto, observacional, prospectivo y transversal

5.2. Criterios de Selección de la Muestra

Todos los pacientes que acudan al servicio de Urología, del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, con un APE sérico mayor a 4ng/dl y/o tacto rectal con sospecha clínica de cáncer de próstata programados para biopsia prostática.

Criterios de Inclusión

Pacientes del sexo masculino, mayores de 40 años de edad, con antígeno prostático mayor a 4ng/dl y/o tacto rectal, con sospecha clínica de cáncer de próstata, que acuden al servicio de urología del hospital “Dr. Manuel Gea González”.

Criterios de Exclusión

Pacientes con presencia de Urolitiasis, infección urinaria, obstrucción del tracto urinario inferior, catéter transuretral permanente e imposibilidad de lograr una emisión espontánea de orina.

Criterios de Eliminación

Pacientes con muestras de orina insuficientes o inadecuadas para la amplificación del gen PCA3.

5.3. Variables

Antígeno prostático específico:

Positivo: >4ng/dl.

Negativo: <4ng/dl

Tacto rectal:

Negativo o normal: próstata con consistencia aulada, no fija, no aumentada de consistencia.

Positiva o anormal: Próstata indurada, con nodulaciones. Fija.

PCA3:

Positivo: amplificación mayor a 12 ciclos.

Negativo: sin amplificación o indetectable.

Estándar de oro: Biopsia prostática.

Positiva a cáncer

Negativa a cáncer

5.4. Tamaño de la Muestra

Estudio de prueba diagnóstica por lo que se utiliza la fórmula para este tipo de estudios la cual está en la parte inferior, donde:

p1= especificidad de APE = 28%
 p2 = especificidad de PCA3 = 72%
 q1 = 1 - p1 = 0.72
 q2 = 1 - p2 = 0.28
 Alfa 0.05
 Poder 0.90
 Beta 0.10

$$n = \frac{\{z\alpha \sqrt{(1+C) \pi(1-\pi)} + z\beta \sqrt{Cp_1q_1 + p_2q_2}\}^2}{C IC^2}$$

z α : 1.64.

C=1.

IC=0.82 - 0.62= 0.2

$$\pi = \frac{(0.28) + (0.72)}{2} = \frac{1}{2} = 0.5.$$

z β : 0.84.

p₁: 0.28.

p₂: 0.72.

q₁: 0.72.

q₂: 0.28

$$n = \frac{\{1.64 \sqrt{(1+1) 0.5(1-0.5)} + 0.84 \sqrt{(1)(0.28)(0.72) + (0.72)(0.28)}\}^2}{(1) (0.2)^2}$$

$$n = \frac{\{1.64 \sqrt{(2) (0.5)(0.5)} + 0.84 \sqrt{(1)(0.20) + (0.20)}\}^2}{(1) (0.04)}$$

$$n = \frac{\{1.64 \sqrt{(2) (0.25)} + 0.84 \sqrt{(0.20) + (0.20)}\}^2}{0.04}$$

$$n = \frac{\{1.64 \sqrt{0.5} + 0.84 \sqrt{0.40}\}^2}{0.04}$$

$$n = \frac{\{1.64(0.70) + 0.84(0.63)\}^2}{0.04}$$

$$n = \frac{\{1.1 + 0.52\}^2}{0.04}$$

$$n = \frac{\{1.62\}^2}{0.04}$$

$$n = \frac{2.62}{0.04} = 65.5 = 66 \text{ pacientes}$$

5.5. Análisis Estadístico

Para el análisis de las variables se utilizó estadística descriptiva, medidas de tendencia central y dispersión, análisis univariado y multivariado de Cox, curvas ROC. Los cálculos estadísticos se realizaron utilizando el programa SPSS 13.

5.6. Descripción Operativa del Estudio

Hasta el momento se han incluido 78 pacientes con un APE sérico elevado (mayor a 4ng/ml) y/o tacto rectal anormal programados a biopsia prostática transrectal guiada por ultrasonido (BxTRUS), sin importar primera serie o de repetición, estipulando a estos como los criterios de inclusión.

La aprobación fue obtenida por el Comité Institucional de Ética y el consentimiento informado de participación de cada paciente. Los criterios de exclusión fueron la presencia de Urolitiasis, infección urinaria, obstrucción del tracto urinario inferior, catéter transuretral permanente e imposibilidad de lograr una emisión espontánea de orina.

