

Estabilidad del antígeno prostático específico total bajo diferentes condiciones de almacenamiento en muestras cubanas

Isbel García Figueredo,* Celia Ma Pereda Meira,* Lourdes Salles Fonseca,**
Fidel Picans Rodríguez,*** Yaumara Pedraye Soto,** Mercedes Guerra*

Palabras clave:

Antígeno prostático específico, PSA,
estabilidad, temperatura, enfermedades
prostáticas.

Key words: Prostate specific antigen, PSA, stability, temperature, prostatic disease.

*Laboratorio de Marcadores Tumorales. Departamento de Estudios Básicos. Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR). **Especialista. Laboratorio de Microbiología. INOR. ***Especialista. Laboratorio Clínico. INOR.

Correspondencia:
MsC Isbel García Figueredo
Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología
Departamento de Estudios Básicos
Laboratorio de Marcadores Tumorales
Calle Fy 29. Vedado.
La Habana, Cuba.
CP 10400.

Recibido:
09/01/2013.
Aceptado:
23/05/2013.

RESUMEN

La diferencia en la estabilidad de la molécula del antígeno prostático específico total (PSA_T) puede influenciar la utilidad clínica de este ensayo. **Objetivo:** Evaluar la estabilidad en el tiempo del antígeno prostático específico total, a diferentes temperaturas de almacenamiento. **Métodos:** Se tomaron aleatoriamente siete aliquotas de suero de 20 individuos. Se cuantificó el PSA_T inicial y se guardó el resto por duplicado -10 °C, -20 °C y -70 °C. Se volvió a cuantificar el PSA_T pasados 7 y 30 días. **Resultados:** A la semana, los valores disminuyeron 21.88%, 11.14% y 7.61% a -10 °C, -20 °C y -70 °C, respectivamente, sin diferencias significativas ($p \geq 0.05$). Al mes, decayeron 32.67%, 31.45% y 21.47% a -10 °C, -20 °C y -70 °C, respectivamente, sin diferencias significativas ($p \geq 0.05$). La mayor variación se observó en los valores de PSA_T entre 4-10 ng/mL almacenados a -10 °C. **Conclusiones:** Los resultados sugieren que las muestras se deben almacenar a -20 °C o menos por una semana. Cuando el tiempo de almacenaje se prolonga por un mes o más, éste se debe realizar a -70 °C; sobre todo porque los valores de PSA_T entre 4 y 10 ng/mL son más afectados con la temperatura.

ABSTRACT

Difference on total prostate specific antigen (tPSA) stability may influence its clinical utility. **Aim:** To evaluate prostate specific antigen stability in the time under different storage temperatures. **Methods:** Serum from 20 random individuals were aliquoted in seven vials. Total PSA assay was made immediately (initial tPSA ($t\text{PSA}$)), the six restates aliquots were stored at -10 °C, -20 °C and -70 °C, by pair. After seven and thirty days the tPSA was also measurement. **Results:** tPSA showed not significant decreases ($p \geq 0.05$) after seven and thirty days, respectively. Eventhough when a maximum decrease of tPSA value was observed after thirty days in the samples storage at -10 °C C (32.67% less than $t\text{PSA}$). The strongest variation was observed in those values between 4 and 10 ng/mL storage at -10 °C. **Conclusions:** Our results suggest that the samples most be storage at -20 °C or less for a week. If the storage time will be prolong for more than a month the samples should storage at -70 °C, because the values between 4 and 10 ng/mL are more affected by the storage condition related to temperature.

INTRODUCCIÓN

El antígeno prostático específico (PSA, del inglés prostate specific antigen) es una serino proteasa que pertenece a la familia de las calicreinas humanas y se puede determinar en suero, plasma, orina y tejido. En la práctica, el PSA que es liberado a la sangre es el procedente de tejidos prostáticos benignos y malignos, fundamentalmente. En estos últimos, los niveles de circulación se incrementan hasta 10^5 veces.¹ En la sangre manifiesta muy poca actividad catalítica debido a su unión a los inhibidores

α_1 quimiotripsina y β_2 macroglobulina.^{2,3} La fracción del PSA total (PSA_T) que no se encuentra unido a proteínas del suero es llamado PSA libre (PSA_L). La relación que existe entre el PSA_L y el PSA_T es una herramienta potente para diferenciar entre cáncer de próstata y la hiperplasia prostática benigna.⁴

