



MEMORIA

25.º RETORNO SOCIAL DE LA INVESTIGACIÓN
CÁNCER

BIOMARCADORES NO INVASIVOS PARA LA ESTRATIFICACIÓN DEL RIESGO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA: GLICOFORMAS DEL PSA Y RESONANCIA MAGNÉTICA MULTIPARAMÉTRICA

Dra. Esther Llop Escorihuela

Facultat de Ciències - UdG Universitat de Girona

Dr. Josep Comet Batlle

Institut Hospital Dr. Josep Trueta - IDIBGi Fundació Institut d'Investigació Biomèdica
de Girona

1. Resumen

El cáncer de próstata (PCa) es el cáncer más común en hombres en Europa. El biomarcador más utilizado para su detección es el antígeno prostático específico (PSA). Los niveles del PSA total (tPSA) suelen estar aumentados en el PCa; sin embargo, también aumentan en otras patologías benignas de la próstata, como la hiperplasia benigna de próstata (BPH). Por esto, este biomarcador no es lo suficientemente específico para distinguir una BPH de un PCa, ni un PCa no clínicamente significativo (no csPCa) de uno clínicamente significativo (csPCa), especialmente en hombres con niveles de tPSA ≤ 10 ng/mL. Esta falta de especificidad ha impulsado nuestra investigación para desarrollar nuevos biomarcadores no invasivos para mejorar el diagnóstico del PCa y reducir su sobrediagnóstico y sobretratamiento. Se han descrito varios marcadores tumorales en sangre, orina y tejido que superaron el tPSA para el diagnóstico del PCa y el csPCa, pero actualmente solo el antígeno de salud prostática (PHI) y el antígeno 3 del cáncer de próstata (PCA3) están aprobados por la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA). En las últimas décadas, la implementación de la resonancia magnética multiparamétrica (mpMRI) ha reducido un 27% el número de biopsias innecesarias y ha mejorado la identificación de los csPCa con una mayor sensibilidad que el tPSA; sin embargo, no hay consenso respecto al punto de corte establecido, lo que puede comprometer su especificidad.

Se ha estudiado ampliamente la alteración del patrón de glicosilación de las glicoproteínas en el proceso cancerígeno. En el PCa se han descrito cambios en la sialilación, la fucosilación *core* o GalNAc β 1-4GlcNAc (LacdiNAc) del PSA. Los estudios previos realizados en nuestro grupo utilizando la cromatografía de afinidad con la lectina *Sambucus nigra* (SNA) mostraron un aumento significativo del porcentaje de las glicofomas del PSA α 2,3-sialiladas (más del 30%) en el suero de pacientes con PCa agresivo en comparación con muestras de PCa de riesgo bajo o intermedio y BPH, lo que destaca el potencial del α 2,3-ácido siálico PSA (α 2,3-SA) como biomarcador del PCa de alto riesgo. Sin embargo, hasta el momento, el uso potencial de α 2,3-SA PSA para la estratificación del riesgo del PCa no se había estudiado en una gran cohorte de muestras de suero, ni se habían caracterizado las sialoformas específicas del PSA que están alteradas en el PCa agresivo. A pesar del potencial de la cromatografía de afinidad SNA para analizar α 2,3-SA, esta metodología requiere mucho tiempo y personal experto, por lo que no se puede trasladar fácilmente a la

clínica. Por lo tanto, es muy importante desarrollar nuevas metodologías automatizadas para aplicarlas a la práctica clínica.

Partiendo de estas premisas, en este estudio hemos querido identificar las glicoformas del PSA asociadas con el PCa agresivo y explorar la viabilidad de utilizar un ensayo de flujo lateral (LFA) para facilitar la detección y cuantificación del PSA sialilado. Además, se analizó el % α 2,3-SA PSA en una cohorte grande de pacientes ($n = 379$) junto con los biomarcadores PHI, mpMRI y sus combinaciones para evaluar su potencial para mejorar la sensibilidad y la especificidad en la detección del PCa y la estratificación del riesgo.

