



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA**

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CHIRURGICHE E
TECNOLOGIE DIAGNOSTICO-TERAPEUTICHE AVANZATE
25° CICLO**

COORDINATORE: PROF. ANDREA RENDA

INDIRIZZO: SCIENZE UROLOGICHE

TESI DI DOTTORATO

**CONFRONTO TRA PROSTATE HEALTH INDEX (PHI) E PROSTATE CANCER
ANTIGEN3 (PCA3) IN PAZIENTI SOTTOPOSTI A PRIMA BIOPSIA PROSTATICA.**

RELATORE

CH.MO PROF. VINCENZO MIRONE

CANDIDATO

DOTT. MATTEO FERRO

ANNO ACCADEMICO 2012/2013

INTRODUZIONE

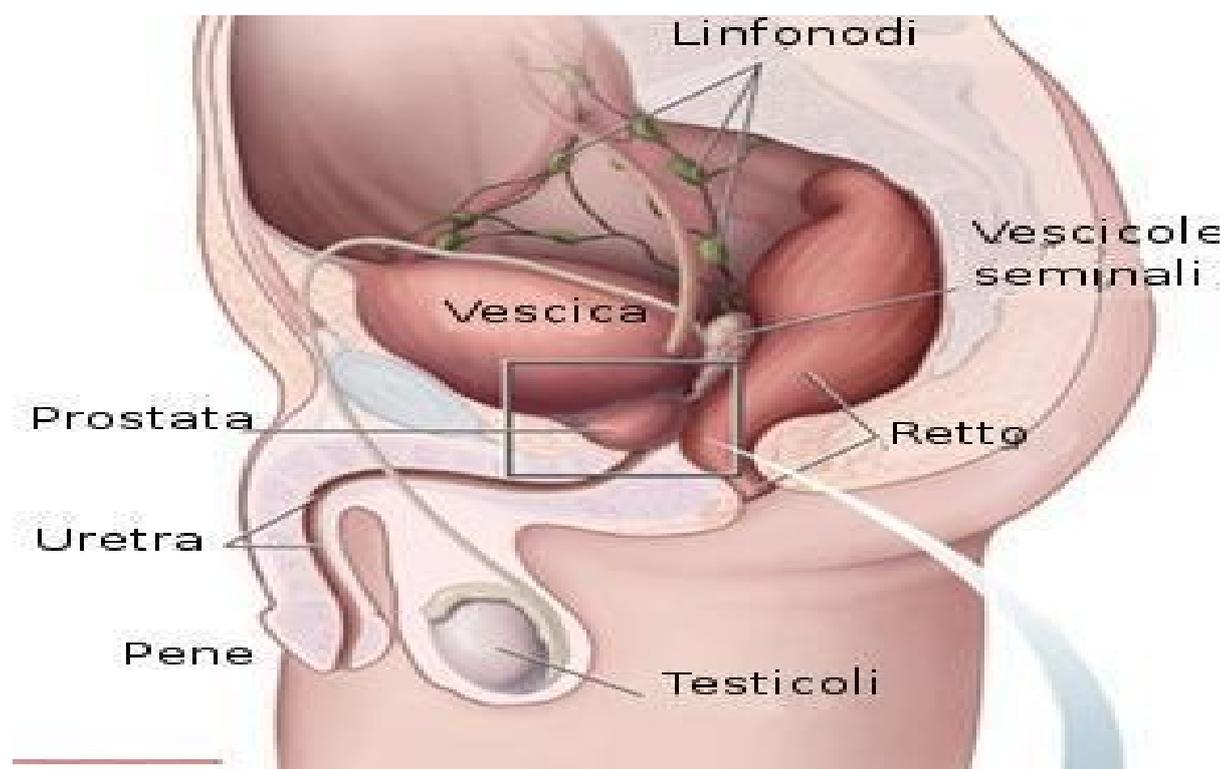
Il carcinoma della prostata (PCa) è nel mondo occidentale la più frequente neoplasia maschile e rappresenta la seconda causa di morte per neoplasia dopo il tumore del polmone (Cookson, 2001). Le cause principali dello sviluppo del cancro prostatico sono probabilmente riconducibili a fattori ambientali e genetici. Il tumore della prostata è tipicamente una malattia degli uomini di età superiore ai 50 anni, essendo il 75% delle diagnosi associato ad individui con età superiore ai 65 anni. A differenza della maggior parte dei tumori, piccoli focolai di cellule tumorali possono essere presenti nella prostata senza che presentino un reale pericolo per la salute del paziente, poiché comprende varietà di forme che vanno da quelle a crescita molto lenta, che possono non dar problemi nell'arco della vita della persona, ad altre che, invece, possono crescere rapidamente, superando i confini della ghiandola e diffondendosi ad altre parti dell'organismo. Circa la metà dei tumori diagnosticati ha una prognosi ed un'evoluzione favorevole. Esiste anche una ben nota correlazione fra l'incidenza di tale neoplasia e differenze etniche e geografiche. Le percentuali più elevate di incidenza e mortalità sono riportate per i maschi afro-americani negli Stati Uniti, mentre quelle più basse si riferiscono a Giappone, Cina ed altri paesi asiatici,

infatti risulta essenzialmente una malattia dei paesi occidentali. Tra i fattori di rischio probabilmente coinvolti nello sviluppo del carcinoma prostatico possono essere annoverati l'obesità ed il peso corporeo, diete ricche di grassi, il fumo di sigaretta, i livelli elevati di androgeni, infatti il cancro della prostata è un tumore androgeno/dipendente poiché i maschi castrati o con ipopituitarismo prima dell'età di 40 anni raramente sviluppano la malattia. Inoltre, la neoplasia è meno frequente in soggetti con malattie croniche epatiche che comportano un aumento di livelli di estrogeni, i quali controbilanciano l'azione degli androgeni testicolari.

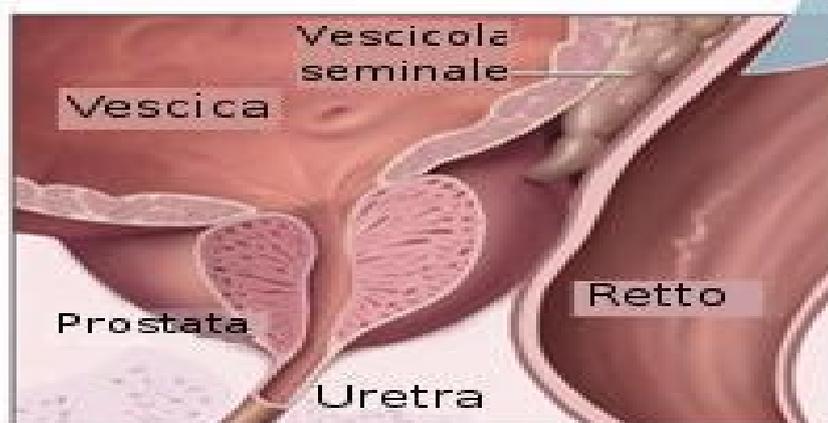
Il cancro della prostata esiste sia in forma sporadica che ereditaria. Il carcinoma prostatico ereditario si riscontra nel 5-10% di tutti i casi di cancro della prostata, ma rappresenta fino al 40% dei tumori prostatici in maschi di età <55 anni. Esso, pertanto, si manifesta in età più precoce rispetto a quello sporadico. Studi su aggregazioni familiari di carcinoma prostatico hanno evidenziato l'esistenza di mutazioni della linea germinale a carico di alcuni geni che conferiscono una predisposizione allo sviluppo della malattia indipendentemente dai fattori ambientali. Sono interessate due regioni indipendenti dei cromosomi I q24-25 (gene HPC-1) e Xq27-28 (gene HPC-2).

Cenni di anatomia e fisiologia della ghiandola prostatica

La prostata è una ghiandola fibromuscolare di forma variabile, nel soggetto normale è piramidale, simile ad una castagna, ma talvolta assume una forma a mezzaluna o in caso di ipertrofia a ciambella.



