

**La presencia de células tumorales prostáticas secundarias circulantes determina el riesgo de recidiva bioquímica en pacientes con cáncer de próstata de riesgo bajo e intermedio tratados únicamente con radioterapia externa**

Autores: Nigel P.Murray (1, 2), Socrates Aedo (2), Cynthia Fuentealba (1), Eduardo Reyes (3, 4), Simone Minzer (1) y Aníbal Salazar (1)

1. Hospital de Carabineros de Chile, Ñuñoa, 7770199 Santiago, Chile
2. Facultad de Medicina, Universidad Finis Terrae, Providencia, 7501015 Santiago, Chile
3. Facultad de Medicina, Universidad Diego Portales , Manuel Rodríguez Sur 415, 8370179 Santiago, Chile
4. Hospital DIPRECA, Vital Apoquindo 1200, Las Condes, 7601003, Santiago, Chile

**Correspondencia:** Nigel P. Murray; [nigelpetermurray@gmail.com](mailto:nigelpetermurray@gmail.com)

**Abstract:**

**Introduction:**

Classification of prostate cancer patients based on risk factors is used to determine treatment options. The presence of secondary circulating prostate cells (CPCs) after curative therapy is associated with a worse prognosis. We present a prospective study of patients treated with radiotherapy and the outcome of patients with the presence or absence of CPCs.

**Patients and methods:**

All patients classified as low or intermediate risk and threatened with radiotherapy were included in the study. CPCs were determined three months after completing treatment. Mononuclear cells were obtained using differential gel centrifugation and identified using immunocytochemistry with anti-PSA. Patients were classified as low risk, CPC positive or negative and intermediate risk CPC positive or negative. Survival free of biochemical failure was analyzed using Kaplan-Meier and Cox regression methods. Biochemical failure was defined using the Phoenix II criteria and follow up was up to 15 years post treatment.

**Results:**

241 patients participated, 181 (75.1%) were classified as low risk and 60 (24.9%) intermediate risk. Biochemical failure occurred in 27.1% (49/181) of low risk patients and in 53.3% (32/60) of intermediate risk patients after 15 years of follow up. 20.4% (37/181) of low risk patients had CPCs detected in comparison with 43.3% (26/60) of intermediate risk patients ( $p < 0.001$  OR 2.98, IC 95% 1.59-5.56; RR 2.12, IC 95% 1.41-3.19). Patients CPC positive had a worse prognosis and shorter time to biochemical failure independent of risk group. Men with CPC negative intermediate risk prostate cancer a lower risk of treatment failure and longer disease free progression times than men with low risk CPC positive cancer.

**Conclusions:**

The presence of CPCs after definitive radiotherapy identifies a group of men with a high risk of treatment failure independent of risk group. They could be used to identify patients who could benefit from additional therapy.

Key words: prostate cancer; radiotherapy, circulating prostate cells; biochemical failure

## **Resumen:**

### **Introducción:**

La estratificación de pacientes con cáncer prostático es usada para determinar el tratamiento basado en los factores de riesgo. La presencia de células tumorales prostáticas circulantes secundarias (CPCs) detectadas en sangre periférica después de un tratamiento curativo ha sido asociado con un peor pronóstico.

Presentamos un estudio prospectivo de la detección de CPCs post radioterapia y los resultados oncológicos.

### **Pacientes y Métodos:**

Todos los pacientes clasificados como bajo riesgo y riesgo intermedio tratado con radioterapia fueron incluidos. Tres meses después de terminar el tratamiento un 8ml muestra de sangre fue obtenido para detectar CPCs. Células mononucleares fueron obtenidos utilización centrifugación por gel y CPCs identificados con inmunocitoquímica con anti-PSA. Pacientes fueron clasificados con bajo riesgo CPC positivo o negativo y riesgo intermedio CPC positivo o negativo. Análisis de la supervivencia libre de recidiva bioquímica utilizando Kaplan-Meier y la regresión de Cox fue determinado con un seguimiento de hasta 15 años. La falla bioquímica fue definida según los criterios de Phoenix II.

### **Resultados:**

De 241 pacientes, 181 (75.1%) fueron clasificados con enfermedad de bajo riesgo y 60 (24.9%) de riesgo intermedio. La falla bioquímica se observó en 27.1% (49/181) de los sujetos con cáncer prostático de bajo riesgo y en 53.3% (32/60) de los con riesgo intermedio tras 15 años de seguimiento. El 20.4% (37/181) de los sujetos con cáncer de bajo riesgo tenían CPCs detectables en comparación al 43.3% (26/60) de los sujetos con cáncer de riesgo intermedio ( $p < 0.001$  OR 2.98, IC 95% 1.59-5.56; RR 2.12, IC 95% 1.41-3.19).

Pacientes CPC positivos tuvieron un peor pronóstico, con un tiempo a la recidiva bioquímica menor independiente de grupo de riesgo. Las curvas de supervivencia libre de recidiva bioquímica muestran que sujetos con riesgo intermedio, CPCs negativo tuvieron una mayor tasa de supervivencia y mayor tiempo a la progresión de la enfermedad que aquellos sujetos de bajo riesgo pero con CPCs positivo.

**Conclusiones:** El uso de la detección de CPCs es un factor de riesgo para la recidiva bioquímica y podrían ser útiles para identificar pacientes que necesitaran tratamiento adicional.

**Palabras claves:** cáncer prostático; radioterapia; células prostáticas circulantes; recidiva bioquímica.

## **Introducción**

El uso del Antígeno Prostático Específico (PSA) como método de tamizaje para cáncer de próstata (CP) ha resultado en una migración diagnóstica a estados más tempranos de la enfermedad, con una mayoría de los hombres diagnosticados con enfermedad clínicamente localizada, no palpable (1, 2). Aunque el porcentaje de pacientes con tumores clínicamente confinados a la próstata ha aumentado, todavía hay fallas en el tratamiento. La radioterapia externa (EBRT) es una de las terapias estándar para el tratamiento del CP localizado.