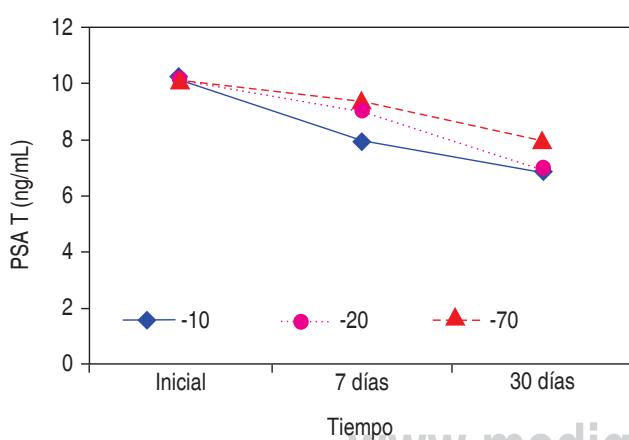
Los factores preanalíticos y analíticos son capaces de afectar los niveles de PSA y la interpretación clínica de los mismos.⁵ Entre ellos están los factores mecánicos, como el tacto rectal y la instrumentación;⁵ las variaciones biológicas, que se relacionan con factores in-

dividuales tales como: metabolismo del PSA, eliminación renal del PSA y la actividad física;⁶ los factores fisiológicos como la eyaculación⁵ y la inflamación;⁷ así como los diferentes medicamentos consumidos, ya sean los análogos de hormonas liberadoras de la hormona luteinizante y los antiandrógenos,⁸ o los antiinflamatorios no esteroideos (ácido acetilsalicílico e ibuprofeno).⁹ También van a depender del manejo, procesamiento y temperatura de almacenamiento de la muestra^{5,10} y la forma en que se produce el ensayo porque se afecta la estabilidad *in vitro* del PSA durante la colección de la muestra.^{6,11}

En Cuba, se ha comenzado la generalización del uso de la determinación del antígeno prostático específico, tanto para el diagnóstico como para el seguimiento de los pacientes con diferentes enfermedades prostáticas. Por lo que el establecer las mejores condiciones para la estabilidad de esta molécula en el suero es vital para el uso extendido de la técnica. Por consiguiente, se propuso evaluar la estabilidad en el tiempo, del antígeno prostático específico total, en muestras de suero de pacientes con enfermedades prostáticas, a diferentes temperaturas de almacenamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestra poblacional. El estudio se llevó a cabo con 20 pacientes que concurrieron a la Consulta de Urología por



Se grafican las medias obtenidas de los valores del PSA_T al momento del procesamiento (PSA inicial), a los 7 días y a los 30 días. Para las tres temperaturas de almacenamiento, -10; -20 y -70 °C, respectivamente. No se observaron diferencias significativas ($p \geq 0.05$; Test ANOVA).

Figura 1. Comportamiento de los valores de antígeno prostático específico total (PSA_T) en el tiempo, según la temperatura de almacenamiento.

presentar síndrome obstructivo urinario bajo y fueron remitidos al laboratorio para realizarles la determinación del antígeno prostático específico (PSA). A estos pacientes se les pidió consentimiento escrito para el uso de sus muestras en esta investigación. Las muestras se tomaron aleatoriamente de los pacientes que cumplieran con los siguientes criterios de inclusión: no haber sido sometidos a biopsias, tacto rectal o ultrasonido transrectal; no haber consumido medicamentos tales como aspirina o antiinflamatorios esteroideos o no esteroideos (una semana antes de realizar la determinación del PSA), hormonas u otro tratamiento específico para enfermedades prostáticas; y no haber tenido contacto sexual durante la semana previa a la toma de la muestra.

Estudio de la influencia en el tiempo de las condiciones de almacenamiento, sobre los valores del PSA total (PSA_T). A los pacientes incluidos, se les extrajeron 10 mL de sangre, mediante vacutainer seco (BD international). Los pacientes estaban en ayunas. La toma de la muestra se realizó en el horario comprendido de 7 a 9 a.m, por un técnico designado para trabajar en el estudio. La sangre se procesó dentro de las dos horas posteriores a la venopunción; se centrifugaron a 1,500 revoluciones por minuto (rpm) durante 20 minutos a 4 °C (Heraus, Germany). En el vacutainer se obtuvieron dos fracciones: suero y sedimento, desechándose esta última. El suero de cada muestra útil para el trabajo se guardó en viales Eppendorff de 1.5 mL (siete alícuotas por cada paciente), con una etiqueta de identificación. Una alícuota se tomó para realizar inmediatamente la determinación del PSA y el resto se almacenó por duplicado a -10 °C, -20 °C y -70 °C, respectivamente. Esto permitió realizar las determinaciones en condiciones estándar para todas las muestras y, por otra parte, efectuar un gran número de análisis de manera más eficiente.