Qui è mostrata la prostata e gli organi vicini



Qui sono mostrati l'interno della prostata, dell'uretra del retto e della vescica

Ha un diametro trasversale medio di 4 cm alla base, verticalmente è lunga 3 cm e antero-posteriormente circa 2 cm per un peso di 10-20 g nei soggetti normali, che tuttavia può aumentare di svariate volte in caso di IPB (ipertrofia prostatica benigna). Possiede una base, un apice, una faccia anteriore, una faccia posteriore e due facce infero-laterali. La base è appiattita e superiormente in rapporto con il collo della vescica, mentre l'apice è la porzione inferiore della ghiandola e segna il passaggio dalla porzione prostatica a quella membranosa dell'uretra. La faccia anteriore è convessa e collegata con la sinfisi pubica (che gli è anteriore) dai legamenti puboprostatici, ma la ghiandola ne è separata dal plesso venoso del Santorini, posto all'interno della fascia endopelvica, e da uno strato di tessuto connettivo fibroadiposo lassamente adeso alla ghiandola. Dalla faccia anteriore, antero-superiormente rispetto all'apice, e tra il terzo anteriore e quello intermedio della ghiandola, emerge l'uretra. Nella prostata la porzione anteriore è generalmente povera di tessuto ghiandolare e costituita perlopiù da tessuto fibromuscolare. La faccia anteriore e le facce infero-laterali sono ricoperte rispettivamente dalla fascia endopelvica e dalla fascia prostatica laterale su entrambi i lati, che ne rappresenta la continuazione laterale e si continua poi posteriormente andando a costituire la fascia rettale laterale che ricopre le porzioni laterali del retto. Le facce infero-laterali sono in rapporto con il muscolo

elevatore dell'ano e i muscoli laterali della pelvi, da cui sono separati da un sottile strato di tessuto connettivo. La faccia posteriore della prostata è trasversalmente piatta o concava e convessa verticalmente ed è separata dal retto dalla fascia del Denonvilliers, anch'essa continua con le fasce prostatiche laterali, che vi aderisce nella porzione centrale mentre racchiude due fasci neurovascolari postero-lateralmente alla ghiandola. Posteriormente alla fascia del Denonvilliers la prostata è comunque separata dal retto dal tessuto adiposo prerettale contenuto nell'omonimo spazio fasciale. Lo spazio delimitato dalla fascia del Denonvilliers ha come "soffitto" il peritoneo che ricopre la base della vescica. I due condotti eiaculatori entrano postero-medialmente alla faccia posteriore presso due depressioni e poco al di sotto di queste vi è un lieve solco mediano che originariamente divideva la prostata nei lobi laterali destro e sinistro. La prostata è composta anche da tessuto muscolare. Lo sfintere uretrale interno è costituito da fasci circolari di muscolatura liscia posti all'interno della ghiandola, presso la sua base, che si fondono con la muscolatura del collo della vescica. Davanti a questo strato del muscolo scheletrico discende e si fonde con lo sfintere uretrale esterno, posto attorno all'apice della prostata nella loggia perineale profonda. Questa muscolatura è ancorata tramite fibre collagene agli strati fasciali attorno alla prostata che ne costituiscono la sua "capsula" e allo stesso tessuto fibromuscolare della prostata.

Posteriormente alla prostata decorre il muscolo rettouretrale, che origina dalla parete del retto (strato longitudinale esterno) tramite due fasci muscolari che si uniscono per poi andarsi ad inserire nel centro tendineo del perineo. Il tessuto ghiandolare prostatico può essere diviso in tre zone cui si aggiunge, a completare l'organo, lo stroma fibromuscolare anteriore.

- La **zona transizionale** è una zona tondeggianti, costituisce appena il 5% del volume della ghiandola ed avvolge l'uretra preprostatica. È completamente interna alla ghiandola, anteriormente è ricoperta dallo stroma fibromuscolare anteriore, posteriormente è in rapporto con la zona centrale, lateralmente ed inferiormente con la zona periferica ed è appena anteriore ai condotti eiaculatori che si immettono nell'uretra prostatica.
- La **zona centrale** ha la forma di un tronco di cono interno alla ghiandola, ne costituisce il 25% del volume. Anteriormente è in rapporto con la zona transizionale, posteriormente e lateralmente con la zona periferica. È attraversata per tutta la sua lunghezza dai condotti eiaculatori (che decorrono solo in questa porzione del tessuto ghiandolare della prostata) e il suo apice determina la sporgenza del verumontanum. In questa zona, appena sopra la zona transizionale e attorno all'uretra preprostatica vi sono

ghiandole mucose semplici non assimilabili a quelle prostatiche volte alla produzione di liquido seminale.

- La *zona periferica* è la porzione più grande del tessuto ghiandolare, anch'essa a tronco di cono o a coppa, ne costituisce il 70% del volume. Racchiude in parte l'uretra preprostatica e l'uretra prostatica, contiene la zona transizionale, è in rapporto anteriormente e medialmente con la zona centrale e anteriormente con lo stroma fibromuscolare anteriore.
- Lo *stroma fibromuscolare anteriore* costituisce gran parte della porzione anteriore (e della faccia anteriore) della prostata, racchiude la parete antero-superiore dell'uretra preprostatica (la posteriore è compresa nella zona centrale e transizionale, l'antero-inferiore nella transizionale). La sua forma è assimilabile ad un cuneo o ad un cono rovesciato.

Il tessuto ghiandolare della prostata è costituito da un numero variabile da 30 a 50 ghiandole tubuloalveolari ramificate, spesso chiamate anche ghiandole otricolari, immerse in uno stroma fibromuscolare. Lo stroma è più abbondante nella parte anteriore della prostata dove forma lo stroma fibromuscolare anteriore, privo di ghiandole. Esso inoltre costituisce una sottile capsula per l'organo da

cui si dipartono spessi setti incompleti che nella vita fetale lo dividono in cinque lobi, nell'adulto tuttavia i lobi non sono più chiaramente distinguibili. Le ghiandole otricolari sono invece poste, come detto nelle tre zone in cui è suddiviso il tessuto ghiandolare prostatico. Ciascuna ghiandola otricolare è costituita da numerosi acini provvisti di papille, che riversano il loro secreto in piccoli condotti che si uniscono a formare un dotto per ciascuna ghiandola, per un totale di 12-20 dotti. Ognuno di essi decorre all'interno del parenchima sino a raggiungere l'uretra prostatica dove sbocca lateralmente al collicolo seminale. Le due depressioni che fiancheggiano il collicolo seminale nell'uretra prostatica sono dette seni prostatici ed è qui che si aprono tutti i dotti della ghiandola. I dotti variano in lunghezza a seconda della collocazione delle ghiandole, i più lunghi sono quelli posti nella zona periferica che possiede anche le ghiandole dalla struttura più complessa, i più corti nella zona transizionale che possiede ghiandole semplici e ghiandole mucose. Le ghiandole mucose sono più facilmente riscontrabili in soggetti giovani, dato che tendono a scomparire con l'età. Gli acini sono costituiti da epitelio cilindrico, semplice o pseudostratificato con una certa variabilità, sono avvolti da un plesso di capillari ed è di frequente riscontro trovarvi i corpi amilacei, aggregati di colloide. Le cellule che compongono gli acini hanno grossi nuclei basali rotondi e

un citoplasma debolmente colorabile in EE, sono spesso riscontrabili vescicole secretorie nella porzione apicale. Inframmezzate alle cellule secernenti sono state individuate cellule neuroendocrine che contengono enolasi neurone-specifica, cromogranina e serotonina e la cui funzione è sconosciuta. Alla base delle ghiandole sono inoltre riscontrabili alcune cellule epiteliali piatte che costituiscono gli elementi staminali della prostata. I piccoli dotti che si dipartono dagli acini sono rivestiti da un singolo strato di cellule epiteliali, mentre i dotti prostatici in cui confluiscono possiedono una parete formata da un doppio strato di cellule, costituito nella porzione basale da cellule cubiche, in quella luminale da cellule cilindriche.

Carcinoma prostatico

Sebbene sia chiaro che il carcinoma della prostata origini dal compartimento epiteliale, l'identificazione dello specifico sottotipo cellulare (androgeno dipendente, sensibile o indipendente) da cui origina il carcinoma non è ancora chiaro. L'adenocarcinoma acinare rappresenta l'istotipo più frequente tra le neoplasie prostatiche. Il modello tutt'oggi accettato è che in una delle popolazioni epiteliali (cellule staminali basali, cellule di transizione o cellule luminali) una cellula perda il controllo del proprio tasso di crescita originando un clone in attiva divisione che forma una lesione prostatica intraepiteliale (PIN). L'atrofia infiammatoria prostatica (PIA) viene considerata uno stadio precursore del PIN essendo solitamente osservata nella regione periferica della ghiandola prostatica in cui hanno origine la maggior parte dei carcinomi prostatici, e presenta un'instabilità cromosomica molto simile a quella osservata nel PIN e nelle cellule di carcinoma prostatico (Nelson *et al.*, 2003). Con l'accumulo di alterazioni geniche sempre maggiori, il PIN può accrescersi, diventando sempre più maligno fino a trasformarsi in un carcinoma vero e proprio (adenocarcinoma prostatico). Negli stadi iniziali il tumore prostatico è confinato alla ghiandola ed essendo, generalmente, caratterizzato da cellule a crescita molto lenta (Berges *et*

al., 1995), può restare asintomatico e non diagnosticato per anni. Successivamente, l'acquisita capacità migratoria delle cellule tumorali consente la loro diffusione anche in altre parti del corpo, portando alla formazione di metastasi soprattutto a livello linfonodale ed osseo, con tipico interessamento della colonna lombare.

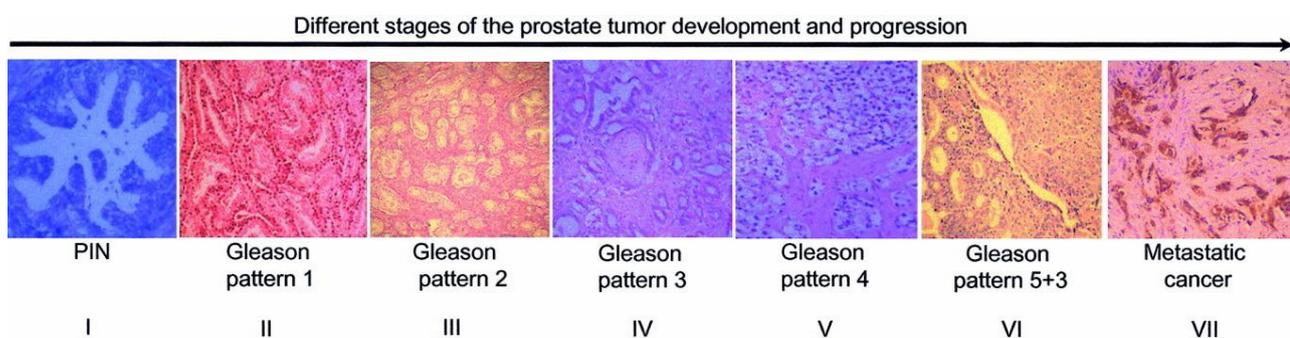


figura 3. Stadi evolutivi di un carcinoma prostatico.