Los pacientes se estratifican en grupos de riesgo usando valores de PSA pre tratamiento, score de Gleason de la biopsia y el estado clínico tumoral (3). Esta clasificación se utiliza para definir el tratamiento; pacientes de bajo riesgo pueden ser tratados con radioterapia como mono-terapia, mientras que pacientes de riesgo intermedio son candidatos a terapia de privación androgénica (ADT) después de la radioterapia. Sin embargo, estudios recientes han cuestionado el beneficio del uso de ADT en pacientes clasificados como de riesgo intermedio (4).

Se ha descrito que con el uso de radioterapia conformacional tridimensional, a dosis  $> 76$  Gy, las tasas de supervivencia libres de recaída bioquímica a 5 y 10 años son de 94.1% y 79.2 % respectivamente para pacientes con cáncer de bajo riesgo y 86.4% y 70.9% respectivamente para pacientes de riesgo intermedio (5). La recaída o recidiva bioquímica fue definida según los criterios Phoenix "ASTRA II (*American Society for Therapeutic Radiology and Oncology*)" como un nivel del PSA sérico de 2ng/ml sobre el nadir de PSA obtenido después de la radioterapia (6).

La estratificación de riesgo se usa para ayudar en la toma de decisiones clínicas sobre el manejo del paciente, aportando una asignación de riesgo o probabilidad de supervivencia previa a la selección del tratamiento. La presencia de células tumorales prostáticas circulantes secundarias (CPCs) detectadas en sangre periférica después de un tratamiento curativo ha sido asociado con un peor pronóstico en pacientes post prostatectomía radical e implica la persistencia del cáncer de próstata o enfermedad residual mínima (MRD). (7)

Presentamos este estudio que evalúa hombres con cáncer de próstata localizado tratados con radioterapia conformacional 3D como monoterapia y la presencia o ausencia de CPCs detectadas 3 meses después del tratamiento y su asociación con resultados terapéuticos, con hasta 15 años de seguimiento.

### **Métodos y Pacientes:**

Se incluyeron pacientes de sexo masculino que fueron sometidos a radioterapia conformacional 3D como monoterapia para tratamiento de cáncer de próstata entre los años 2001 y 2016.

Se obtuvo el consentimiento informado de cada paciente para poder registrar los siguientes datos: Edad, fecha de cirugía, PSA al diagnóstico usando el ensayo Siemens Advia CentaurXR®, estadio clínico basado en examen de tacto rectal (TR) de acuerdo a la clasificación TNM de 1997 (8) y Score de Gleason determinado por biopsia prostática analizada por un patólogo especializado en cáncer prostático. En 2005, el score de Gleason fue modificado según las recomendaciones y consenso de la Sociedad Internacional de Patología Urológica (9), por el periodo elevado del estudio el nuevo score no fue incorporado y el sistema antiguo se mantuvo.

Se clasificó a los pacientes de acuerdo a D'Amico como riesgo bajo, intermedio o alto (3). Solo los pacientes con riesgo bajo e intermedio que no recibían terapia de privación androgénica se incluyeron en el estudio. Se excluyó a hombres con lesiones óseas en estudios de imágenes, así como a los pacientes que hubiesen recibido previamente terapia de privación androgénica.

Todos los pacientes recibieron radioterapia conformacional 3D en fracciones diarias de 2Gy, durante 5 días a la semana, sin refuerzos, para completar una dosis promedio de 75 Gy a la próstata (rango 74.1 – 76 Gy).

Durante el seguimiento se midió niveles totales de PSA sérico cada 3 meses los primeros dos años y luego cada 6 meses hasta la ocurrencia de la recaída bioquímica o hasta el último control. La recidiva bioquímica se definió como un aumento en niveles plasmáticos de PSA sérico de 2ng/ml sobre el nadir obtenido después de la radioterapia según los criterios “Phoenix” de ASTRA II (*American Society for Therapeutic Radiology and Oncology*) (6).

### **Detección de células prostáticas circulantes**

Tres meses después de completar la radioterapia se tomaron 8 ml de sangre venosa y se almacenaron en un tubo con EDTA como anticoagulante (BD – Vacutainer®, USA). Las muestras se mantuvieron a 4°C y

fueron procesados dentro de las primeras 48 horas de su toma. La detección de CPCs fue realizada por profesionales independientes y ciegos a los resultados del otro clínico-patólogo.

Para la recolección de CPCs se separaron las células mononucleares por centrifugación diferencial, utilizando Histopaque 1.077 (Sigma-Aldrich), fueron lavadas y re-suspendidas en alícuotas de 100µL de plasma autólogo. Se utilizaron alícuotas de 25µL para realizar las cuatro laminas (sialinizados, DAKO, USA) las cuales fueron secadas en aire por 24 horas y fijadas con una solución de 70% etanol, 5% formaldehído y 25% de buffer salino fosfatado (PBS) a pH 7.4 por 5 minutos y finalmente lavadas tres veces en PBS pH 7.4.

Se detectaron las CPCs mediante inmunocitoquímica utilizando anticuerpos monoclonales contra PSA, clon 28 A4 (Novocastro Laboratory, UK), e identificadas utilizando un sistema de reacción fosfatasa alcalina anti fosfatasa alcalina (LSAB2, DAKO, USA) con nueva fucsina como cromogen. Las muestras positivas fueron sometidas a un segundo proceso con anti P504S clon 13H4 (DAKO, USA) y fueron identificadas con un sistema basado en peroxidasa (LSAB2, DAKO, USA) con DAB (3,3 diaminobenzidina tetrahidroclorido) como cromogen. Se definió una CPC de acuerdo al criterio de ISHAGE (Sociedad internacional de hemoterapia e ingeniería genética) (10) y la expresión de P504S de acuerdo al consenso de la Sociedad Americana de Patólogos (11). Una CPC se consideró como una célula que expresa PSA y P504S, dado que una célula prostática benigna puede expresar PSA pero no P504S y los leucocitos pueden expresar P504S pero no PSA. Los pacientes con CPCs positiva para PSA pero negativa para P504S fueron catalogados como negativos para el test.