2. Resultados

En el primer estudio (Gratacós-Mulleras *et al.*, Scientific Reports, 2020), se identificaron las principales estructuras glucídicas del PSA en pacientes con PCa agresivo. En primer lugar, se seleccionaron 6 muestras de suero de PCa agresivo con niveles altos de tPSA (> 300 ng/mL) y se utilizó como control un estándar del PSA (purificado a partir del plasma seminal de individuos sanos). El PSA se purificó y se separó mediante una cromatografía de afinidad con la lectina SNA. Todas las muestras de PCa presentaron α 2,3-SA PSA $> 30\%$, tal como había descrito previamente nuestro grupo. Las fracciones de PSA recogidas se inmunoprecipitaron de nuevo, se cargaron en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), las bandas del PSA se recortaron y posteriormente se digirieron con PNGaseF para realizar la secuenciación de los *N*-glicanos. Los *N*-glicanos del PSA se marcaron con un fluoróforo y su caracterización estructural se realizó mediante una cromatografía líquida de alta resolución combinada con digestiones con exoglicosidasas. Los resultados mostraron que las glicoformas sialiladas del PSA con residuos de LacdiNac se incrementaban en el PCa agresivo, mientras que las estructuras disialiladas con fucosilación *core* con α 2,6-SA, que son las principales glicoformas del PSA en individuos sanos, se reducían significativamente (41,4%). Hemos demostrado que el aumento del % α 2,3-SA PSA en el PCa agresivo se produce principalmente por la reducción de las estructuras disialiladas con fucosilación *core* y α 2,6-SA, en combinación con el aumento de las estructuras α 2,3 disialiladas con fucosilación *core* y las α 2,3 monosialiladas sin fucosilación *core*.

En un segundo estudio, se diseñó un ensayo de flujo lateral (LFA) de media tira para reconocer las sialoformas del PSA con enlace α 2,6. Para desarrollar el sistema se utilizó el PSA estándar. Los biorreceptores de captura seleccionados fueron la lectina SNA, dispensada en la línea de test (TL) para detectar α 2,6-SA, y el anticuerpo anti-tPSA M-36 como control interno (IC). Se conjugaron nanopartículas de oro (AuNP) de 16,7 nm con el anticuerpo monoclonal anti-PSA MCA5842 como biorreceptor de detección. Las muestras se preincubaron con el biorreceptor de detección antes de insertar la media tira de LFA. Una vez optimizada, se obtuvo una curva de calibración con el PSA estándar (que contiene un 80% de sialoformas del PSA con α 2,6-SA) para la lectina SNA (TL) y para el anticuerpo M-36 (IC). El rango dinámico de la SNA fue más estrecho que el del M-36, de 65 ng/mL a 228 ng/mL (SNA) frente a 3 ng/mL a 282 ng/mL (M-36). A continuación, se prepararon y analizaron fracciones de PSA que contenían 100% y 0% α 2,6-SA por LFA. Los resultados mostraron que el LFA diseñado era específico para el α 2,6-SA PSA. En una primera evaluación con muestras de suero, fue necesario diluir al menos 50 veces la muestra para detectar α 2,6-SA PSA. Así pues, antes de realizar la prueba es necesario eliminar o reducir en la muestra de suero otras glicoproteínas con α 2,6-SA que pueden interactuar con el SNA y dificultar la unión del α 2,6-SA PSA. La metodología desarrollada no nos permitió analizar muestras directas de pacientes y por este motivo el estudio multicéntrico del biomarcador α 2,3-SA se realizó con la metodología de cromatografía de afinidad desarrollada previamente por el grupo de bioquímica del cáncer de la Universitat de Girona (Llop y Peracaula, "Glycosylation: Methods and Protocols", *Methods in Molecular Biology*, 2022).