Pannello I: lesione intraepiteliale (PIN) di alto grado. Dal pannello II al pannello VI sono mostrati tumori ben differenziati con grado di malignità (Gleason pattern) sempre più elevato; si noti che con il progredire del tumore si perde sempre di più la distinzione tra i dotti e si osserva una fusione delle strutture ghiandolari. Pannello VII: carcinoma prostatico con metastasi alle ossa. (Le sezioni istologiche sono colorate con ematossilina-eosina).

La caratteristica principale dello sviluppo del carcinoma prostatico è rappresentato dalla progressione dallo stadio iniziale di crescita dipendente dagli androgeni (androgenodipendenza) a quello avanzato, oramai irreversibile, di refrattarietà ormonale (androgeno indipendenza). Sebbene negli ultimi anni la ricerca scientifica abbia prodotto un notevole sforzo nel tentativo di individuare le basi genetiche coinvolte in questo tipo di transizione, il meccanismo molecolare rimane ancora

scarsamente conosciuto. Il recettore degli androgeni (AR) riveste sicuramente un ruolo fondamentale nella progressione del carcinoma prostatico, essendo la sua attivazione essenziale per le fasi iniziali della crescita tumorale. Infatti, inizialmente, la terapia ormonale basata sulla deprivazione dagli androgeni, attraverso castrazione chirurgica o chimica, produce una sensibile regressione del tumore causata dall'induzione dell'apoptosi nelle cellule ormone-responsive.

Sfortunatamente però la terapia ormonale diventa inefficace e la regressione del tumore quindi solo transiente, quando, inevitabilmente, le cellule neoplastiche iniziano a dividersi in modo indipendente dall'azione degli androgeni.

Nella fase iniziale, il carcinoma prostatico è in genere asintomatico. Col progredire della malattia, i sintomi più frequenti sono in rapporto all'ostruzione uretrale (pollachiuria, nicturia, disuria, diminuzione della potenza del getto urinario) e del tutto simili a quelli della ipertrofia prostatica benigna. Altri sintomi legati alla progressione locale del tumore sono: ematospermia, dolore perineale e alterazioni della funzione erettile. L'ematuria è presente in meno del 15% dei casi, mentre la ritenzione acuta d'urine è, ormai, raramente annoverata fra i sintomi d'esordio del carcinoma prostatico. Sintomi di malattia sistemica, quali perdita di peso ed astenia, interessano non più del 10% dei pazienti

Iter diagnostico

La Società Oncologica Americana raccomanda a tutti gli uomini di età compresa tra i 50 e i 70 anni di sottoporsi annualmente a DRE (Esplorazione Digito-Rettale) della prostata e ad una determinazione del PSA sierico; e tale raccomandazione viene estesa agli uomini al di sopra dei 40 anni se di razza nera o se vi è una storia familiare di tumore prostatico.

La diagnosi di carcinoma prostatico si basa essenzialmente sulle seguenti indagini:

- Esplorazione digito-rettale (DRE)
- Dosaggio del PSA
- Ecografia transrettale (TRUS)
- Agobiopsia prostatica

Esplorazione digito-rettale: rappresenta il primo approccio obiettivo del paziente con disturbi menzionali riferibili alla prostata. Considerando che il 70/80% dei carcinomi insorgono a livello della regione periferica della ghiandola è chiaro come questi possano essere individuati con questa semplice manovra. Con la DRE si apprezza la consistenza, la configurazione della prostata, la persistenza del suo solco mediano, la

simmetria fra i due lobi, la dolorabilità della ghiandola e l'eventuale presenza di un nodulo di indurimento o di diversa consistenza ghiandolare. Del nodulo si possono definire i contorni e, soprattutto, una sua estensione extracapsulare. Di solito, in presenza di tumore la prostata risulta indurita e nodosa, mentre in presenza di iperplasia prostatica benigna è ingrossata, soda e liscia. In alcuni casi potrebbe risultare normale alla palpazione, nonostante la presenza di un tumore.

Test del PSA: Il PSA è una glicoproteina con attività serino-proteasica callicreino-simile, presente nel citoplasma delle cellule epiteliali prostatiche, sia normali sia maligne la cui funzione è quella di fluidificare il liquido seminale nel momento dell'eiaculazione. I suoi livelli possono essere facilmente dosati con metodo radioimmunologico: essi rispecchiano fedelmente l'attività della ghiandola prostatica. Possiamo quindi affermare che il PSA è un marker organo specifico, ma non tumore specifico, poiché può risultare alterato anche in caso di prostatiti, IPB e manipolazione sull'organo.

E' però importante valutare il livello dell'aumento: solitamente un valore superiore a 10 ng/ml è fortemente suggestivo di neoplasia.

Ponendo il cutpoint del PSA a 4 ng/ml si ottiene una sensibilità dell'86% ed una specificità del 33%, il che significa che solo una persona su tre,

tra i pazienti risultati positivi, sarà realmente affetta da tumore prostatico.

E' quindi da considerare la possibile presenza di un elevato numero di falsi positivi, che può portare al rischio di overdiagnosi e ad un eccessivo ricorso alla biopsia, che rimane tuttavia un punto fondamentale nel percorso diagnostico, non esistendo ancora un marker ideale per il tumore prostatico. Per aumentare la sensibilità del PSA si può affiancare al dosaggio totale la valutazione del PSA "free", ovvero della quota di glicoproteina non legata, che aumenta maggiormente nelle lesioni benigne piuttosto che nel cancro, e del PSA ratio (PSA free/PSA tot).

Il PSA che viene misurato dai dosaggi attualmente in commercio comprende sia le forme libere o non complessate (fPSA), che quelle legate in un complesso con l'alpha-1-antichimotripsina (ACT) e dette PSA complessato (cPSA), che rappresenta dal 70 al 95% del PSA totale (tPSA) misurabile nel siero. Il PSA forma complessi anche con l'alpha-2-macroglobulina, ma questa forma non è rivelabile dagli immunodosaggi, perché la proteina avvolge completamente il PSA, mascherando tutti i siti di attacco per gli anticorpi monoclonali. Le forme libere di PSA possono includere PSA maturi, inattivi e varie forme di PSA diversamente legati, così come precursori o zimogeni.

In pazienti con tPSA moderatamente elevato, soprattutto tra 4 e 10 ng/mL, il rapporto percentuale tra il fPSA e il tPSA nel siero (f/tPSA) si

è dimostrato migliorare significativamente la discriminazione tra PCa e ipertrofia prostatica benigna (BPH), con rapporti più elevati correlanti con un basso rischio di PCa, mentre valori di f/tPSA al di sotto del 10% sono altamente associati a PCa.

Il tPSA è caratterizzato da una ridotta specificità per l'identificazione precoce del PCa a concentrazioni inferiori a 10 ng/mL, perché anche i pazienti con BPH o con patologie infiammatorie della ghiandola prostatica (prostatiti) possono presentare valori sovrapponibili. Si è stimato che il 30-45% degli uomini con tPSA tra 4 e 10 ng/mL e il 20-30% di quelli con tPSA tra 2 e 4 ng/mL sono portatori di un PCa. L'utilizzo del f/tPSA è meno efficace dell'atteso nel discriminare tra cancro e malattia benigna, soprattutto nell'intervallo di tPSA tra 2 e 4 ng/mL.

Rischio di tumore prostatico in relazione al livello di PSA

PSA ≤ 4,0 ng/ml	5%
PSA compreso tra 4,1 ng/ml e 9,9 ng/ml	25%
PSA ≥ 10 ng/ml	55%

Per aumentare l'efficienza diagnostica del marcatore sono state proposte

diverse alternative. Per migliorare la specificità del PSA viene utilizzato ad esempio il rapporto tra il PSA in ng/ml e il peso della prostata:

PSAD (density) sospetto se > 0.15 ng/ml/gr

È il limite accettato dagli urologi per condizionare la selezione o meno di pazienti da inviare alla biopsia.