Determinación de los valores del PSA total (PSA_T). Posterior al procesamiento de las muestras de sangre, se tomó una de las alícuotas y se cuantificó el PSA_T . Estos valores se recogieron como PSA inicial.

Para la determinación del PSA_T se utilizó un ensayo ultramicroinmunoenzimático heterogéneo tipo sandwich (UMELISA, Cuba). Todas las soluciones y reactivos usados pertenecen al juego de reactivos adquirido. El índice de detección de este sistema es de 0.02058 ng/mL para el PSA_T . Se emplearon sueros estándares y sueros de control liofilizados como control positivo del experimento. Los sueros de los pacientes se diluyeron previamente y se testaron por triplicado, todos en una misma placa. La intensidad de la fluorescencia emitida se midió a 405 nm en un lector de placas de ELISA de la serie SUMA, Cuba.

Después de una semana, se tomó una de las alícuotas que estaban almacenadas a -10 °C, -20 °C y -70

°C y se procedió a determinar el PSA_T de las muestras, como se describió anteriormente. Esta operación se repitió a los 30 días.

Procesamiento de los datos. Luego de recogidos los datos, se almacenaron en una base de datos de Microsoft Access y se procesaron de forma automatizada mediante el procesador estadístico SPSS versión 11.5.1. Se calcularon medias descriptivas y los resultados obtenidos se presentaron en un gráfico para un mejor análisis y comprensión. Para comparar los grupos y ver si cumplían o no la prueba de normalidad a los valores obtenidos, se les realizó previamente un test de Kolmogorov-Smirnov. Como cumplieron la normalidad, se les realizó la prueba de significación estadística análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía para muestras repetidas y, cuando se obtuvieron diferencias significativas, se realizó *a posteriori* la prueba de Dunnet para determinar entre qué pares de grupos existía la diferencia.

RESULTADOS

Estudio de la influencia en el tiempo de las condiciones de almacenamiento, sobre los valores del PSA_T

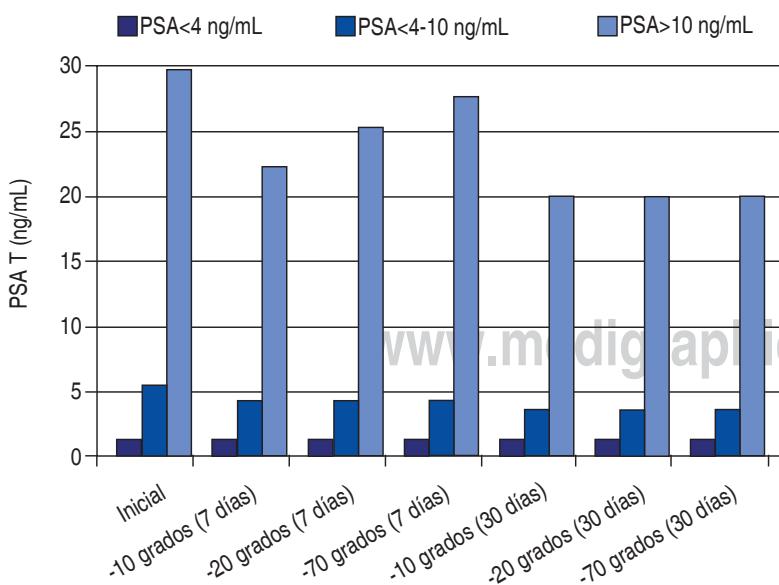
Los individuos incluidos eran vírgenes de tratamiento y con edad comprendida entre 40 y 80 años. El rango de las concentraciones de PSA_T inicial fue 0.18 a 50.04 ng/mL (promedio: 10.168 ng/mL). Estos valores tienden a disminuir ligeramente una semana posterior a la extracción (figura 1). Se observó que la disminución puede ser de 21.88% (a -10 °C), de 11.14% (a -20 °C) y de 7.61%

(a -70 °C), respectivamente; aunque estos valores no muestran diferencias significativas ($p \geq 0.05$, ANOVA).

Cuando se testaron las muestras al mes, las concentraciones del PSA_T disminuyeron un poco más que a la semana (figura 1). La tendencia a disminuir fue de 32.67% (a -10 °C), de 31.45% (a -20 °C) y de 21.47% (a -70 °C), no observándose diferencias significativas ($p \geq 0.05$, ANOVA).

