



MEMÒRIA

25è RETORN SOCIAL DE LA RECERCA
CÀNCER

BIOMARCADORS NO INVASIUS PER A L'ESTRATIFICACIÓ DEL RISC DEL CÀNCER DE PRÒSTATA: GLICOFORMES DEL PSA I RESSONÀNCIA MAGNÈTICA MULTIPARAMÈTRICA

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. Resum

El càncer de pròstata (PCa) és el càncer més freqüent en homes a Europa. El biomarcador més utilitzat per detectar-lo és l'antigen prostàtic específic (PSA). Els nivells sèrics del PSA total (tPSA) es troben habitualment incrementats en el PCa, però també augmenten en altres alteracions benignes de la pròstata, com la hiperplàsia benigna de la pròstata (BPH). Per aquest motiu, aquest biomarcador no és prou específic per distingir una BPH d'un PCa, o un càncer no clínicament significatiu (no csPCa) d'un de clínicament significatiu (csPCa), especialment en homes amb nivells de tPSA ≤ 10 ng/mL. Aquesta manca d'especificitat ha impulsat la nostra investigació per desenvolupar nous biomarcadors no invasius per millorar el diagnòstic del PCa i reduir-ne el sobrediagnòstic i sobretractament. S'han descrit diversos marcadors tumorals en sang, orina i teixits que han superat el tPSA per a la detecció del PCa i el diagnòstic dels csPCa, però actualment només l'antigen de salut prostàtica (PHI) i l'antigen 3 del càncer de pròstata (PCA3) estan aprovats per l'Administració d'Aliments i Fàrmacs (FDA). En les últimes dècades, la implementació de la ressonància magnètica multiparamètrica (mpMRI) ha reduït un 27% el nombre de biòpsies innecessàries i ha millorat la identificació dels csPCa amb més sensibilitat que el tPSA; tot i això, no hi ha consens sobre el punt de tall establert, fet que en compromet l'especificitat.

S'ha estudiat àmpliament l'alteració del patró de glicosilació de les glicoproteïnes en el procés cancerós. En el PCa s'han descrit canvis en la sialilació, la fucosilació *core* o GalNAc β 1-4GlcNAc (LacdiNAc) del PSA. Els estudis previs que havia fet el nostre grup de recerca utilitzant la cromatografia d'afinitat amb lectina *Sambucus nigra* (SNA) van demostrar un augment significatiu en el percentatge de les glicofomes del PSA α 2,3-sialilades (més del 30%) en el sèrum de pacients amb PCa agressiu en comparació amb mostres de PCa de risc baix o intermedi i BPH, cosa que indica el potencial de α 2,3-àcid siàlic PSA (α 2,3-SA) com a biomarcador del PCa d'alt risc. No obstant això, fins ara, el potencial real del α 2,3-SA PSA per a l'estratificació del risc de PCa no s'havia estudiat en una gran cohort de mostres sèriques ni s'havien caracteritzat les sialofomes específiques del PSA que estan alterades en el PCa agressiu. Tot i el potencial de la cromatografia d'afinitat SNA per analitzar α 2,3-SA, aquesta metodologia requereix molt de temps i personal expert, per aquest motiu no es pot traslladar fàcilment a la clínica. Per tant, és molt important desenvolupar noves metodologies automatitzades per poder traslladar-les a la pràctica clínica.

Partint d'aquestes premisses, en aquest estudi hem volgut identificar les glicofomes del PSA associades al PCa agressiu i explorar la viabilitat d'utilitzar un assaig de flux lateral (LFA) per facilitar la detecció i quantificació del PSA sialilat. A més, es va analitzar % α 2,3-SA PSA en una cohort gran de pacients ($n = 379$) juntament amb els biomarcadors PHI, mpMRI i les seves combinacions, per avaluar-ne el potencial per millorar la sensibilitat i l'especificitat en la detecció del PCa i l'estratificació del risc.

2. Resultats

En un primer estudi (Gratacós-Mulleras *et al.*, *Scientific Reports*, 2020), vam identificar les principals estructures glucídiques del PSA en pacients amb PCa agressiu. En primer lloc, vam seleccionar 6 mostres de sèrum de PCa agressiu amb nivells alts de tPSA (> 300 ng/mL) i vam utilitzar com a control un estàndard del PSA (purificat a partir del plasma seminal d'individus sans). El PSA es va purificar i es va separar mitjançant una cromatografia d'afinitat amb la lectina SNA. Totes les mostres de PCa van presentar glicofomes α 2,3-SA PSA $> 30\%$, tal com havia descrit anteriorment el nostre grup. Les fraccions del PSA recollides es van tornar a immunoprecipitar, es van carregar en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), les bandes del PSA es van retallar i posteriorment es van digerir amb PNGaseF per realitzar la seqüenciació dels N-glicans. Els N-glicans del PSA es van marcar amb fluorescència i la seva caracterització estructural es va dur a terme mitjançant una cromatografia líquida d'alta resolució combinada amb digestions amb exoglicosidases. Els resultats van mostrar que les glicofomes sialilades del PSA amb residus de LacdiNac incrementaven en els PCa agressius, mentre que les estructures disialilades amb fucosilació *core* amb α 2,6-SA, que són les principals glicofomes del PSA en individus sans, es van reduir significativament (41,4%). Hem demostrat que l'augment del % α 2,3-SA PSA en el PCa agressiu es produeix principalment per la reducció de les estructures disialilades amb fucosilació *core* i α 2,6-SA, en combinació amb l'augment de les estructures α 2,3-SA disialilades amb fucosilació *core* i les α 2,3-monosialilades sense fucosilació *core*.