In un paziente con valori di PSA dubbi è possibile studiare la velocità di aumento del PSA in un anno, particolarmente rapido nei pazienti con Carcinoma prostatico:

PSAV (velocity) sospetto se > 0.75 ng/ml/anno

Ecografia transrettale E' la metodica elettiva per la diagnosi di carcinoma prostatico; può essere fastidiosa ma non dolorosa, è di breve durata e fornisce informazioni essenziali. La prostata è facilmente visualizzabile inserendo per via rettale una sonda endocavitaria, che permette uno studio anatomico e strutturale dettagliato. Con gli apparecchi di ultima generazione e con sonde adeguate si possono evidenziare tumori anche di pochi millimetri. Studi statistici hanno rilevato che circa il 70% dei carcinomi sono localizzati nella zona periferica per lo più posteriore e si presentano come aree ipoecogene (più

scure) rispetto alla restante struttura della ghiandola. Esiste una certa percentuale di carcinomi (25-30%) che hanno una struttura molto simile a quella della prostata (isoecogeni) e che quindi non sono facilmente evidenziabili con la sola ecografia pelvica. Negli stadi più avanzati le aree di neoplasia tendono ad essere iperecogene (più chiare) rispetto alla ghiandola, per verosimile aumento della componente fibrosa. Parametro importante per ipotizzare la presenza di carcinoma è la **dimensione della lesione** : se essa ha un diametro compreso tra 1 e 10 millimetri si ha una probabilità di circa il 20% che si tratti di tumore; questa sale al 40% se il diametro è compreso fra 11 e 15 millimetri. Per le lesioni che presentano dimensioni maggiori la probabilità sale all'80%. L'ecografia permette di valutare l'interessamento capsulare e/o delle vescicole seminali, importanti elementi prognostici.

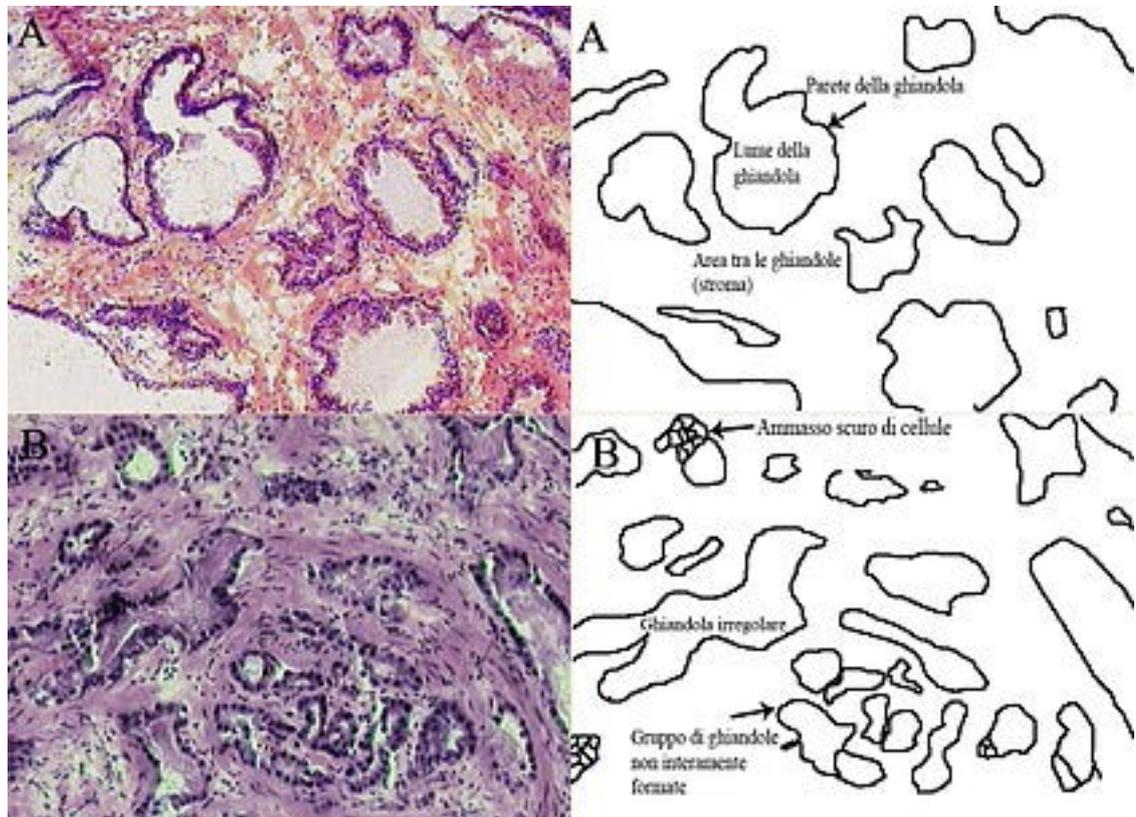
Agobiopsia Quando si sospetta un carcinoma prostatico, o un esame di screening è indicativo di un rischio aumentato, si prospetta una valutazione più invasiva. L'unico esame in grado di confermare pienamente la diagnosi è la biopsia, ossia l'asportazione di piccoli frammenti di tessuto per l'esame al microscopio. Tuttavia, prima che alla biopsia, si può ricorrere a metodiche meno invasive per raccogliere informazioni riguardo alla prostata e al tratto urinario: la cistoscopia

mostra il tratto urinario a partire dall'interno della vescica usando un piccolo endoscopio inserito nell'uretra. Una volta assunto l'atteggiamento corporeo suggerito dal medico, l'urologo esegue una preventiva esplorazione digitale del retto e della prostata. Accertata in tal modo l'assenza di controindicazioni, viene inserita nell'ano una sonda ecografica ben lubrificata, che risalendo il retto permette di visualizzare la prostata sull'apposito schermo. A tal proposito lo strumento utilizza un fascio di onde sonore, valutando il conseguente grado di riflessione dei tessuti; non esiste quindi alcun pericolo legato a radiazioni ionizzanti.

Attraverso la via aperta dalla sonda, con l'ausilio delle immagini ecografiche, il medico inietta una piccola dose di anestetico (lidocaina) in prossimità della prostata, lasciando poi agire il farmaco per qualche minuto. Sfruttando un apposito ago da biopsia e le immagini ecografiche, il medico preleva mediamente 8/16 frammenti di prostata, in relazione alle dimensioni della stessa, ai risultati di precedenti biopsie e all'eventuale sospetto clinico dato dall'esplorazione rettale. Nel frattempo, la sonda ecografica consente all'urologo di monitorare continuamente le aree prostatiche raggiunte dall'ago.

I campioni di tessuto vengono quindi esaminati al microscopio per determinare la presenza di tumore, valutarne gli aspetti istomorfologici (gradind secondo il Gleason score system). In genere le biopsie

prostatiche vengono eseguite ambulatorialmente e di rado richiedono l'ospedalizzazione. Il 55% degli uomini riferisce malessere durante la procedura.



Nel carcinoma prostatico, la normale struttura ghiandolare viene sostituita da formazioni irregolari e ammassi di cellule.

PHI: Prostate Health Index

Il precursore del PSA libero, definito proPSA e' associato al tessuto canceroso prostatico, infatti risulta aumentato nel siero di pazienti con PCa.

Esistono forme di proPSA costituite da peptidi nativi tronchi che contengono 2,4 o 5 aminoacidi identificati rispettivamente con i termini [-2]proPSA, [-4]proPSA, e [-5]proPSA, e il peptide nativo di 7 aminoacidi [-7]proPSA.(4). Esiste anche un'altra isoforma del PSA libero, chiamata PSA benigno, *benign-PSA*, BPSA, la cui concentrazione, confrontata con quella presente nel tessuto della zona periferica della ghiandola, è aumentata nel tessuto della zona di transizione con BPH nodulare. (5)

L'isoforma [-2]proPSA e' quella che ha ricevuto le maggiori attenzioni da quando è stata trovata in estratti tumorali, e mostra la piu' intensa colorazione istologica nel PCa rispetto al tessuto benigno. In vitro, inoltre, il [-2]proPSA è la piu' stabile delle cinque forme identificate di proPSA.

Beckman Coulter Inc. ha sviluppato in un primo tempo un metodo ELISA semi automatico, e recentemente il dosaggio Access Hybritech p2PSA (p2PSA), per misurare il [-2]proPSA nel siero.

In uno studio su uomini con PCa confermato da biopsia, pubblicato da Steven Mikolajczyk nel 2004, si è evidenziato che il [-2]proPSA migliora la specificità per il rilevamento del cancro nell'intervallo di tPSA tra 4 e 10 ng/mL, rispetto al solo f/tPSA(19). L'utilità del [-2]proPSA in uomini con valori di tPSA inferiori a 4.0 ng/mL è di particolare interesse visto che si sono trovati molti pazienti portatori di PCa con questi valori.

Il test automatizzato p2PSA è un dosaggio immunoenzimatico del tipo a *sandwich* a due siti, che impiega anticorpi monoclonali di topo anti-PSA coniugati alla fosfatasi alcalina, particelle paramagnetiche rivestite con un anticorpo monoclonale di topo anti [-2]proPSA, e un agente bloccante.

Il [-2]proPSA nel campione si lega all'anticorpo monoclonale anti[-2]proPSA immobilizzato, mentre l'anticorpo monoclonale coniugato anti-PSA-fosfatasi alcalina si lega a differenti epitopi sulla molecola del [-2]proPSA. (6). Dopo incubazione in una cuvetta di reazione, le componenti legate alla fase solida sono trattenute tramite l'azione di un campo magnetico, mentre le componenti non legate sono eliminate tramite lavaggio. Infine, viene aggiunto alla cuvetta di reazione il substrato chemiluminescente Lumi- Phos 530 e si genera un segnale luminoso direttamente proporzionale alla concentrazione di [-2]proPSA

del campione La concentrazione di analita nel campione è determinata utilizzando come riferimento una curva di calibrazione a sette punti.