Las muestras fueron analizadas de manera manual, las células teñidas se fotografiaron utilizando una cámara digital y desde las imágenes digitales se determinó la presencia o ausencia de CPCs y el número total de CPCs/muestra.

#### **Análisis estadística:**

Se utilizó el programa Stata (Stata/SE 14.0 for Windows, Stata Corp Lp, 20159) y se describió la naturaleza y distribución de variables cuantitativas y ordinales con medidas de tendencia central (media y mediana) y de dispersión, usando el rango inter-cuartil (IQR) y la desviación estándar (SD) (12). Se utilizó el test de

Shapiro-Wilk para definir la hipótesis nula con respecto a la distribución normal. Las variables dicotómicas nominales fueron descritas como proporciones con sus respectivos intervalos de confianza (12).

A partir de la clasificación de grupo de riesgo (bajo e intermedio) y la presencia o ausencia de CPCs se construyeron 4 grupos, Grupo 1: CPC negativo y bajo riesgo; Grupo 2: CPC negativo y riesgo intermedio; Grupo 3: CPC positivo y riesgo intermedio; Grupo 4: CPC positivo y riesgo intermedio.

Se realizó un análisis no paramétrico de sobrevida a 15 años de seguimiento, estableciendo el porcentaje supervivencia, mediana y media para el total de la cohorte, así como por grupos establecidos. Además, se realizó una prueba de log-rank comparando la sobrevida entre grupos definidos.

En la valoración de la presencia o ausencia de CPCs y la clasificación de riesgo (bajo e intermedio) para la predicción de falla bioquímica a 15 años.

Para cada grupo pre-establecido se determinó el *hazard ratio*. La validez del modelo se evaluó mediante la comparación entre las predicciones predichas por modelo y observadas en la realidad en curva de Kaplan-Meier. La capacidad de discriminación y exactitud predictiva del modelo se evidencia a través de la determinación de la C de Harrell (12, 13).

El tiempo medio de sobrevida restringido (RMST) es el tiempo promedio en el cual ocurre un evento. Su interpretación clínica es dependiente el evento estudiado y del tiempo de seguimiento. Se determina calculando el área bajo la curva de sobrevida (14,15).

### **Consideraciones éticas**

Este estudio fue aprobado por el Comité de ética local y cumple con la Declaración de Helsinki. Todos los pacientes otorgaron su consentimiento escrito.

### **Resultados**

Se incluyó en el estudio 241 hombres que tenían cáncer de próstata órgano confinado y cumplían totalmente los criterios de inclusión. Sus edades estaban simétricamente distribuidas, con un promedio de edad de  $67.0 \pm 8.6$  años. El PSA sérico al momento del diagnóstico mostraba una distribución asimétrica, con una mediana e rango inter-cuartil (RIC) de 5.35ng/ml y 0.66ng/ml respectivamente.

De los 241 pacientes, 181 (75.1%) fueron clasificados con enfermedad de bajo riesgo y 60 (24.9%) de riesgo intermedio. Las características clínicas de los pacientes se muestran en la Tabla 1. El PSA y la edad

evidenciaron un contraste de Shapiro-Wilk con valor P de <0,01. De los 241 sujetos 65 (26,97%; IC95%: 21,38 a 32,57) presentaban CPC positivo y 61 (25,31%; IC95%: 19,82 a 20,80) tenían riesgo intermedio. La distribución por grupos pronóstico observada fue 144 casos (59,75%; IC95%: 53,56 a 65,94) grupo 1, 32 casos (13,28%; IC95%: 8,99 a 17,56) grupo 2, 36 casos (14,94%; IC95%: 10,44 a 19,44) grupo 3 y 29 casos (12,03%; IC95%: 7,93 a 16,14) grupo 4.

Para toda la cohorte a 15 años la supervivencia de Kaplan-Meier para falla bioquímica observada fue de 51,46% (IC95%: 42,38 a 59,80), sin observar mediana. La media restringida a 15 años de seguimiento para falla bioquímica en todos los sujetos estudiados fue de 10,83 años (IC95% 10,14 a 11,53). En términos generales, los sujetos con una recidiva bioquímica fueron mayores, con una promedia de edad de  $69.5 \pm 5.3$  años versus  $67.3 \pm 3$  años ( $p < 0.001$  T-test), tuvieron un PSA sérico mediana mayor al momento del diagnóstico, con una mediana de 5.89 ng/ml (RIC 2.4) versus 5.21 ng/ml (RIC 1.60) ( $p < 0.001$  test de Mann-Whitney), y fueron positivas para la detección de CPCs en 72% versus 3% ( $p < 0.001$  test de Mann-Whitney).

La recidiva bioquímica se observó en 27.1% (49/181) de los sujetos con cáncer prostático de bajo riesgo y en 53.3% (32/60) de los con riesgo intermedio tras 15 años de seguimiento. Las curvas de Kaplan-Meier para hombres con cáncer de próstata de riesgo bajo e intermedio se muestran en la Figura 1, demostrando un *hazard ratio* de 4.13 (IC 95%, 2.61 – 6.53). La tasa de supervivencia libre de la recidiva bioquímica en cáncer de próstata de bajo riesgo a 5, 10 y 15 años fue de 90.3%, 68.4% y 65% respectivamente. La supervivencia mediana libre de la recidiva bioquímica no se logró en hombres con cáncer de bajo grado. El tiempo medio de supervivencia restringida hasta la recidiva bioquímica fue de 12 años (IC 95%, 11.3-12.7 años) en pacientes de bajo riesgo.