En el tercer estudio, se analizaron los biomarcadores α 2,3-SA PSA y PHI para diferenciar el PCa de alto riesgo del PCa de riesgo intermedio o bajo y BPH, y se compararon con tPSA en un estudio multicéntrico de 4 hospitales con 379 muestras de suero, que incluían 262 pacientes con PCa (77 de bajo riesgo, 87 de riesgo intermedio y 98 PCa de alto riesgo) y 117 pacientes con BPH. Ambos biomarcadores, α 2,3-SA PSA y PHI, superaron el potencial del tPSA para distinguir el PCa de alto riesgo del resto de muestras [área bajo la curva (AUC) 0,804 y 0,870 frente a 0,782, respectivamente], y PHI fue el que obtuvo mayor rendimiento. En la subcohorte con muestras de tPSA \leq 10 ng/mL, el potencial de ambos marcadores como biomarcadores del PCa de alto riesgo disminuyó, pero curiosamente el α 2,3-SA PSA mostró una disminución menor (AUC 0,744 frente a 0,804) que PHI (AUC 0,763 frente a 0,870). La combinación de α 2,3-SA PSA+PHI aumentó el AUC hasta 0,893, lo que resultó en un

90% de sensibilidad y 77% de especificidad, también en la cohorte de tPSA \leq 10 ng/mL (AUC de 0,812, con 76% sensibilidad y 79 % especificidad). La mayoría de los PCa de alto riesgo (87%) presentaron α 2,3-SA PSA $>$ 30% o PHI $>$ 75, mientras que la mayoría de los csPCa (85%) mostraron α 2,3-SA PSA $>$ 25% o PHI \geq 65. En ambos escenarios, se recomendarían biopsias a los pacientes por encima de estos límites para confirmar su diagnóstico. El potencial de la mpMRI para diferenciar el PCa de alto riesgo de los pacientes con PCa de bajo riesgo o intermedio y BPH también se analizó en una cohorte de 172 pacientes y su rendimiento fue comparable al α 2,3-SA PSA y PHI con un AUC de 0,810, con elevada sensibilidad (90%) pero baja especificidad (41%). Además, su combinación mejoró el potencial diagnóstico del PCa de alto riesgo con un AUC de 0,882, lo que produjo una sensibilidad del 69% y una especificidad del 93%. Esta combinación podría ser útil para decidir realizar una biopsia en hombres con α 2,3-SA PSA entre 20-25% o PHI entre 50-65, dado que, en estos rangos, el 89% de los pacientes con csPCa presentan Pi-Rads \geq 4. Además, el α 2,3-SA PSA y PHI son biomarcadores útiles para diferenciar el PCa de las BPH (AUC 0,775 y 0,811, respectivamente) y el csPCa del no csPCa (AUC 0,774 y 0,807, respectivamente), y superaron el biomarcador del %fPSA en ambos estudios ($n = 306$ sujetos).

En la cohorte analizada, el 92% de los pacientes con α 2,3-SA PSA $<$ 20% y PHI $<$ 50 presentaban BPH o no csPCa, por lo que en estos casos el uso de estos novedosos biomarcadores podría reducir las biopsias innecesarias hasta un 22% en comparación con el tPSA y el %fPSA. En conjunto, estos resultados demuestran que el α 2,3-SA PSA combinado con PHI son marcadores no invasivos útiles para ayudar en la clasificación del riesgo del PCa, para reducir las biopsias innecesarias y ayudar en la toma de decisiones sobre el tratamiento.

3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

Los estudios desarrollados en este proyecto han permitido caracterizar los principales N-glicanos del PSA de muestras de suero de PCa agresivo comparados con los de un estándar de PSA purificado a partir de plasma seminal de individuos sanos. Además, hemos desarrollado una prueba de concepto de un biosensor en papel (LFA) para cuantificar α 2,6-SA PSA que, aunque por el momento tan solo permite analizar

muestras de PSA puro, sienta las bases para futuras investigaciones para la detección de glicoformas proteicas como biomarcadores clínicos.