En un segon estudi, es va dissenyar un assaig de flux lateral (LFA) de mitja tira per reconèixer les sialoformes del PSA amb enllaç α 2,6. Per desenvolupar el sistema es va utilitzar el PSA estàndard. Els bioreceptors de captura seleccionats van ser la lectina

SNA, dispensada a la línia de test (TL) per detectar α 2,6-SA, i l'anticòs anti-tPSA M-36 com a control intern (IC). Es van conjugar nanopartícules d'or (AuNP) de 16,7 nm amb l'anticòs monoclonal anti-PSA MCA5842 com a bioreceptor de detecció. Les mostres es van preincubar amb el bioreceptor de detecció abans d'inserir la mitja tira d'LFA. Un cop optimitzada, es va obtenir una corba de calibratge amb l'estàndard PSA (que conté un 80% de sialoformes del PSA amb α 2,6-SA) per a la lectina SNA (TL) i per a l'anticòs M-36 (IC). El rang dinàmic de l'SNA va ser més estret que el de l'M-36, de 65 ng/mL a 228 ng/mL (SNA) enfront de 3 ng/mL a 282 ng/mL (M-36). A continuació, es van preparar i analitzar fraccions de PSA que contenien 100% i 0% α 2,6-SA. Els resultats van mostrar que l'LFA dissenyat era específic per a α 2,6-SA PSA. En una primera avaluació amb mostres de sèrum, va caldre diluir almenys 50 vegades la mostra per detectar α 2,6-SA PSA. Així, doncs, abans de fer la prova és necessari eliminar/reduir a la mostra de sèrum altres glicoproteïnes amb α 2,6-SA que poden interactuar amb l'SNA i dificultar la unió d' α 2,6-SA PSA. La metodologia desenvolupada no ens va permetre analitzar mostres directes de pacients i per aquest motiu l'estudi multicèntric del biomarcador α 2,3-SA PSA es va dur a terme amb la metodologia de cromatografia d'afinitat desenvolupada prèviament en el grup de bioquímica del càncer de la Universitat de Girona (Llop i Peracaula, "Glycosylation: Methods and Protocols", *Methods in Molecular Biology*, 2022).

En el tercer estudi es van analitzar els biomarcadors α 2,3-SA PSA i PHI per diferenciar el PCa d'alt risc del PCa de risc baix o intermedi i de BPH, i es van comparar amb el tPSA en un estudi multicèntric de 4 hospitals amb 379 mostres, que incloïa 262 pacients amb PCa (77 de risc baix, 87 de risc intermedi i 98 de risc alt) i 117 pacients amb BPH. Els dos biomarcadors, α 2,3-SA PSA i PHI, van superar el potencial del tPSA per distingir el PCa d'alt risc de la resta de mostres [àrea sota la corba (AUC) 0,804 i 0,870 enfront de 0,782, respectivament], i PHI va ser el que va presentar un rendiment més alt. A la subcohort amb mostres de tPSA \leq 10 ng/mL, el potencial de tots dos marcadors com a biomarcadors del PCa d'alt risc va disminuir, però curiosament el α 2,3-SA PSA va mostrar una disminució més baixa (AUC 0,744 enfront de 0,804) que PHI (AUC 0,763 enfront de 0,870). La combinatòria de α 2,3-SA PSA+PHI va augmentar l'AUC fins a 0,893, cosa que va donar com a resultat un 90% de sensibilitat i un 77% d'especificitat, també en la cohort de tPSA \leq 10 ng/mL (AUC de 0,812, 76% de sensibilitat i 79% d'especificitat). La majoria de PCa d'alt risc (87%) presentava α 2,3-SA PSA $>$ 30% o PHI $>$ 75, mentre que la majoria de csPCa