Para los sujetos con cáncer de próstata de riesgo intermedio la tasa de la supervivencia libre de la recidiva bioquímica a 5 y 10 años fue de 61.3% y 31.5%, respectivamente, con una supervivencia mediana libre de la recidiva bioquímica de 6 años y un tiempo medio de supervivencia restringida hasta la recidiva bioquímica de 6.4 años (IC 95%, 5.3-7.4 años). De los 60 pacientes con riesgo intermedio, 14 (23%)

presentaban un factor de riesgo, 35 (58%) dos factores de riesgo y 11 (19%) tres factores de riesgo; al evaluar por factores de riesgo, 5/14 (36%), 21/35 (60%) y 9/11 (82%) presentaron una recidiva bioquímica respectivamente (Figura 1).

#### Presencia o ausencia de CPCs y supervivencia libre de la recidiva bioquímica

El 20.4% (37/181) de los sujetos con cáncer de bajo riesgo tenían CPCs detectables en comparación al 43.3% (26/60) de los sujetos con cáncer de riesgo intermedio ( $p < 0.001$  OR 2.98, IC 95% 1.59-5.56; RR 2.12, IC 95% 1.41-3.19).

**a. Cáncer de próstata de bajo riesgo:** Los sujetos CPCs negativos presentaron una tasa de supervivencia libre de la recidiva bioquímica superior tras 15 años de seguimiento. La curva de supervivencia de Kaplan-Meier fue de 80.9% (IC 95%, 69.6-88.4%) a 15 años, la supervivencia mediana no se logró y el tiempo medio de supervivencia restringida hasta la recidiva bioquímica fue de 13.8 años (IC 95%, 13.2-14.3 años). En cuanto a los sujetos CPCs positivo, ellos presentaron una supervivencia de Kaplan-Meier fue a 15 años de 6.44% (IC 95%, 1.2-18.5 años), con una supervivencia mediana libre de la recidiva bioquímica de 5.9 años (IC 95%, 3.9-7.8 años) y un tiempo medio de supervivencia restringida hasta la recidiva bioquímica de 6.2 años (IC 95%, 5.1-7.4 años). El *hazard ratio* entre ambos grupos fue 16.7 (IC 95%, 8.5-32.8). Sin embargo, en este grupo los sujetos CPCs negativo presentaron menos falla de tratamiento y el tiempo medio hasta la recidiva bioquímica fue significativamente mayor (Figura 2).

**b. Cáncer de próstata de riesgo intermedio:** Los sujetos CPCs negativo tuvieron mayores tasas de supervivencia libre de la recidiva bioquímica a 15 años. La supervivencia de Kaplan-Meier fue de 47.0% (IC 95%, 17.6-72.0), con una supervivencia mediana libre de la recidiva bioquímica de 10.4 años (IC 95%, 7.9-12.0 años) y un tiempo medio de supervivencia restringida hasta la recidiva bioquímica de 9.3 años (IC 95%, 8.2 – 10.4 años). En cambio, los sujetos CPCs positivo tuvieron una supervivencia de Kaplan-Meier a 15 años de 6.9% (IC 95%, 1.2-19.8 años), con una supervivencia

mediana libre de la recidiva bioquímica de 2.3 años (IC 95%, 2.0-3.6 años) y un tiempo medio de supervivencia restringida hasta la recidiva bioquímica de 3.6 años (IC 95%, 2.6-4.6 años). El *hazard ratio* entre ambos grupos fue de 8.81 (IC 95%, 3.79-20.5). Al igual que en pacientes de bajo riesgo, en este grupo los sujetos CPCs negativo presentaron menos falla de tratamiento y el tiempo medio hasta la recidiva bioquímica fue significativamente mayor (Figura 2).

#### Riesgo de supervivencia libre de la recidiva bioquímica basado en detección de CPC y grupo de riesgo

Al comparar los cuatro grupos de estudio, hubo una diferencia significativa en la supervivencia libre de la recidiva bioquímica a 15 años, tiempo mediana de supervivencia y tiempo medio de supervivencia restringida hasta la recidiva bioquímica (Tabla 2). Al comparar la supervivencia para falla bioquímica entre los grupos pronostico el contraste de log rank mostro un valor  $p < 0,01$ .

El modelo predicho para falla bioquímica obtenido mediante la regresión de riesgos proporcionales de Cox evidencia un HR de 3,76 (IC95%:1,59 a 8,92) para grupo de sujetos CPC negativo y riesgo intermedio ( grupo 2); HR: 14,27 (IC95%:7,70 a 26,45) en sujetos con presencia de CPC y bajo riesgo (grupo3) y HR: 32,47 (IC95%: 17,02 a 61,93) en sujetos con presencia de CPC y alto riesgo (grupo 4). Todos los HR antes mencionados evidencia un p valor  $< 0,05$ .

La supervivencia descrita en modelo paramétrico de Kaplan-Meier (supervivencia observada) es concordante con la supervivencia predicha por modelo de regresión de riesgo proporcionales de Cox en base a la presencia de CPC y tipo de riesgo (bajo o intermedio) para falla bioquímica (figura3), planteado así que el modelo predicho presenta una adecuada calibración.

El índice de discriminación C de Harrell, para el modelo predicho de falla bioquímica en base a la presencia de CPC y tipo de riesgo (bajo o intermedio) muestra un valor de 0,85.

Las curvas de supervivencia libre de la recidiva bioquímica muestran que sujetos con riesgo intermedio, CPCs negativo tuvieron una mayor tasa de supervivencia y mayor tiempo hasta la progresión de la enfermedad que aquellos sujetos de bajo riesgo pero con CPCs positivo (Figura 2).

#### **Discusión:**

Identificar pacientes en riesgo de falla de tratamiento tras ser sometidos a radioterapia “curativa” es un factor importante a tener en cuenta en el manejo de pacientes con cáncer de próstata. Los sujetos

clasificados en bajo riesgo tienen un muy buen pronóstico tras la radioterapia curativa exclusiva. En pacientes de riesgo intermedio existe controversia en cuanto al uso de bloqueo androgénico como terapia adyuvante.