Los biomarcadores séricos α 2,3-SA PSA y PHI, solos o combinados, se analizaron en un estudio multicéntrico (4 hospitales) con una gran cohorte de muestras, y superaron el potencial del tPSA y del %fPSA para la detección del PCa y la estratificación de riesgo, incluso en la subcohorte de tPSA ≤ 10 ng/mL, que es la más problemática a la hora de hacer el diagnóstico. Estos resultados indican que la implementación del biomarcador sérico PHI (actualmente disponible comercialmente) y el α 2,3-SA PSA (método actual que aún no se ha trasladado) en la práctica clínica ayudaría a detectar las hiperplasias benignas de la próstata y los cánceres de próstata clínicamente no significativos. Esto permitiría reducir el número de biopsias innecesarias y mejoraría la calidad de vida de estos pacientes, ya que las biopsias son técnicas invasivas que comportan morbilidad asociada.

La utilización de los biomarcadores α 2,3-SA PSA y PHI también tendría un impacto importante en la estratificación del riesgo en los pacientes con patología prostática y ayudaría a reducir de forma considerable el número de resonancias mpMRI y a diagnosticar de forma más precisa los cánceres de próstata agresivos.

Serían necesarios también análisis adicionales de la cohorte multicéntrica que incluyan datos de supervivencia a 5 años y recaída clínica para evaluar el potencial pronóstico de los biomarcadores estudiados α 2,3-SA PSA, PHI y Pi-Rads. Los datos de este estudio permitirían, basándose en los valores de los biomarcadores, personalizar el plan terapéutico de cada paciente de forma más efectiva, ya que el tratamiento agresivo aplicado precozmente en pacientes con PCa agresivo reduciría el número de rescates por recidiva del tumor.

4. Bibliografía científica generada

- Anna Gratacós-Mulleras.

Altered glycosylation of prostate specific antigen in prostate cancer: structural analysis and assessment for cancer risk stratification.

Tesis doctoral (fecha de registro: 19/03/2024).

Programa de doctorado en Química. Universitat de Girona.

- Maria Pugibet i Camarillas.

Anàlisi de les sialoformes de l'antigen específic de la pròstata (PSA) mitjançant cromatografia d'afinitat amb lectina Sambucus Nigra (SNA).

Trabajo final de grado (junio de 2023).

Biotecnología. Universitat de Girona.

- Llop E, Ardá A, Zacco E, O'Flaherty R, García-Ayllón MS, Aureli M, Frenkel-Pinter M, Reis CA, Greiner-Tollersrud OK, Cuchillo-Ibáñez I.

Proceedings of workshop: Neuroglycoproteins in health and disease. INNOGLY cost action.

Glycoconjugate Journal, julio de 2022. <https://doi.org/10.1007/s10719-022-10078-4>.

- Victòria Cid i Centelles.

Detecció de les diferents isoformes del PSA mitjançant tècniques electroforètiques.

Trabajo final de grado (julio de 2022).

Universitat de Girona.

- Judit Riesco i Llach.

Desenvolupament de metodologies per l'anàlisi de les glicofomes alterades del PSA associades al càncer de pròstata agressiu.

Trabajo final de grado (junio de 2022).

Biotecnología. Universitat de Girona.

- Llop E, Peracaula R.

Lectin Affinity Chromatography for the Discovery of Novel Cancer Glycobiomarkers: A Case Study with PSA Glycoforms and Prostate Cancer (capítol 15).

A: Gavin Davey (ed.). *Glycosylation: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 2370. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1685-7_15, Springer Science + Business Media, LLC, parte de Springer Nature; 2022.

- Gratacós-Mulleras A, Duran A, Asadi Shehni A, Ferrer-Baballé M, Ramírez M, Comet J, de Llorens R, Saldova R, Llop E, Peracaula R.

Characterisation of the main PSA glycoforms in aggressive prostate cancer.

Scientific Reports, 2020, 10:18974. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75526-3>.