Se recolectaron los primeros 20 a 30 ml de orina posterior al masaje prostático como lo describe Groskopf (14), previo a la realización de la BxTRUS. Las estas 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, desechando 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 Kit RNA easymini kit (Quiagen). Para verificar la cantidad y la calidad del RNA se utilizó un chip y el bioanalizador 2100 (Agilent).

Se realizó la retrotranscripción reversa para la obtención de cDNA's. Se utilizaron 2µl de cDNA para la amplificación del gen PCA3 utilizando sondas Taqman (Applied Biosystems). El puntaje de PCA3 fue calculado con la expresión relativa de mRNA PCA3 usando un algoritmo específico para la prueba.

El rendimiento del PCA3 fue evaluado en términos de sensibilidad y especificidad al comparar los resultados de este con los resultados de la biopsia. La habilidad del puntaje de PCA3 para predecir el resultado de la biopsia fue evaluada y comparada con el APE total sérico, APE en zona gris, %fIAPE.

6. RESULTADOS

De 78 pacientes programados a BxTRUS con APE sérico mayor a 4ng/ml y/o tacto rectal anormal. Se excluyeron 8 pacientes en los que el rendimiento de mRNA obtenido en la orina no fue el adecuado al no amplificar para PCA3, encontrando en todos, el antecedente de RTUP; que consideramos como factor que impide una celularidad adecuada en las muestras de orina.

De los 70 pacientes incluidos en el estudio el promedio de edad es de 65 años (rango 48 a 87 años), el APEt promedio de 48 ng/ml (rango 0.9 a 1160ng/ml). 57 pacientes se sometieron a una primera serie de biopsias, 11 a biopsias de repetición, y 2 a una tercera serie.

De los 70 pacientes 18 (25%) resultaron con biopsias positivas para cáncer, 2 con PCA3 indeterminados o negativos. Solo dos pacientes fueron positivos en biopsias de repetición. El grado de Gleason 3+3 se identificó en 8 pacientes (45%), 4+3 en 1 (5.5%) y 4+4 en 6 (33%), 5+4 en 1 (5.5%) 5+5 en 2 (11%). El grado de Gleason no se correlacionó con el puntaje de PCA3.

Para evaluar la capacidad de la prueba para predecir el resultado de la biopsia, se llevo a cabo el análisis de la curva ROC usando el resultado de la biopsia como método de referencia. La AUC en la curva ROC para PCA3 fue 0.72. (IC 95% 0.59 a 0.85) con una $p=0.005$. (Gráfica 1). El APE total sérico mostró una AUC de 0.69 (IC 95% 0.52 a 0.86) (Gráfica 2) indicando consecuentemente que el nivel de APE sérico tiene un valor menor para el diagnóstico en esta población.

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 31(Tabla 1), la prueba mostró una sensibilidad de 83% y especificidad del 44%.

El valor predictivo positivo para PCA3 es del 39%, el valor predictivo negativo es del 93%. (Tabla 2), con un odds ratio de 9.3 (Tabla 3). El APEt sérico mostró una sensibilidad del 33 % especificidad del 26%, valor predictivo positivo del 13% y un valor predictivo negativo del 53%. (Tabla 2).

De los 18 pacientes con biopsias positivas, 6 (33%) se encontraron con APE en zona gris. El promedio de edad fue de 66 años (rango 51 a 81), el APE promedio fue 7.08 ng/ml (rango 5 a 9.8ng/ml), la %fIAPE promedio fue 13% (rango 7 -21%). En los 6 pacientes, mencionados con el APE en zona gris con biopsia positiva, el PCA3 amplificó y con un punto de corte de 32 mostró sensibilidad del 100% y especificidad del 47% con una AUC 0.72 (IC 95% 0.57-0.88) $p=0.075$.

En la Tabla 4, gráfica 3 y 4 se muestra la comparación de la sensibilidad y especificidad del PCA3 con el APE en zona gris y la fracción libre a diferentes puntos de corte.

7. DISCUSION

Bussemaker ⁽¹¹⁾ en 1999, comparó la expresión del gen PCA3 en tejidos prostáticos con y sin neoplasia; En 2002, Kok ⁽¹²⁾ desarrolló un método para cuantificar este gen y encontró que la expresión es muy baja en tejido sano, en comparación con el maligno.