Se ha sugerido que en pacientes de riesgo intermedio que presenten tres factores de riesgo, PSA sérico al tiempo del diagnóstico, score de Gleason y estadio clínico, deberían recibir bloqueo androgénico (16). No obstante, el uso de nuevos biomarcadores pudiese ayudar a clasificar a sujetos de alto riesgo y ayudar en el manejo de estos pacientes, especialmente a los pacientes que no podrían beneficiarse de la supresión androgénica y por lo tanto evitar los efectos adversos.

En nuestro grupo de estudio, la supervivencia libre de recaída bioquímica en pacientes de bajo riesgo fue similar a la reportada en la literatura, mientras que en pacientes con riesgo intermedio la supervivencia libre de recaída fue más baja. Esto se puede explicar por el número de sujetos con dos o tres factores de riesgo, en los cuales se podría haber considerado uso de bloqueo androgénico.

La detección de las CPCs es dependiente del método utilizado para detectarlas y no hay un consenso de cual método es mejor; el CellSearch® (Varidex, EEUU) sistema basada en EpCAM (molécula de adhesión de células epiteliales) y el único sistema aprobado por la FDA, la frecuencia de pacientes positivos para CPCs es menor al 25% en pacientes con cáncer localizado y fue similar a los pacientes controles (17, 18). Sin embargo al utilizar un anticuerpo anti BER 4 y un sistema de telomerasa, las CPCs se detectaron en el 80% de los pacientes con cáncer de próstata localizado (19). Métodos utilizando filtración para separar CPCs de sangre periférico han detectado CPCs en todos los estadios de cáncer prostático (20, 21). En este estudio hemos utilizado centrifugación por gel y inmunocitoquímica para detectar las CPCs. Previamente, en pacientes sometidos a la prostatectomía radical, hemos definidos las CPCs como primarias cuando son detectadas previa a la cirugía y secundarias cuando son detectadas después de la cirugía. Para diferenciar entre CPCs benignas y malignas utilizamos la doble-inmunomarcación. En pacientes con enfermedades de la próstata benigna ha sido reportado que células que se expresan PSA pueden ser detectada en la sangre (22), pero las CPCs detectadas no expresan P504S a diferencia de células malignas. En pacientes post radioterapia es posible que tejido benigno, inflamado por la radiación pueda resultar en la diseminación de

CPCs benignas en la circulación. En pacientes con enfermedades inflamatorias del colon células expresando EpCAM y citoqueratinas fueron detectadas utilizando el sistema CellSearch® (23).

Anticuerpos monoclonales contra el PSA fueron utilizados por su alta especificidad para el tejido prostático; CPCs detectadas después de la prostatectomía radical han sido asociadas con la recidiva bioquímica precoz (7). Hemos validado internamente este método de la detección de CPCs utilizando anti-PSA, con una concordancia buena entre diferentes observadores. Tiene la ventaja de ser bajo costo y puede ser implementado en el laboratorio de rutina de un hospital general. Los resultados son informados como positivo o negativo para facilitar las decisiones clínicas con respecto del manejo del paciente y ha sido incorporada en la guía clínica local. Pacientes negativos para las CPCs tiene un seguimiento según las recomendaciones estándares, mientras pacientes positivas tienen un seguimiento más frecuente. En el grupo CPC positivo, posibles tratamientos incluye observación, bisfosfonatos y/o la supresión androgénica, como parte de un estudio clínico.

La primera muestra para la detección de CPCs fue tomada 3 meses post tratamiento para minimizar este efecto inflamatorio y para coincide con el primero control con un PSA, a diferencia con post prostatectomía la primera muestra fue 1 mes post tratamiento (24). Las CPCs detectadas post-radioterapia serán consideradas como CPCs secundarias; igual como en pacientes post prostatectomía radical, su presencia no se determinará si son de un micro foco local o distante, sin embargo la supervivencia libre de la progresión de la enfermedad es semejante por pacientes CPC positiva independiente de que tiene o no micro metástasis en la médula ósea (25). Por lo tanto en lo práctico, pacientes CPC positivas tienen un peor pronóstico y un tiempo a la recidiva menor que pacientes CPC negativas (26).

Para el análisis de supervivencia utilizamos el media restringida que es el tiempo medio para un evento ocurre, su interpretación clínica es dependiente del evento en estudio y el tiempo del seguimiento. Es diferente que el tiempo mediano en que es una prueba no-paramétrica lo cual es el estándar de oro para una prueba estadística. Ha sido reportado de tener un mejor sensibilidad en el análisis de datos tiempo dependientes (27).

En hombres con cáncer de próstata de bajo riesgo, el 79.6% fueron CPCs negativo tres meses después de la radioterapia. Estos sujetos tenían un muy buen pronóstico, con más del 80% libre de recaída bioquímica a 15 años post tratamiento. El tiempo medio para presentar recaída en estos pacientes fue cercano a 14 años, lo que sugiere que el bloqueo androgénico hubiese tenido pocos beneficios. En comparación, los hombres con cáncer de bajo riesgo pero que presentaban CPCs positivo tuvieron un peor pronóstico, con sobrevida libre de recaída bioquímica de 6.4% a 15 años y un tiempo promedio para recaída de 6 años. Estos resultados sugieren que es posible identificar un sub grupo de pacientes de bajo riesgo (20% del grupo total de cáncer de bajo riesgo) con una mayor probabilidad de falla del tratamiento. Es interesante destacar que sujetos en el grupo de riesgo intermedio con CPCs negativo tuvieron mucho mejor pronóstico, con una sobrevida a 15 años libre de recaída de 47% y un mayor tiempo medio a recaída de 9 años. Sin embargo, los hombres con cáncer de riesgo intermedio con CPCs positivo presentaron un peor pronóstico, con menor tiempo medio a falla del tratamiento, de aproximadamente 4 años, y una sobrevida media libre de recaída bioquímica de 2 años. Hombres con CPCs positivo tuvieron una tasa de sobrevida similar a 15 años, de aproximadamente 6%; la diferencia en el tiempo a falla de tratamiento fue mayor en hombres de bajo riesgo, seis versus tres años.