I campioni di siero contenenti concentrazioni di emoglobina fino a 500 mg/dL, bilirubina fino a 20 mg/dL, trigliceridi fino a 1500 mg/dL e proteine totali fino a 6.2 g/dL non presentano interferenze con il dosaggio p2PSA.

I risultati pubblicati in letteratura supportano la conclusione che i precursori del PSA stiano emergendo come marcatori serici diagnostici potenzialmente importanti per incrementare la specificità del tPSA e migliorare l'identificazione del PCa proprio in quei pazienti in cui i valori di PSA rimangono sospetti.

Per migliorare la prestazione clinica, i valori di tPSA, fPSA e p2PSA vengono inseriti in una formula matematica per ottenere il Prostate Health Index (phi).

Il phi è calcolato secondo la relazione:

$$phi = (p2PSA/fPSA) * \sqrt{tPSA}$$

L'indice phi viene calcolato automaticamente dagli analizzatori Access2 e Dxl.

Il test Access Hybritech p2PSA deve essere impiegato unicamente con Access Hybritech PSA e Access Hybritech free PSA per calcolare l'Beckman Coulter *phi* (prostate health index - indice di salute della prostata)

Il gene PCA3

Il PCA3 (mRNA del gene 3 del cancro della prostata o DD3) è un mRNA specifico del tessuto prostatico che viene iper-espresso nelle cellule tumorali della prostata con l' aumento medio di circa 66 volte superiore rispetto al tessuto benigno adiacente (12); mentre l'espressione dell'mRNA del gene KLK che codifica per il PSA rimane invariata nelle cellule normali benigne ed in quelle cancerose.

Questa caratteristica espressione differente tra PCA3 e PSA viene usata per standardizzare e normalizzare la quantità (concentrazione) di RNA specifico della prostata utilizzata per il test molecolare. Gli mRNA vengono estratti e quantificati dalle cellule prostatiche contenute nelle urine dopo massaggio prostatico mediante reazione di retr trascrizione inversa (cDNA) e successiva amplificazione Real Time PCR con primers e sonde (TaqMan probe) altamente specifici e selettivi; il risultato quantitativo espresso in copie/ml si ottiene interpolando i valori di fluorescenza ottenuti dai campioni su una curva di calibrazione costruita su 5 punti durante la stessa reazione con dei calibratori a concentrazioni note di RNA. Il valore quantitativo risultante dal test sia per l'mRNA di PCA3 che per l'mRNA di PSA viene rapportato per normalizzare il risultato e il rapporto risultante viene confrontato su una tabella di

valutazione del rischio, che stabilisce la probabilità di trovare una successiva biopsia prostatica positiva. Il dato è rafforzato dall'evidenza che l'espressione del mRNA di PCA3 è indipendente dal volume della prostata, dal livello circolare di PSA e dal numero di biopsie già eseguite precedentemente. Inoltre l'mRNA di PCA3 è praticamente non espresso nelle cellule della maggior parte dei tessuti.(17).

Il PCA3 score viene calcolato come il rapporto tra il numero di copie mRNA di PCA3 ed il numero di copie di mRNA KLK3 (PSA) moltiplicato per 1000. Se il PCA3 score riportato si trova al di sotto del valore soglia il risultato va interpretato come negativo; se il PCA3 score è al di sopra del valore soglia o equivalente ad esso, il risultato va interpretato come positivo. Se il PCA3 score è basso, la biopsia può essere rinviata o addirittura evitata. In questo modo, il PCA3 test aiuta ad evitare molte biopsie non necessarie e i conseguenti potenziali disagi e complicazioni, dolore, sanguinamento ed infezioni per i soggetti interessati.

SCOPO DEL LAVORO

Obiettivo principale di questo studio è stato quello di confrontare la capacità dell' Indice PHI $[(p2PSA/fPSA) \times \sqrt{tPSA}]$ di Beckman Coulter e del PCA3 score $[(mRNA\ PCA3/mRNA\ PSA) \times 1000]$ nel discriminare tra soggetti con PCa e soggetti con patologie prostatiche benigne.

MATERIALI E METODI

Popolazione di studio

Il presente studio prospettico è stato effettuato tra marzo e dicembre 2010 su un campione di 290 soggetti di sesso maschile arruolati presso il centro oncologico IRCCS Fondazione G. Pascale, Napoli, Italia

Tra questi, 151 presentavano i criteri di ammissibilità allo studio.:

- età superiore ai 50anni,
- assenza di intervento chirurgico alla prostata e precedente biopsia,
- Assenza di prostatite batterica acuta o cronica
- Non aver assunto negli ultimi 6 mesi *5 alfa reduttasi*
- Valori di PSA compresi tra 2 – 20 ng/ml
- DRE negativa
- Disponibilità di campioni di siero e urine di soggetti di cui erano disponibili i dati clinici.

Campioni e analisi di laboratorio

Sono stati effettuati prelievi di sangue ai soggetti arruolati. Dopo coagulazione e centrifugazione è stato separato il siero; aliquote di siero sono state conservate

a -80°C fino a quando i campioni sono stati trattati, secondo quanto suggerito da Semjonow et al .

I campioni di sangue sono stati analizzati in cieco e sono stati dosati - con un analizzatore immunoenzimatico *System Access 2* (Beckman Coulter Brea, CA, USA) - il PSA, il fPSA e p2PSA, e l'indice phi calcolato automaticamente dagli analizzatori Access2 e Dx1.

I campioni di urina sono stati raccolti in seguito ad una attenta esplorazione digito-rettale come descritto da Grospkopf et al ed analizzati con *PROGENSA PCA3* test (Gen-Probe, San Diego, CA,USA) per testare e quantificare PCA3-mRNA e PSA-mRNA. Il valore di PCA3 è stato calcolato come risultato del rapporto di PCA3-mRNA su PSA-mRNA x 1000.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad una ecografia trans rettale (TRUS) e ad una biopsia prostatica, con la quale sono stati prelevati almeno 16/18 frammenti prostatici ed è stato assegnato da un patologo genito-urinario il punteggio di Gleason. Sono stati identificati sia il pattern

principale (predominante) sia il secondario (secondo più comune) ed assegnato un punteggio da 1 a 5, indicando con 1 l'aspetto più differenziato e con 5 quello meno differenziato.

Dall'analisi delle biopsie prostatiche i pazienti sono stati divisi in tre gruppi, soggetti con PCa, soggetti senza PCa e soggetti che presentavano lesioni preneoplastiche, cioè affetti da neoplasia intraepiteliale prostatica di grado elevato (HGPIIN, High Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia) e proliferazione microacinare atipica (ASAP, Atypical Small Acinar Proliferation).

Analisi statistica

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite usando un software R di calcolo statistico (vers. 2.12.1; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). I dati per le variabili continue sono riassunti come la mediana con range IQ (Interquartile). I risultati sono espressi come mediana [Min - Max] per le variabili numeriche e come percentuali per i fattori categoriali.

E' stato utilizzato il *test di Kruskal-Wallis*, per verificare l'uguaglianza delle mediane dei tre diversi gruppi (no PCa, HGPIIN/ASAP, e PCa),

l'analisi univariata per le variabili quantitative è stata basata sul test U di Mann-Whitney non parametrico.

La validità diagnostica dei differenti biomarcatori è stata valutata mediante l'analisi della curva ROC. L'accuratezza diagnostica è stata misurata utilizzando l'area sotto la curva ROC (AUC).

RISULTATI

Nel presente studio sono stati arruolati 151 pazienti che rientravano nei criteri di inclusione.

Le caratteristiche demografiche e cliniche della popolazione del nostro studio, formata da 151 pazienti, sono riportate nella tabella 1. Dalla biopsia prostatica si è visto che il 32% dei pazienti presentavano PCa e il 24% lesioni precancerose. L'età media dei soggetti era di $64,9 \pm 7,3$ anni e non sono state riscontrate differenze significative per l'età dei pazienti e per il volume prostatico nei soggetti con cancro prostatico, lesioni precancerose o malattie prostatiche benigne. Mentre i valori di %p2PSA e phi erano significativamente più alti nei pazienti con PCa rispetto ai soggetti con patologie benigne (valori mediani: rispettivamente 1.86 vs 1.45 e 53.38 vs 36.21, $p < 0.001$) ed anche rispetto alle lesioni precancerose (valori mediani: rispettivamente 1.86 vs 1.64 e 53.38 vs 36.82, $p < 0.001$) (Tabella 2) (Figura 1 A-B).

I valori di FPSA% sono risultati significativamente più bassi nei pazienti con PCa rispetto ai pazienti con patologia benigna e lesioni preneoplastiche (valori mediani: 15,4 contro 19,36 e 15,4 contro 22,23, $p = 0,004$ e $p < 0,001$, rispettivamente) (Figura 1C).

I valori di PCA3 score erano significativamente più alti nei pazienti con PCa rispetto a quelli con patologia benigna (valori mediani: 57 vs 28, $p < 0,001$) e con lesioni preneoplastiche rispetto ai pazienti con malattia prostatica benigna (valori mediani: 54.5 vs 28, $p < 0,001$) (Figura 1D).

A differenza del phi, il PCA3 score dei pazienti con PCa non era significativamente diverso dai soggetti affetti lesioni precancerose.