En 2003, Hessels sugiere la utilidad clínica de este marcador en muestras de orina. En nuestro trabajo la sobreexpresión del gen PCA3 en orina fue detectable, obteniendo un rendimiento de mRNA adecuado para la amplificación. Se logró desarrollar un método para la cuantificación absoluta del número de copias del mRNA del gen PCA3; en algunos pacientes la cantidad de ciclos en la amplificación nos proporcionaron resultados diferentes a las pruebas estandarizadas (APTIMA).

Al no obtener la amplificación dentro de los rangos esperados para el experimento PCR en tiempo real con el equipo ABI 7900HT, nos sugiere que en las muestras de orina la cantidad de células obtenidas no es la adecuada. El antecedente de RTUP podría ser un factor a estudiar como causante de muestras con baja o nula celularidad. Cabe mencionar que de los 8 pacientes excluidos, 5 tuvieron biopsias positivas y 3 negativas, en todos el PCA3 no fue detectable, 5 de ellos cuentan con dos eventos de resección prostática en diferentes periodos de tiempo, el último al menos de 1 año y 3 con RTUP solo en una ocasión, el común denominador es que correspondieron histopatológicamente a tejido benigno. Ante la elevación del APE sérico estos mismos pacientes se llevaron a re-biopsias.

De los 5 positivos a CaP, 4 fueron sometidos a prostatectomía radical y uno se encuentra en manejo con bloqueo androgénico máximo. De tal forma que los cambios histológicos ocasionados por la RTUP en la uretra prostática son motivo actualmente de estudio para descartar o confirmar la consecuente ausencia de exfoliación celular que condicione una baja o nula celularidad en la muestra de orina y con ello la falta en rendimiento del material genético. Sin embargo, no olvidar que, al no detectarse ni amplificarse el mRNAPCA3, la posibilidad de tener células de adenocarcinoma es remota, aproximadamente menos 10%₍₉₋₁₅₎. Extrañamente solo dos pacientes con biopsia positiva sin antecedentes de manipulación uretral o resección prostática no amplificaron para PCA3, estamos aún analizando esta situación para ajustar posibles fallas o variables en la metodología de la prueba.

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 0.72 (IC 0.59 – 0.85). Tomando como punto de corte 31 encontramos una sensibilidad de 88% y especificidad de 44% para detección de CaP en comparación con el APE, que mostró una baja sensibilidad del 33%. Groskopf⁽¹³⁾ encontró un AUC de 0.746; sensibilidad del 69% y especificidad del 79%; y con una especificidad para el APE sérico del 28%. En la Tabla 5 se muestran los resultados de diversos estudios realizados para la prueba PCA3, logrando en nuestro estudio valores similares a los descritos previamente.

En los pacientes con PCA3 negativo o indeterminado con biopsia negativa (n=28, 54%); el reporte histopatológico en la mayoría correspondió a inflamación crónica, atrofia simple o parcial. Bassett informó que la inflamación crónica en la biopsia no aumenta riesgo de cáncer en una muestra posterior ⁽¹⁹⁾. Se ha estudiado la atrofia glandular y el desarrollo de CaP sin que se encuentre aún resuelta esta asociación ⁽²⁰⁾. Recientemente se publicó un estudio para la predicción del resultado de la biopsia por medio de nomogramas, incorporando la prueba de PCA3 en orina. El análisis univariado y multivariado determinó al PCA3 como factor predictor independiente para riesgo de CaP con significancia estadística ($p < 0.001$) superando a los otros factores analizados ⁽¹⁷⁾.

De tal manera que el seguimiento en los pacientes con PCA3 negativo y biopsia negativa la posibilidad o necesidad de una biopsia subsecuente podría ser nula. Por consecuencia en los pacientes PCA3 positivo con biopsia negativa es muy importante el seguimiento estrecho y a largo plazo, considerando a este grupo de alto riesgo para CaP con la necesidad de una biopsia de repetición. Una vez obtenidos estos resultados podremos evaluar y establecer la utilidad real de la prueba PCA3 desarrollada en el INMEGEN.