En términos prácticos, los resultados de este estudio sugieren lo siguiente:

- a. Pacientes con cáncer de próstata de riesgo intermedio CPCs positivo serán considerados para el bloqueo androgénico de forma temprana tras la radioterapia, ya que este grupo presentó una baja sobrevida libre de recaída y el tiempo medio hasta la falla muy corto. Estos hallazgos sugieren que estos pacientes se beneficiarían de terapia adyuvante precoz.
- b. Pacientes de riesgo intermedio CPCs negativo no parecen beneficiarse de terapia adyuvante precoz, ya que el 50% estuvo libre de recaída bioquímica a 15 años y aquellos que presentaron falla de radioterapia curativa tuvieron un tiempo medio hasta la falla de 9 años. En estos pacientes se sugiere la observación hasta presentar evidencia de recaída.
- c. Pacientes con cáncer de próstata de bajo riesgo CPCs negativo tuvieron un excelente pronóstico, con más del 80% libre de recaída. Estos resultados sugieren que estos pacientes deberían ser observados, sin necesidad de agregar terapia adicional, tal como lo recomiendan las guías actuales.

- d. Pacientes de bajo riesgo CPCs positivo tuvieron un peor pronóstico que lo esperado. En estos hombres sería beneficioso el bloqueo androgénico, pero se necesitan ensayos clínicos prospectivos.

Nuestro estudio tiene limitaciones; primero es que la clasificación de Gleason utilizado fue la antigua, todos pacientes fueron clasificados como Gleason  $\leq 6$ , 7 or  $\geq 8$ . La clasificación Gleason 3 + 4 y 4 + 3 recomendada después de 2005 (9) no fue adaptada. Aun la concordancia entre el informe de Gleason en la biopsia y pieza quirúrgica es mejor (28) en términos del pronóstico no hubo diferencias entre el antigua Gleason 6 y el nuevo Gleason 3 +4, además que comparaciones entre resultados históricos y nuevos podrían ser inválidos (29-31). Por esta razón en nuestro estudio se mantuvo el antigua sistema de Gleason. Pacientes con Gleason 6 cáncer prostático y cumple con los criterios de Epstein (32) en la biopsia prostática pueden ser tratados con la observación activa. Ha sido reportado que la presencia de CPCs previa al tratamiento definitivo es asociada con un cáncer más avanzado, en términos de puntaje de Gleason y estadio patológico (33), aun no contemplado en este estudio, pacientes con Gleason 6 y tratados con radioterapia tuvieron un alto frecuencia de fracaso de tratamiento cuando fueron CPC positiva. La sugerencia es que no todos los canceres Gleason 6 son “benigna” Esta observación permite la hipótesis que no todos los pacientes con Gleason 6 tienen cáncer de bajo riesgo.

Ha sido cuestionado el uso de inmunocitoquímica por la variabilidad intra e inter-observador, sin embargo la estadística kappa para la variabilidad intra- e inter observador para la presencia o ausencia de CPCs fue de 0,77, considerada de ser bueno (24). La validez clínica de un examen no es necesariamente la misma que utilidad clínica, los resultados obtenidos en este estudio sugiere que la detección de las CPC tiene una utilidad en la evaluación de pacientes tratados con radioterapia para predecir el riesgo de la recidiva bioquímica. Los resultados tienen que ser confirmado en estudios multicéntricos.

**Conclusiones:** La detección de CPCs post-radioterapia identifica un sub-grupo pacientes de alto riesgo de la recidiva bioquímica, independiente de la clasificación de bajo y riesgo intermedio. Sin

embargo la presencia de CPCs como biomarcador de la enfermedad mínima residual no define el tratamiento óptimo, como no se distingue entre la recidiva local o sistémica.

Los resultados merecen estudios aleatorios para confirmar la utilidad de CPC detección en la predicción de la recidiva bioquímica en pacientes tratados con radioterapia.

### **Agradecimientos**

Señora Ana María Palazuelos por ayudar en la redacción de este manuscrito.

### **Conflictos de interés**

Doctor Murray ha recibido financiamiento por consultas de Viatar CTC solutions, EEUU. Los demás autores no reportan conflictos de interés.

### **Financiamiento**

Este estudio fue apoyado por la beca de investigación otorgada por el Hospital de Carabineros de Chile.

### **Referencias**

- 1) Tornblom M, Eriksson H, Franzen S, Gustafsson O, Lilja H, Norming U et al. Lead time associated with screening for prostate cancer. *Int J Cancer* 2004; 108: 122-129.
- 2) Draisma G, Boer R, Otto SJ, van der Crujisen IW, Damhuis RA, Schroder FH et al. Lead times and over detection due to prostate specific antigen screening: estimates from the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 868-878
- 3) D'Amico A, Altschuler M, Whittington R, Kao G, Malkowicz SB, Wein A. The use of clinical parameters in an interactive statistical package to predict pathological features associated with local failure after radical prostatectomy for prostate cancer. *Clin Perform Qual Health Care* 1993; 1: 219-222
- 4) Amini A, Rusthoven CG, Jones BL, Armstrong H, Raben D, Kavanagh BD. Survival outcomes of radiotherapy with or without androgen deprivation therapy for patients with intermediate-risk

prostate cancer using the National Cancer Data Base. *Urol Oncol.* 2016; 34: 165.e1-9. doi: 10.1016/j.urolonc.2015.11.004