(85%) presentava $\alpha 2,3$ -SA PSA > 25% o PHI \geq 65. En tots dos escenaris, es recomana fer biòpsies als pacients que presentin valors superiors a aquests límits per confirmar-ne el diagnòstic. A més, el potencial de l'ímMRI per diferenciar el PCa d'alt risc dels pacients amb PCa i BPH de risc baix o intermedi també es va analitzar en una cohort de 172 pacients i el seu rendiment va ser comparable al $\alpha 2,3$ -SA PSA i PHI amb un AUC de 0,810, amb elevada sensibilitat (90%) però baixa especificitat (41%). A més a més, la seva combinació va millorar el potencial per al diagnòstic del PCa d'alt risc amb una AUC de 0,882, fet que dona lloc a una sensibilitat del 69% i una especificitat del 93%. Aquesta combinació pot ser útil per decidir quan cal fer una biòpsia als homes amb $\alpha 2,3$ -SA PSA entre 20-25% o PHI entre 50-65, ja que en aquests rangs el 89% dels pacients amb csPCa presenten un Pi-Rads \geq 4. A més, el $\alpha 2,3$ -SA PSA i PHI són biomarcadors útils per diferenciar el PCa de BPH (AUC 0,775 i 0,811, respectivament) i el csPCa del no csPCa (AUC 0,774 i 0,807, respectivament) i van superar el biomarcador %fPSA en tots dos estudis ($n = 306$ individus).

En la cohort analitzada, el 92% dels pacients amb $\alpha 2,3$ -SA PSA < 20% i PHI < 50 presentaven una BPH o un no csPCa, de manera que en aquests casos l'ús dels nous biomarcadors seria capaç de reduir les biòpsies innecessàries fins al 22%, en comparació amb el tPSA i el %fPSA. En conjunt, aquests resultats demostren que el $\alpha 2,3$ -SA PSA combinat amb PHI són marcadors no invasius útils per ajudar a classificar el risc del PCa, per reduir les biòpsies innecessàries i ajudar en la presa de decisions sobre el tractament.

3. Rellevància i possibles implicacions futures

Els estudis desenvolupats en aquest projecte han permès caracteritzar els principals N-glicans del PSA associats al PCa agressiu comparats amb els d'un estàndard de PSA purificat a partir de plasma seminal d'individus sans. A més, hem desenvolupat una prova de concepte d'un biosensor en paper (LFA) per quantificar l' $\alpha 2,6$ -SA PSA que, tot i que enguany només permet analitzar mostres de PSA pur, assenta les bases per a futures investigacions per a la detecció de glicofomes proteiques com a biomarcadors clínics.

Els biomarcadors sèrics α 2,3-SA PSA i PHI, sols o combinats, s'han analitzat en un estudi multicèntric (4 hospitals) amb una gran cohort de mostres, i han superat el potencial del tPSA i del fPSA per a la detecció del PCa i l'estratificació del risc, fins i tot en la subcohort de tPSA ≤ 10 ng/mL, que és la més problemàtica a l'hora de fer el diagnòstic. Aquests resultats indiquen que la implementació del biomarcador sèric PHI (ja disponible comercialment) i el α 2,3-SA PSA (mètode actual que encara no s'ha traslladat) en la pràctica clínica ajudaria a detectar les hiperplàsies benignes de pròstata i aquells càncers de pròstata clínicament no significatius; això permetria reduir el nombre de biòpsies innecessàries i milloraria la qualitat de vida dels pacients, ja que les biòpsies són tècniques invasives que comporten morbiditat associada.

La utilització dels biomarcadors α 2,3-SA PSA i PHI també tindria un impacte important en l'estratificació del risc en els pacients amb patologia prostàtica, i ajudaria a reduir de forma considerable el nombre d'ímMRI i a diagnosticar de manera més acurada els càncers de pròstata agressius.

També caldria fer anàlisis addicionals de la cohort multicèntrica amb les dades de supervivència a 5 anys i de recaiguda clínica per avaluar el potencial pronòstic dels biomarcadors estudiats: α 2,3-SA PSA, PHI i Pi-Rads. Les dades d'aquest estudi permetrien personalitzar el pla terapèutic de forma més efectiva, a partir dels valors dels biomarcadors, atès que el tractament aplicat precoçment en pacients amb PaC agressiu reduiria el nombre de rescats per recidiva del tumor.

4. Bibliografia científica generada

- Anna Gratacós-Mulleras.

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

Tesi doctoral (data de registre: 19/03/2024).

Programa de doctorat 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).

Treball final de grau (juny del 2023).

Biotecnologia. 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, juliol del 2022. <https://doi.org/10.1007/s10719-022-10078-4>.

- Victòria Cid i Centelles.

Detecció de les diferents isoformes del PSA mitjançant tècniques electroforètiques.

Treball final de grau (juliol del 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.

Treball final de grau (juny del 2022).

Biotecnologia. 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, part de Springer Nature; 2022.

- Gratacós-Mulleras A, Duran A, Asadi Shehni A, Ferrer-Baballé M, Ramírez M, Comet J, de Llorens R, Saldovala 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>.