Por el momento consideramos que el prototipo de prueba para INMENGEM PCA3 es adecuado con la capacidad para amplificar y cuantificar el mRNA PCA3 en muestra de orina en pacientes sometidos a biopsia prostática. 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 en el desarrollo del PCA3 demuestran ser una prueba viable y que pueda ser considerada como apoyo en la detección de CaP en pacientes mexicanos.

8. CONCLUSIONES

La tendencia del estudio nos muestra que la sobreexpresión del gen PCA3 en orina es detectable. La prueba para mRNA PCA3 mostró buenos resultados clínicos y una especificidad muy superior a la del APE.

Hasta este momento no existe literatura latinoamericana con uso de PCA3 en orina como ayuda en la detección de cáncer de próstata. Con el desarrollo de esta prueba en orina de bajo costo; el ensayo PCA3 combina un procesamiento de la muestra sencillo, con pruebas precisas e instrumentos actuales con obtención de resultados en corto tiempo, que podrían añadir especificidad a los algoritmos actuales para el diagnóstico del CaP.

Es necesario aumentar el número pacientes sometidos a la prueba con seguimiento a largo plazo para considerar su utilidad y aplicación como marcador tumoral en la población mexicana.

9. PERSPECTIVAS

Evaluar el prototipo desarrollado en el INMEGEN, siendo una prueba de bajo costo, capaz de detectar concentraciones mínimas de mRNA, con posibilidades de amplificación y cuantificación del mRNA PCA 3 en orina obtenida posterior a masaje prostático.

Validar la prueba y su rendimiento como apoyo en la detección del CaP en pacientes mexicanos sometidos a biopsias prostáticas. Por último, debe distinguirse por ser de un enfoque sólido, reproducible y que pueda ser implementada en un laboratorio clínico.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008;58:71–96.
2. Registro histopatológico de las neoplasias malignas en México 2002.
3. Deras IL, Aubin SM, Blase A, et al. PCA3: a molecular urine assay for predicting prostate biopsy outcome. *J Urol*. 2008;179:1587-1592.
4. Haese A , De la Taille A, et al. Clinical Utility of the PCA3 Urine Assay in European Men Scheduled for Repeat Biopsy *European urology* 54 (2 0 0 8) 1081–1088
5. Heidenreich A, Aus G, Bolla M, et al. EAU guidelines on prostate cancer. *Eur Urol* 2008;53:68–80.
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: 142–153.
7. Tinzi 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; discussion 187.
8. Wright L, Lange P, et al. Newer Potential Biomarkers in Prostate Cancer. *Rev Urol*. 2007;9(4):207-213.
9. Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Verhaegh GW, et al. A new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res*. 1999;59:5975-5979.
10. Hessels D, Klein Gunnewiek JM, van Oort I, et al. DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol*. 2003; 44:8-15; discussion 15-16.
11. Schalken JA, Hessels D, Verhaegh G. New targets for therapy in prostate cancer: differential display code 3 (DD3(PCA3)), a highly prostate cancer-specific gene. *Urology*. 2003;62:34-43.
12. De Kok JB , et al. DD3PCA3, a Very Sensitive and Specific Marker to Detect Prostate Tumors. *Cancer Res* 62, 2695–2698, May 1, 2002.
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;52:1089-1095.
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- 535.
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;64:311-315; discussion 315-316.
17. Chun F, De la Taille A, et al. Prostate Cancer Gene 3 (PCA3): Development and Internal Validation of a Novel Biopsy Nomogram. *European Urology*, article in press 2009.
18. Van Gils MP, Hessels D, van Hooij O, et al. The time-resolved fluorescence-based PCA3 test on urinary sediments after digital rectal examination: a Dutch multicenter validation of the diagnostic performance. *Clin Cancer Res*. 2007;13: 939-943.
19. Bassett W. Chronic Periglandular Inflammation on Prostate Needle Biopsy Does Not Increase the Likelihood of Cancer on Subsequent Biopsy. *UROLOGY* 73: 845–849, 2009.
20. Tomas D et al., Different Types of Atrophy in the Prostate With and Without Adenocarcinoma. *European urology* 51 (2 0 0 7) 98–104.
21. Floriano-Sánchez E. y cols . Expresión del gen DD3PCA3 en cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna. Estudio en el Hospital Central Militar de México. *Rev Mex Urol* 2007; 67(2): 93-101.