- 5) Boladeras A, Martinez E, Ferrer F, Gutierrez C, Villa S, Pera J et al. Localized prostate cancer treated with external beam radiation therapy: Long term outcomes at a European comprehensive cancer center. *Reports Pract Oncol & Radiother* 2016; 21: 181-187
- 6) Roach M 3<sup>rd</sup>, Hanks G, Thames H Jr, Schnellhammer P, Shipley WU, Sokol GH et al. Defining biochemical failure following radiotherapy with or without hormonal therapy in men with clinically localized prostate cancer: recommendations of the RTOG-ASTRO Phoenix Consensus Conference. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 65: 965-974
- 7) Murray NP, Reyes E, Orellana N, Fuentealba C, Badinez L, Olivares R, et al . Secondary circulating prostate cells predict biochemical failure after radical prostatectomy and without evidence of disease. *The Scientific World J* 2013 ; <http://dx.doi.org/10.1155/2013/762064>
- 8) International Union Against Cancer (UICC): TNM Classification of malignant tumours, 5th ed, Sobin LH, Wittekind Ch (ed.), New York, Wiley-Liss. 1997; pp. 170-3.
- 9) Epstein JL, Allsbrook WC Jr, Amin MB, Egevad II. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 1228-1242
- 10) Borgen E, Naume B, Nesland JM, Kvalheim G, Beiske K, Fodstad O et al. Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in BM and blood. I. Establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells. *Cytotherapy*, 1999; 1: 377–388.
- 11) Rubin MA, Zhou M, Dhanasekaran SM et al.  $\alpha$ -methylacyl Coenzyme-A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer, *JAMA* 2001; 287: 1662–1670.

- 12) Rosner B. Fundamentals of biostatistics. Eighth Edition. Boston: Centre Learning; 2015. 927 pp.
- 13) Royston P. Tools for checking calibration of a Cox model in external validation: prediction of population-averaged survival curves based on risk group. *The Stata Journal*. 2015; 15: 275-291.
- 14) Royston P, Parmar MK. The use of restricted mean survival time to estimate the treatment effect in randomized clinical trials when the proportional hazards assumption is in doubt. *Stat Med*. 2011;30(19):2409-21.
- 15) Royston P, Parmar MK. Restricted mean survival time: an alternative to the hazard ratio for the design and analysis of randomized trials with a time-to-event outcome. *BMC Med Res Methodol*. 2013;13:152.
- 16) NCCN 2017 guidelines prostate cancer. [www.nccn.org](http://www.nccn.org) accessed September 2017
- 19) Klotz L, Zhang L, Lam A et al. Clinical results of a longterm follow up of a large, active surveillance cohort with localized prostate cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28:126-131
- 20) Eschwège P, Moutereau S, Droupy S, et al. Prognostic value of prostate circulating cells detection in prostate cancer patients: a prospective study. *Br J Cancer*. 2009; 100: 608-10
- 21) Fizazi K, Morat L, Chauveinc L, et al. High detection rate of circulating tumor cells in blood of patients with prostate cancer using telomerase activity. *Ann Oncol*, 2007; 18: 518-21
- 22) Awe JA, Saranchuk J, Drachenberg D et al. Filtration based enrichment of circulating tumor cells from all prostate cancer risk groups. *Urol Oncol* 2017, 35; 300-309
- 23) Low WS, Wan Abas WA. Benchtop technologies for circulating tumor cells separation based on biophysical properties. *Biomed Res Int* 2015; doi: 10.1155/2015/239362

- 24) Murray NP, Reyes E, Tapia P et al. Circulating Prostate Cells Found in Men with Benign Prostate Disease Are P504S Negative: Clinical Implications. *Journal of Oncology* Volume 2013, Article ID 165014, 5 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/165014>
- 25) K. Pantel, E. Denéve, D. Nocca et al., Circulating epithelial cells in patients with benign colon diseases, *Clin Chem* 2012; , 58: 936–940.
- 26) Murray NP, Aedo S, Fuentealba C, et al. How localized is pathologically localized prostate cancer? The use of secondary circulating prostate cells as a marker of minimal residual disease and their association with patient outcome. *Turk J Urol.* 2017 Dec;43:456-461
- 27) Murray NP, Aedo S, Fuentealba C, et al. Minimum Residual Disease in Patients Post Radical Prostatectomy for Prostate Cancer: Theoretical Considerations, Clinical Implications and Treatment Outcome *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018 ;19:229-236.
- 28) A`Hern RP. Restricted mean survival time: An obligatory end point for time to event analysis in cancer trials?. *J Clin Oncol*, 2016; 34, 3474-6.
- 29). Helpap B, Egevad L. The value of the modified Gleason grading system of prostate adenocarcinoma in routine urological diagnostics. *Urologe A* 2007; 46: 59-62.
- 30) Berg KD, Thomsen FB, Nerstrom C et al. The impact of the 2005 ISUP consensus guidelines on Gleason grading-a matched pair analysis. *BJU Int* 2016; 117: 883-889
- 31) Thomsen FB, Folkvalion Y, Brasso K et al. Prognostic implications of 2005 Gleason grade modification. Population based study of biochemical recurrence following radical prostatectomy. *J Surg Oncol* 2016; 114: 664-670
- 32) Epstein JI, et al. Pathologic and clinical findings to predict tumor extent of nonpalpable (stage T1c) prostate cancer. *JAMA.* 1994;271(5):368–74.
- 33) Murray NP, Reyes E, Fuentealba C et al. The presence of primary circulating prostate cells is associated with upgrading and upstaging in patients eligible for active surveillance. *Ecancermedicalscience.* 2017 Jan 10;11:711. doi: 10.3332/ecancer.2017.711. eCollection 2017.

**Tabla 1.** Características de los sujetos, 241 hombres con cáncer de próstata de riesgo bajo e intermedio tratado con radioterapia.

	<b>Bajo riesgo</b>	<b>Riesgo intermedio</b>
Nº Pacientes	181	60
<u>Edad:</u> Promedio +/- SD	68.1 +/- 5.9 años	68.0 +/- 5.9 años
<u>Score de Gleason:</u> ≤ 6 7	181 -	17 43
PSA ng/ml promedio pre- tratamiento IQR	5.90 4.68-6.06	6.96 5.25-11.69

Tabla 2. Porcentaje de supervivencia, supervivencia mediana, tiempo medio de supervivencia restringido hasta la falla bioquímica y hazard ratio tras 15 años de seguimiento de acuerdo a cáncer de próstata de riesgo bajo e intermedio y la presencia o ausencia de CPCs en una cohorte de 241 pacientes con cáncer de próstata tratados con radioterapia.