Nell'analisi delle curve ROC e utilizzando come parametro di valutazione l'area sotto la curva ROC (AUC), si denota che p2PSA%, phi e PCA3 sono buoni indicatori di malignità (AUC = 0.73, 0,77 e 0,71, rispettivamente) e che phi con AUC = 0.77 ha le migliori prestazioni rispetto a tutti i parametri studiati.

Al contrario differenze significative in AUC sono state trovate tra phi e FPSA e p2PSA ($p = 0,006$ e $p < 0,001$, rispettivamente) e tra il PCA3 e FPSA ($p = 0,036$). Anche p2PSA% ha mostrato una migliore performance discriminatoria nei confronti di entrambi i FPSA ($p = 0,011$) e p2PSA% ($p = 0.009$) (Fig.2).

Come mostrato nella tabella 3 il cut-off ottimale del phi è 38,7 , corrispondente al 85% di sensibilità e al 61% di specificità; mentre il cut-off ottimale per PCA3 è 32,5 corrispondente al 81% di sensibilità e 57% di specificità. Per raggiungere il 90 % di specificità il cut-off è 63,5 per il phi e 86 per il PCA3, ma questo diminuisce la sensibilità al 36% e al 32% rispettivamente. Una specificità del 80%, è associata ad un valore

cut-off di 50,2 per phi e 73 per PCA3, corrispondente ad una sensibilità del 60% e 43% rispettivamente.

Dall'analisi multivariata non abbiamo riscontrato miglioramenti nella performance dei singoli marcatori.

Nella tabella 4 abbiamo messo in relazione il Gleason score attribuito alle biopsie prostatiche con i vari parametri dosati. Il 43.75 % dei pazienti presentavano un valore di Gleason <7 e il 56.27 % un valore di Gleason >7; i valori di PSA, p2PSA, %p2PSA, phi e PCA3 sono significativamente piu' alti nei pazienti con punteggio di Gleason >7 al contrario dei valori del fPSA% significativamente piu' bassi.

L'analisi della curva ROC (Fig. 3) ha mostrato un AUC per phi di 0,82 (p <0,001) che è la piu' alta di tutte le variabili analizzate, ma questa differenza è statisticamente significativa solo rispetto al fPSA e al p2PSA

DISCUSSIONE

Si pensa che il PSA come test diagnostico di prima linea lasci molto a desiderare. E' stato proposto che il PSA possa essere migliorato con l'utilizzo di altri biomarkers come phi index e PCA3 score (15,16). Recenti studi hanno dimostrato che p2PSA% e Phi hanno un maggiore valore predittivo del carcinoma prostatico rispetto ai test attualmente in uso (tPSA, fPSA e PSAD) in pazienti con tPSA tra 2 e 10 ng/ml. E' stata riconosciuta l'utilità diagnostica dei livelli di PCA3 urinari per predire il cancro nelle biopsie ripetute. Alcuni autori hanno confrontato i valori di PCA3 con quelli del PSA come test diagnostico di prima linea e con quelli di f/tPSA come strumento in grado di migliorare la specificità del PSA. In particolare, Roobol et al (19) hanno scoperto che le performance diagnostiche di PCA3 erano leggermente migliori di quelli del PSA, ma la differenza non era statisticamente significativa. Ploussard et al hanno riportato che un alto PCA3 score è un buon indicatore di biopsia positiva soprattutto nel gruppo di pazienti con un rapporto f PSA/tPSA > 10%. Inoltre gli autori hanno notato che il PCA3 non era associato con il volume della prostata, l'età o lo stadio, al contrario di PSA e del rapporto f/t PSA, rendendo PCA3 un indicatore diagnostico potenzialmente più accurato del PSA e delle sue forme molecolari. La

letteratura, nel complesso, è concorde circa la maggiore specificità e sensibilità leggermente inferiore di PCA3 rispetto al PSA e al rapporto f/t PSA, suggerendo che il PCA3 potrebbe essere un buon marcatore complementare al PSA.

Ad oggi, un confronto diretto tra phi e PCA3 non è disponibile, ma potrebbe essere interessante al fine di stabilire:

a) qual' è il miglior test come indicatore per la biopsia e b) se la combinazione dei due biomarkers migliora il rilevamento dei PCa positivi.

In questo studio abbiamo esaminato le prestazioni diagnostiche e prognostiche di fPSA, p2PSA, Phi e PCA3 nel range di tPSA 2 – 20 ng/ml. Abbiamo scoperto che p2PSA %, phi e PCA3 erano piu' elevati e fPSA% era inferiore nel cancro rispetto alla condizione non tumorale. Inoltre, l'analisi statistica ha indicato che Phi, come p2PSA% e fPSA% a differenza del PCA3, erano significativamente piu' elevati nelle lesioni preneoplastiche che nel cancro. L'analisi delle curve ROC ha mostrato che p2PSA%, Phi e PCA3 sono preferibili a fPSA% , fPSA e p2PSA. Inoltre le AUC di questi biomarkers non erano significativamente diverse.

Nella nostra popolazione di studio, phi e PCA3 sono stati efficaci per identificare i tumori ad alto grado. Questi risultati concordano con gli studi che hanno dimostrato l'associazione di phi e PCA3 con Gleason

score. Fino ad oggi, questo è il primo confronto del valore prognostico dei due biomarkers e non ha mostrato alcuna differenza significativa.

Presi insieme, questi dati suggeriscono che:

- a) %p2PSA, Phi e PCA3 hanno la capacità di individuare una biopsia positiva, meglio del fPSA%;
- b) alti valori di PCA3 score, a differenza di fPSA%, %p2PSA e phi, non è utile a discriminare tra le lesioni preneoplastiche e tumori, ,a tra le condizioni preneoplastiche da quelle benigne;
- c) le percentuali di p2PSA, Phi e PCA3 risultano utili per individuare tumori ad alto grado.

Nel complesso, i nostri risultati, hanno sottolineato che i livelli di PCA3 urinario e l'indice phi risultano essere test sovrapponibili e complementari nella gestione dei pazienti con PCa, in accordo con altri studi. L'unica differenza significativa tra i due biomarkers sembra essere la capacità di discriminare tra le lesioni preneoplastiche e i tumori riscontrata per il PHI, ma non per PCA3. Questa osservazione è in accordo con uno studio precedente che ha valutato come non significativa l'associazione tra PCA3 e la progressione sulla biopsia. Ulteriori studi su popolazioni piu' ampie risultano necessari per verificare se un modello combinato di due biomarkers possa migliorare la specificità del singolo, alla prima biopsia e nelle successive e la discriminazione tra tumore aggressivo e silente.

Ulteriori studi potrebbero chiarire il ruolo potenziale del PHI e del PCA3 nella gestione degli uomini in sorveglianza attiva per il cancro alla prostata.

CONCLUSIONI

In conclusione, la %p2PSA, PHI e il PCA3 Score presentano la capacità di predire un risultato positivo della prima biopsia, che risulta maggiore di quella del %fPSA.

A differenza del %fPSA, %p2PSA e phi, un elevato PCA3 score non risulta utile nel discriminare le lesioni preneoplastiche dal cancro, ma solo le lesioni preneoplastiche da quelle benigne. Essi inoltre presentano la possibilità di individuare neoplasie prostatiche ad alto grado.

BIBLIOGRAFIA

1. Cookson MM. Prostate cancer: screening and early detection. *Cancer Control*. 8(2):133-40,2001
2. Nelson P., Kiriakidou M., Sharma A., Maniataki E., Mourelatos Z. The microRNA world: small is mighty. *Trends Biochem. Sci.* 28:534-40, 2003
3. Berges RR., Vukanovic J., Epstein JI., CarMichel M., Cisek L., Johnson DE., Veltri RW., Walsh PC., Isaacs JT. Implication of cell kinetic changes during the progression of prostatic cancer. *Clin Cancer Res.* 1(5):473-80, 1995
4. Peter J, Unverzagt C, Krogh TN, et al. Identification of precursor forms of prostate-specific antigen in serum of prostate cancer patients by immunosorption and mass spectrometry. *Cancer Res* 2001; 61: 957-62
5. De Vries SH, Raaijmakers R, Blijenberg BG, et al. Additional use of [-2] precursor prostate-specific antigen and "benign" PSA at diagnosis in screen-detected prostate cancer. *Urology* 2005; 65: 926-30
6. Mikolajczyk SD, Millar LS, Wang TJ, et al. "BPSA," a specific molecular form of free prostate-specific antigen, is found predominantly in the transition zone of patients with nodular benign prostatic hyperplasia. *Urology* 2000

7. Bessede T, Malavaud B. [The new biomarkers of prostate cancer]. *Prog Urol* 2011;21 Suppl 2:S63-7.
8. Marks LS, Fradet Y, Deras IL, et al. PCA3 molecular urine assay for prostate cancer in men undergoing repeat biopsy. *Urology* 2007;69(3):532-5.
9. Haese A, de la Taille A, van Poppel H, et al. Clinical utility of the PCA3 urine assay in European men scheduled for repeat biopsy. *Eur Urol* 2008;54(5):1081-8.
10. Deras IL, Aubin SM, Blase A, et al. PCA3: a molecular urine assay for predicting prostate biopsy outcome. *J Urol* 2008;179(4):1587-92.
11. Ploussard G, Haese A, Van Poppel H, et al. The prostate cancer gene 3 (PCA3) urine test in men with previous negative biopsies: does free-to-total prostate-specific antigen ratio influence the performance of the PCA3 score in predicting positive biopsies *BJU Int* 2010;106(8):1143-7.
12. Roobol MJ, Schroder FH, van Leeuwen P, et al. Performance of the prostate cancer antigen 3 (PCA3) gene and prostate-specific antigen in prescreened men: exploring the value of PCA3 for a first-line diagnostic test. *Eur Urol* 2010;58(4):475-81.
13. Perdonà S, Cavadas V, Di Lorenzo G, et al. Prostate cancer detection in the "grey area" of prostate-specific antigen below 10 ng/ml: head-to-head comparison

of the updated PCPT calculator and Chun's nomogram, two risk estimators incorporating prostate cancer antigen 3. *Eur Urol* 2011;59(1):81-7.