Por ser la determinación de PSA_T vital para adoptar una conducta terapéutica, fue necesario conocer cómo variaban los valores del PSA_T según los rangos de valores predeterminados: Los valores normales (por debajo de los 4 ng/mL), los de rango dudoso (4-10 ng/mL) y los superiores a 10 ng/mL (figura 2). Después de una semana, los valores normales disminuyen respecto al valor inicial entre 1.4-29.5%. Para los de rango dudoso, disminuyen entre 10.24-22.58%; mientras que para los valores superiores a 10 ng/mL, la diferencia estuvo entre 6.67-24.78%. En todos los casos, la mayor diferencia de los valores respecto al PSA inicial fue para el rango de valores entre 4-10 ng/mL almacenados a -10 °C. La menor diferencia fue para los valores menores a los 4 ng/mL almacenados a -70 °C.

Después de un mes, las variaciones se acentuaron para todos los rangos de valores (figura 2). Los valores por debajo de 4 ng/mL se redujeron hasta 38.11% (24.23-38.11%); los de rango dudoso hasta 41.65% (35.76-41.65%) y hasta 33.62% (21.83-33.62) para los valores mayores de 10 ng/mL. La menor variación fue para los menores de 4 ng/mL almacenados a -70 °C.



Se grafican las medias obtenidas de los valores del PSA_T por rango de valores. Para $\text{PSA} < 4 \text{ ng/mL}$ (barras inclinadas a la derecha), $\text{PSA} 4-10 \text{ ng/mL}$ (bloques) y $\text{PSA} > 10 \text{ ng/mL}$ (bolas); al momento del procesamiento (PSA inicial), a los 7 días y a los 30 días. Para las tres temperaturas de almacenamiento, -10; -20; -70 °C. Nótese que los valores más afectados son los del rango de valores superior a los 10 ng/mL, cuya tendencia a disminuir es mayor a los treinta días.

Figura 2. Variación de los rangos de valores de antígeno prostático específico total (PSA_T) según la temperatura de almacenamiento.

y la mayor para el rango de valores entre 4-10 ng/mL almacenados a -10 °C.

DISCUSIÓN

La determinación del antígeno prostático en suero juega un papel crucial para el diagnóstico y el manejo del cáncer de próstata y otras enfermedades prostáticas, así como para predecir la respuesta al tratamiento. En pacientes con enfermedades prostáticas, el nivel absoluto y las variaciones en los niveles de PSA, se usan para trazar estrategias preventivas.¹¹ Estas mediciones se usan para incrementar la sensibilidad y la especificidad de los algoritmos para establecer un diagnóstico. Casi siempre son parte de modelos estadísticos que se usan para predecir la extensión de la enfermedad y la probabilidad de cura ante una cirugía o una terapia con radiaciones o la combinación de éstas.¹² Las pruebas de rutina que se realizan de una a tres veces en el año son una herramienta potente para el clínico, por lo que su exactitud y precisión son primordiales para que funcione todo el mecanismo clínico.

El estudio de la estabilidad del PSA_T en el suero de hombres sanos, así como en pacientes con enfermedades prostáticas y cáncer, es muy importante para realizar guías para la toma de sangre, la separación del suero y el almacenamiento de las muestras a temperaturas idóneas para todos los marcadores, dada la generalización del uso de esta técnica.

Desde la introducción del ensayo para determinar PSA_T en el año 1980, se han realizado un gran número de estudios sobre la estabilidad del PSA.¹³⁻¹⁵ Datos específicos acerca de la estabilidad del PSA_T bajo diferentes condiciones de almacenamiento han sido reportados por varios grupos de investigación.¹⁴⁻²²

Los primeros trabajos estudiaron la estabilidad de la molécula de PSA_T respecto al tiempo transcurrido entre el procesamiento de la muestra de sangre y el almacenamiento del suero. Concluyeron que las muestras de sangre deben ser centrifugadas después de extraídas y el suero analizado inmediatamente o a tan sólo tres horas de extraído éste.^{10,16-18}

Numerosos estudios han examinado la estabilidad de la molécula del PSA_T respecto a la temperatura de almacenamiento a corto y largo plazo.¹⁴⁻²²