	<b>Supervivencia de Kaplan-Meier (IC 95%)</b>	<b>Mediana supervivencia (IC 95%)</b>	<b>Media restringida (IC 95%)</b>	<b>Hazard ratio (IC 95%)</b>
<b>Grupo 1</b> <i>CPC negativo, bajo riesgo</i>	86,40 (76,85 a 92,21)	No se observa	9,71 (9,54 a 98,89)	1
<b>Grupo 2</b> <i>CPC negativo, riesgo intermedio</i>	58,68 (28,83 a 79,58)	No se observa	8,67 (7,79 a 9,54)	3,83 (1,50 a 9,76)
<b>Grupo 3</b> <i>CPC positivo, bajo riesgo</i>	12,88 (4,16 a 26,69)	5,92 (3,92 a 7,75)	5,90 (4,92 a 6,88)	15,86 (8,09 a 31,08)

<b>Grupo 4</b>				
<i>CPC positivo, riesgo intermedio</i>	6,9 (1,22 a 19,75)	2,25 (2,00 a 3,89)	3,48 (2,58 a 4,39)	36,75 (18,30 a 73,79)

**Tabla 2.** Porcentaje de supervivencia, supervivencia mediana, tiempo medio de supervivencia restringido hasta la falla bioquímica y *hazard ratio* tras 15 años de seguimiento de acuerdo a cáncer de próstata de riesgo bajo e intermedio y la presencia o ausencia de CPCs en una cohorte de 241 pacientes con cáncer de próstata tratados con radioterapia.

Figura 1. Supervivencia observada (Kaplan-Meier) según clasificación de riesgo para una cohorte de 241 sujetos con cáncer prostático seguidos durante 15 años.

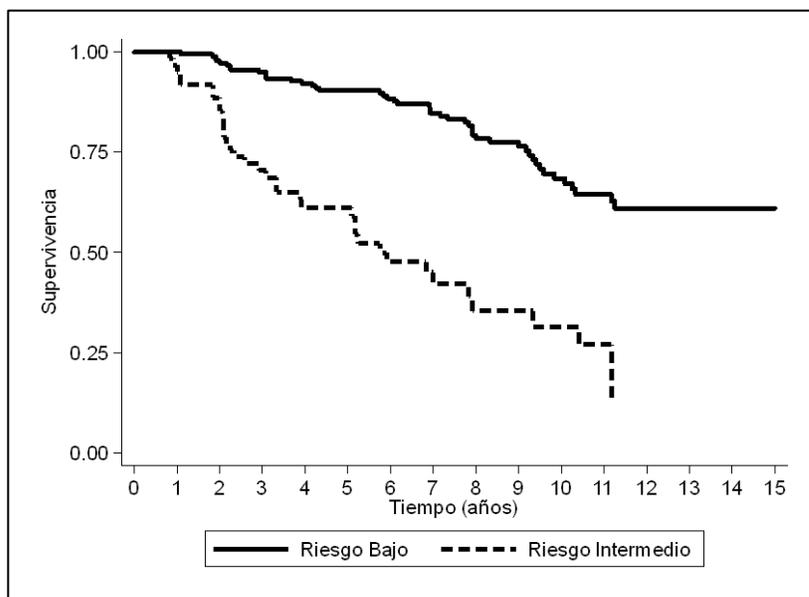


Figura 1. Supervivencia observada (Kaplan-Meier) según clasificación de riesgo para una cohorte de 241 sujetos con cáncer prostático seguidos durante 15 años.

Figura 2. Supervivencia observada (Kaplan-Meier) según presencia o ausencia de CPC para 181 sujetos de bajo riesgo y 60 sujetos de riesgo intermedio con cáncer prostático seguidos durante 15 años.

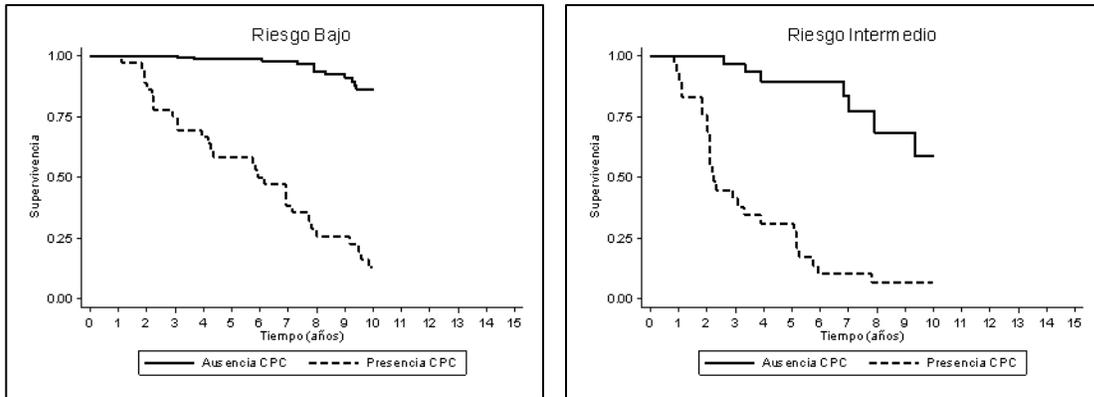


Figura 2. Supervivencia observada (Kaplan-Meier) según presencia o ausencia de CPC para 181 sujetos de bajo riesgo y 60 sujetos de riesgo intermedio con cáncer prostático seguidos durante 15 años.

Figura 3. Supervivencia observada (Kaplan-Meier) y predicha (modelo Cox) según presencia o ausencia de CPC y clasificación grupo riesgo para una cohorte de 241 sujetos con cáncer prostático seguidos durante 15 años.