14. Jansen FH, van Schaik RH, Kurstjens J, et al. Prostate-specific antigen (PSA) isoform p2PSA in combination with total PSA and free PSA improves diagnostic accuracy in prostate cancer detection. *Eur Urol* 2010;57(6):921-7.

15. Mikolajczyk SD, Millar LS, Wang TJ, et al. A precursor form of prostate-specific antigen is more highly elevated in prostate cancer compared with benign transition zone prostate tissue. *Cancer Res* 2000;60(3):756-9.

16. Catalona WJ, Bartsch G, Rittenhouse HG, et al. Serum pro prostate specific antigen improves cancer detection compared to free and complexed prostate specific antigen in men with prostate specific antigen 2 to 4 ng/ml. *J Urol* 2003;170(6 Pt 1):2181-5.

17. Tuck MK, Chan DW, Chia D, et al. Standard operating procedures for serum and plasma collection: early detection research network consensus statement standard operating procedure integration working group. *J Proteome Res* 2009;8(1):113-7.

18. Shariat SF, Semjonow A, Lilja H, Savage C, Vickers AJ, Bjartell A. Tumor markers in prostate cancer I: blood-based markers. *Acta Oncol* 2011;50 Suppl 1:61-75.

19. Groskopf J, Aubin SM, Deras IL, et al. APTIMA PCA3 molecular urine test: development of a method to aid in the diagnosis of prostate cancer. *Clin Chem* 2006;52(6):1089-95.
20. Tosoian JJ, Loeb S, Kettermann A, et al. Accuracy of PCA3 measurement in predicting short-term biopsy progression in an active surveillance program. *J Urol* 2010;183(2):534-8.
21. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 1988;44(3):837-45.
22. Steyerberg EW, Eijkemans MJ, Harrell FE, Jr., Habbema JD. Prognostic modelling with logistic regression analysis: a comparison of selection and estimation methods in small data sets. *Stat Med* 2000;19(8):1059-79.
23. Steyerberg EW, Harrell FE, Jr., Borsboom GJ, Eijkemans MJ, Vergouwe Y, Habbema JD. Internal validation of predictive models: efficiency of some procedures for logistic regression analysis. *J Clin Epidemiol* 2001;54(8):774-81.
24. Roobol MJ, Haese A, Bjartell A. Tumour markers in prostate cancer III: biomarkers in urine. *Acta Oncol* 2011;50 Suppl 1:85-9.
25. Guazzoni G, Nava L, Lazzeri M, et al. Prostate-Specific Antigen (PSA) Isoform p2PSA Significantly Improves the Prediction of Prostate Cancer at Initial Extended

Prostate Biopsies in Patients with Total PSA Between 2.0 and 10 ng/ml: Results of a Prospective Study in a Clinical Setting. *Eur Urol* 2011;60(2):214-22.

26. Ploussard G, de la Taille A. Urine biomarkers in prostate cancer. *Nat Rev Urol* 2010;7(2):101-9.

27. Whitman EJ, Groskopf J, Ali A, et al. PCA3 score before radical prostatectomy predicts extracapsular extension and tumor volume. *J Urol* 2008;180(5):1975-8; discussion 1978-9.

28. Lee GL, Dobi A, Srivastava S. Prostate cancer: diagnostic performance of the PCA3 urine test. *Nat Rev Urol* 2011;8(3):123-4.

29. Roobol MJ. Contemporary role of prostate cancer gene 3 in the management of prostate cancer. *Curr Opin Urol* 2011;21(3):225-9.

Table 1. Clinical characteristics of study population

Characteristics	No PCa (n=67)	HGPIN/ASAP (n=36)	PCa (n=48)	All (n=151)
	No. Pts. (%)	No. Pts. (%)	No. Pts. (%)	No. Pts. (%)
<i>Prostate volume(cc)</i>				
≤40	51 (76)	24 (67)	37 (77)	112 (74)
>40	16 (23)	12 (33)	11 (23)	39 (26)
<i>PSAd(ng/ml/cc)</i>				
≤0.15	40 (59)	23 (64)	22 (46)	85 (56)
>0.15	27 (40)	13 (36)	26 (54)	66 (44)
<i>PSA (ng/ml)</i>				
0-4	13 (19)	9 (25)	3 (6)	25 (16)
4.1-10	43 (64)	25 (69)	33 (69)	101 (67)
10.1-20	11 (16)	2 (5)	12 (25)	25 (16)
<i>%f-PSA</i>				
1-10	4 (6)	1 (3)	12 (25)	17 (11)
10.1-15	10 (15)	5 (14)	12 (25)	27 (18)
15.1-20	21 (31)	6 (17)	12 (25)	39 (26)
>20	32 (48)	24 (67)	12 (25)	68 (45)
<i>Biopsy Gleason score</i>				
2-4	/	/	9 (16)	/
5-6	/	/	12 (21)	/
7	/	/	14 (24)	/
8-10	/	/	13 (22)	/

Table 2. Descriptive statistics of the analyzed variables

Variable	No PCa	HGPIN/AS AP	PCa	All	Kruskal Wallis p	No Pca vs HGPIN/AS AP	No Pca vs PCa	HGPIN/AS AP vs PCa
	Median [range]	Median [range]	median [range]	median [range]				
Age	64 [50-87]	66.5 [48-80]	66 [48-81]	64.5 [48-87]	0.054	n.s	n.s	n.s
Prostate volume	50 [20-200]	45 [25-80]	47 [15-84]	48 [15-200]	0.421	n.s	n.s	n.s
PSA	6.79 [2-20]	5.97 [3-17]	7.88 [4-20]	6.85 [2-20]	0.019	n.s	n.s	0.005
fPSA	1.25 [0.46-4.02]	1.37 [0.5-2.64]	1.15 [0.27-4.43]	1.21 [0.27-4.43]	0.537	n.s	n.s	n.s
p2PSA	17.46 [7.54-76.93]	18.55 [6.01-46.33]	20.73 [3.75-86.3]	18.88 [3.75-86.3]	0.155	n.s	n.s	n.s
% p2PSA	1.45 [0.43-4.17]	1.64 [0.93-3.44]	1.86 [0.26-5.05]	1.63 [0.26-5.05]	<0.001	n.s	<0.001	<0.001
% fPSA	19.36 [7.6-50]	22.23 [5.5-45]	15.41 [4.8-38.9]	19.2 [4.8-50]	0.001	n.s	0.004	0.001
phi	36.21 [14.02-142.77]	36.82 [19.05-106.04]	53.38 [5.05-162.89]	40.66 [5.05-162.89]	<0.001	n.s	<0.001	<0.001
PCA3	28 [2-257]	54.5 [7-254]	57 [3-339]	47 [2-339]	<0.001	<0.001	<0.001	n.s.

Table 3. Optimal cut-point of the analyzed variables

	Optimal			90% Specificity		80% Specificity	
	Cutpoint	Sensitivity [95% C.I.]	Specificity [95% C.I.]	Cutpoint	Sensitivity [95% C.I.]	Cutpoint	Sensitivity [95% C.I.]
fPSA	≤ 1.55	0.81 [0.7-0.91]	0.36 [0.24-0.46]	≤ 0.64	0.13 [0.04-0.28]	≤ 0.82	0.21 [0.11-0.43]
p2PSA	≥ 18.33	0.66 [0.53-0.79]	0.57 [0.45-0.69]	≥ 36	0.23 [0.11-0.38]	≥ 28.4	0.32 [0.17-0.49]
% p2PSA	≥ 1.68	0.7 [0.57-0.83]	0.7 [0.58-0.81]	≥ 2.45	0.38 [0.17-0.6]	≥ 2.10	0.51 [0.36-0.72]
% fPSA	≤ 13.65	0.49 [0.34-0.64]	0.85 [0.76-0.93]	≤ 11.4	0.34 [0.15-0.57]	≤ 14.4	0.49 [0.32-0.64]
phi	≥ 38.67	0.85 [0.74-0.94]	0.61 [0.49-0.72]	≥ 63.54	0.36 [0.13-0.62]	≥ 50.18	0.6 [0.38-0.79]
PCA3	≥ 32.5	0.81 [0.68-0.91]	0.57 [0.45-0.69]	≥ 86	0.32 [0.04-0.49]	≥ 73	0.43 [0.26-0.64]

Table 4. Descriptive statistics of the association between the analyzed variables and Gleason score