Respecto al almacenamiento de las muestras a corto plazo (una a dos semanas), diversos autores observaron valores de PSA_T estables, cuando se almacenan a 4 °C,^{10,18} -20 °C²¹ y -70 °C.^{17,20,22} La presente investigación demostró que las muestras almacenadas a las diferentes temperaturas tienden a perder la inmunorreactividad en

más de 20% cuando se almacenan por cortos períodos de tiempo (una semana) a temperaturas superiores a los -20 °C (figura 1), similar a lo registrado en el estudio de Sokoll y colaboradores;²¹ sin embargo, estas diferencias no son significativas. Estas variaciones son menores, a temperaturas más bajas (-20 °C y -70 °C) (figura 1), lo que es equiparable a lo observado por otros autores.^{17,20,22} Por lo tanto, demuestra que los cambios en la afinidad/disociación, no tienen lugar bajo estas condiciones de trabajo.

El estudio de Woodrum y asociados¹⁷ fue pionero en demostrar que existía estabilidad de los valores de PSA_T en el tiempo a largo plazo, si las muestras de suero se almacenaban a -20 °C y a -70 °C, por dos años. Las muestras almacenadas a -70 °C mostraron valores muy cercanos al valor inicial, por lo que concluyeron que -70 °C era la temperatura ideal para el almacenamiento de las muestras. Resultado que fue corroborado por Scaramuzzino y su grupo²⁰ en años ulteriores y también en la presente investigación.

Otros investigadores, decidieron almacenar las muestras a -20 °C y se observó buena estabilidad de los valores de PSA_T en las muestras almacenadas a esta temperatura por 20 años. Luego de este tiempo, existió una reducción de 40% de los valores iniciales, pero se acepta esta temperatura para almacenar las muestras.²²

Estos estudios demuestran que para almacenar las muestras por largos períodos de tiempo, éstas se deben almacenar a -20 °C o de preferencia a -70 °C.

Nixon y colaboradores²³ demostraron que una variación en los valores del PSA mayor a 25% mostró un cambio significativo en la actividad de la próstata, lo que fue indicativo de la presencia de cáncer. Estos cambios también fueron objeto de otro estudio que incluyó un número mayor de pacientes, donde se concluyó que esta variación puede ser mayor en los enfermos con cáncer que en los individuos sanos.²⁴ Se propuso que existía una asociación entre los niveles de PSA y el volumen de cáncer prostático: a) si su rango de concentración se incrementa en el tiempo, pudiera ser una respuesta del rango de crecimiento tumoral. b) si se incrementa antes del tratamiento, se relacionan con la respuesta a éste. Por lo tanto, la curva dinámica de los valores del PSA puede reflejar el comportamiento del tumor.

Siguiendo esta línea de pensamiento y tomando en cuenta el efecto que tiene la temperatura de almacenamiento sobre la variación intraindividual de los valores del PSA_T, estudiamos el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre cada rango de valor y registramos que existía una mayor variación a la temperatura de almacenamiento, mientras mayor fuera el PSA_T inicial (figura 2). Esto es equiparable con lo analizado por otros

investigadores,^{14,15} en cuyos estudios se observaron grandes diferencias interindividuales en los valores del PSA_T y sobre todo en el PSA_L por el efecto de almacenamiento, siendo los pacientes con carcinoma prostático los más afectados.

CONCLUSIONES

Este trabajo, llevado a cabo para evaluar la estabilidad en el tiempo de la molécula de PSA_T en muestras de pacientes cubanos con enfermedades prostáticas, demuestra que los cambios producidos en la unión/disociación del PSA_T a las diferentes temperaturas de almacenamiento no son significativos cuando se almacenan por una semana. Si el tiempo de almacenaje se prolonga por un mes o más, éste se debe realizar a -70 °C. De esta forma se logra reducir el impacto de la temperatura de almacenamiento sobre la molécula del PSA, en especial en aquellos pacientes con valores de PSA_T entre 4 y 10 ng/mL.