	Gleason <7 n=21 (43.75%)	Gleason ≥ 7 n=27 (56.25%)	
	median [range]	median [range]	p
PSA	5.65 [3.73 - 16.66]	9.43 [5.22 - 20]	0.002
fPSA	1.06 [0.27 - 4.43]	1.18 [0.52 - 2.59]	0.872
p2PSA	19.3 [3.75 - 79.8]	24.35 [9.21 - 86.3]	0.049
% p2PSA	1.71 [0.26 - 3.27]	2.42 [1.36 - 5.05]	0.004
% fPSA	19.04 [4.78 - 8.89]	11.27 [6.85 - 26.98]	0.009
phi	45.2 [5.05 - 77.37]	71.66 [39.52 - 162.89]	<0.001
PCA3	37 [3 - 156]	77 [24 - 339]	0.013

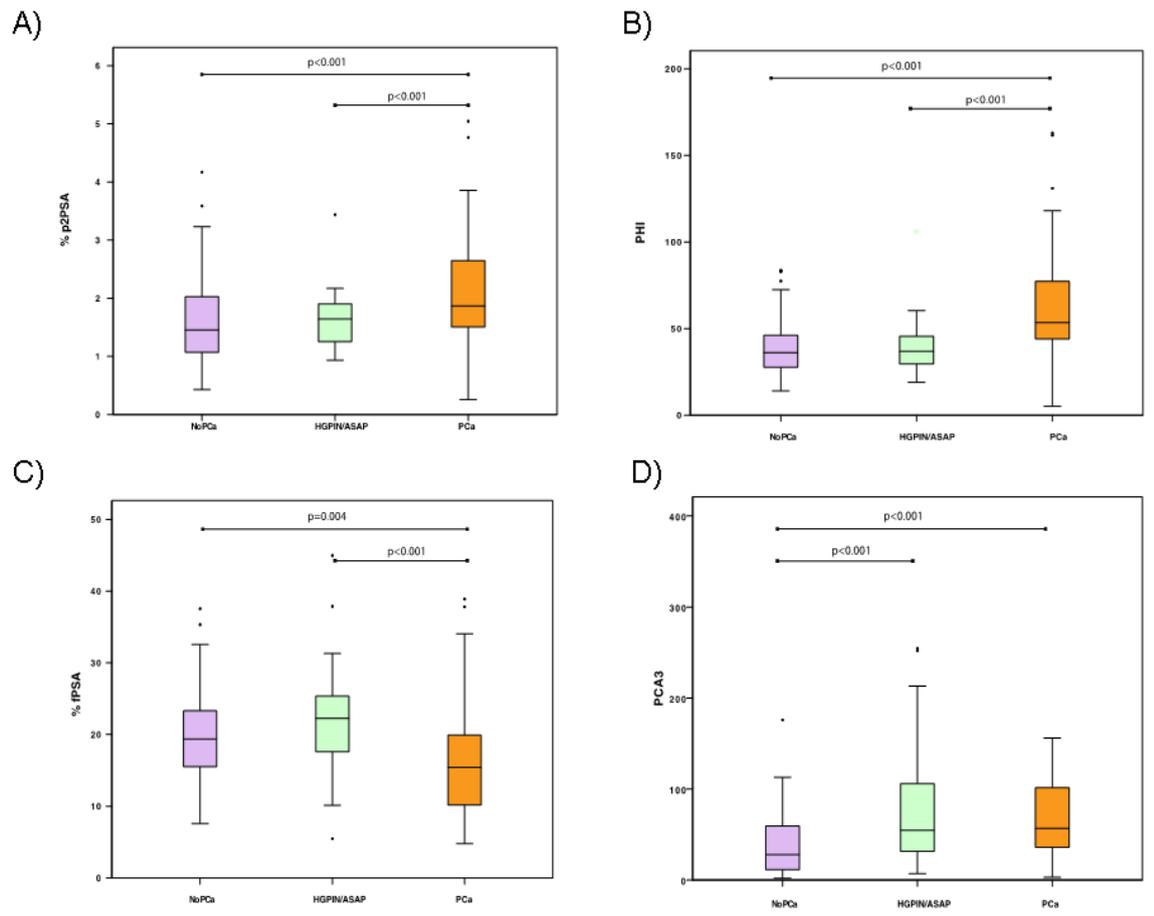
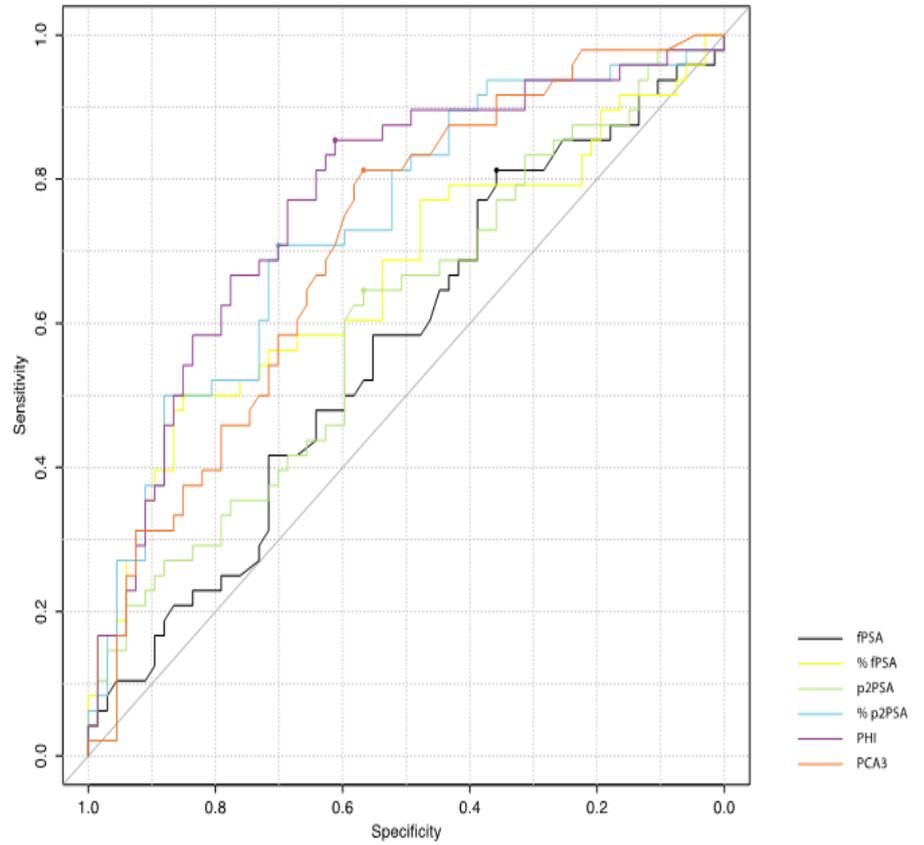
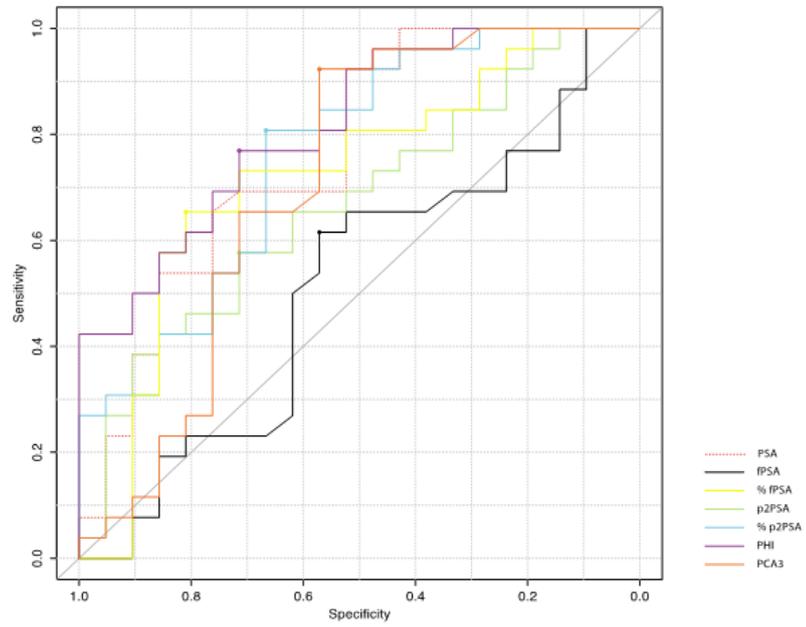


Fig. 1



	AUC	95% C.I.	p
fPSA	0.567	0.461-0.674	0.272
p2PSA	0.602	0.496-0.707	0.058
% p2PSA	0.734	0.641-0.828	<0.001
% fPSA	0.662	0.557-0.768	0.004
phi	0.767	0.677-0.857	<0.001
PCA3	0.710	0.615-0.805	<0.001

Figure 2



	AUC	95% C.I.	p
PSA	0.765	0.625-0.905	0.002
fPSA	0.514	0.342-0.685	0.872
p2PSA	0.668	0.513-0.824	0.049
% p2PSA	0.744	0.599-0.888	0.004
% fPSA	0.72	0.565-0.874	0.009
phi	0.817	0.699-0.935	0.000
PCA3	0.712	0.551-0.874	0.013

Figure 3