REFERENCIAS

1. Lilja H, Ullmert D, Vickers AJ. Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8: 268-278.
2. Niemela P, Lovgren J, Karp M, Lilja H, Pettersson K. Sensitive and specific enzymatic assay for the determination of precursor forms of prostate specific antigen after an activation step. *Clin Chem.* 2002; 48: 1257-1264.
3. Pironen T, Pettersson K, Suopaa M, Stenman UH et al. *In vitro* stability of free prostate specific antigen (PSA) and prostate specific antigen complexed to α-1 antichymotrypsin in blood samples. *Urology.* 1996; 48: 81-87.
4. Lee R, Localio AR, Armstrong K, Malkowicz SB, Schwartz JS. A meta-analysis of the performance characteristics of the free prostate-specific antigen test. *Urology.* 2006; 67: 762-768.
5. Price CP, Allard J, Davies G, et al. Pre- and post-analytical factors that may influence use of serum prostate specific antigen and its isoforms in a screening programme for prostate cancer. *Ann Clin Biochem.* 2001; 38: 188-216.
6. Bruun L, Bjork T, Lilja H, Becker C, Gustafsson O, Christensson A. Percent-free prostate specific antigen is elevated in men on hemodialysis or peritoneal dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 598-603.
7. Sutcliffe S, Platz EA. Inflammation in the etiology of prostate cancer: An epidemiologic perspective. *Urol Oncol.* 2007; 25: 242-249.
8. Reiter RE, deKernion JB. Epidemiology, etiology, and prevention of prostate cancer. In: Walsh PC et al (eds). *Campbell's Urology.* Philadelphia: Saunders; 2002. p. 3003-3024.
9. Fowke JH, Motley SS, Smith JA Jr, Cookson MS, Concepcion R et al. Association of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, prostate specific antigen and prostate volume. *J Urol.* 2009; 181: 2064-2070.
10. Jung K, Lein M, Brux B et al. Different stability of free and complexed prostate-specific antigen in serum in relation to specimen handling and storage conditions. *Clin Chem Lab Med.* 2000; 38: 1271-1275.
11. Bruun L, Becker Ch, Hugosson J, Lilja H, Christensson A. Assessment of Intra-Individual Variation in Prostate-Specific Antigen Levels in a Biennial Randomized Prostate Cancer Screening Program in Sweden. *Prostate.* 2005; 65 (3): 216-221.
12. Wolf A, Wender RC, Etzioni R, Thompson I, D'Amico A, Volk AJ et al. American Cancer Society Guideline for the Early Detection of Prostate Cancer. Update 2010. *CA Cancer J Clin.* 2010; 60: 70-98.
13. Cartledge JJ, Thompson D, Erril H et al. The stability of free and bound prostate-specific antigen. *BJU Int.* 1999; 84: 810-814.
14. Paus E, Nilsson O, Bormer OP et al. Stability of free and total prostate specific antigen in serum from patients with prostate carcinoma and benign hyperplasia. *J Urol.* 1998; 159: 1599-1605.
15. Arcangeli CG, Smith DS, Ratliff TL et al. Stability of serum total and free prostate specific antigen under varying storage intervals and temperatures. *J Urol.* 1997; 158: 2182-2187.
16. Jung K, V. Klinggräff P, Brux B, Sinha P, Schnorr D, Loening SA. Pre-analytical determinants of total and free prostate-specific antigen and their ratio: blood collection and storage conditions. *Clin Chem.* 1998; 44: 685-688.
17. Woodrum D, York L. Two-year stability of free and total PSA in frozen serum samples. *Urology.* 1998; 39: 2098-2103.
18. Kumari G.R. and Malati T. Stability of Total and Free Prostate Specific Antigen in Serum Samples at Different Storage Conditions. *Indian J Clin Biochem.* 2004; 19 (2): 10-13.
19. Blijenberg BG, Roobol M, Shroder FH et al. Analytical issues on prostate specific antigen in relation to prostate cancer screening. *Clin Biochem.* 1998; 31: 633-639.
20. Scaramuzzino DA, Schulte K, Mack BN, Soriano TF, Fritsche HA. Five year stability study of free and total prostate-specific antigen concentrations in serum specimens collected and stored at -70 degrees C or less. *Int J Biol Markers.* 2007; 22 (3): 206-13.
21. Sokoll L, Bruzek DJ, Dua R et al. Short term stability of molecular forms of prostate specific antigen and effect on percent complexed prostate specific antigen and percent of free prostate specific antigen. *Urology.* 2002; 60: 24-30.
22. Leinonen J, Stenman UH. Reduced stability of prostate-specific antigen after long-term storage of serum at -20 degrees C. *Tumour Biol.* 2000; 21: 46-53.
23. Nixon RG, Wener MH, Smith KM, Parson RE, Blase AB, Brawer MK. Day to day changes in free and total PSA: Significance of biological variation. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 1997; 1: 90-96.
24. Bunting PS, DeBoer G, Choo R, Danjoux C, Klotz L, Fleshner N. Intraindividual variation of PSA, free PSA and complexed PSA in a cohort of patients with prostate cancer managed with watchful observation. *Clin Biochem.* 2002; 35: 471-475.