

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

Scuola di specializzazione in Urologia

Direttore: Chia.mo Prof. Carlo Terrone



TESI DI SPECIALIZZAZIONE

**Ruolo della valutazione dell'espressione
immunoistochimica del PSMA nel tumore
della prostata: implicazioni nell'utilizzo
della PSMA PET/TC in stadiazione**

Relatore:
Prof. Carlo Terrone

Candidata:
Francesca Ambrosini

Correlatore:
Prof. Marco Borghesi

Anno accademico 2022-2023

INDICE

ABSTRACT	3
INTRODUZIONE	7
1. ADENOCARCINOMA PROSTATICO.....	7
1.1. EPIDEMIOLOGIA.....	7
1.2. EZIOLOGIA.....	7
1.2.1 Familiarità/ tumore della prostata ereditario.....	8
1.2.1 Mutazioni genetiche e tumore della prostata.....	8
1.3. CLASSIFICAZIONE E STAGING.....	9
1.3.1 Gleason score and International Society of Urological Pathology 2019 grade	10
1.4. ANATOMIA PATOLOGICA E BIOLOGIA MOLECOLARE.....	12
1.5. VALUTAZIONE DIAGNOSTICA.....	14
1.6. STADIAZIONE.....	18
1.7. TRATTAMENTO DEL TUMORE DELLA PROSTATA LOCALIZZATO.....	22
PARTE SPERIMENTALE	26
2.1 BACKGROUND.....	26
2.2 MATERIALI E METODI.....	27
2.2.1 Selezione del campione.....	27
2.2.2 Analisi immunostochimica	27
2.2.3 Scopo dello studio.....	28
2.2.4 Analisi statistica	29
2.3 RISULTATI.....	30
2.4 DISCUSSIONE.....	36
2.3 CONCLUSIONE	39
BIBLIOGRAFIA	40

ABSTRACT

Introduzione

Abbiamo analizzato il ruolo predittivo dell'espressione immunoistochimica del PSMA sui frustoli di biopsia prostatica positivi per tumore della prostata rispetto ai parametri della PSMA PET/CT in stadiazione.

Materiali e metodi

Sono stati selezionati 50 pazienti candidati a prostatectomia radicale robotica da giugno 2021 a dicembre 2022, stadiati con Ga68-PSMA- PET. Per ciascun paziente, è stata condotta l'analisi immunoistochimica per ogni inclusione corrispondente a ciascun grado ISUP presente nei frustoli di biopsia e per ogni *index lesion* sull'istologico definitivo. I risultati sono stati riportati utilizzando l'*immunoreactive score* (IRS). Il *Gwet's agreement coefficient* (AC1) è stato utilizzato per calcolare il grado di concordanza tra l'espressione immunoistochimica di PSMA sui frustoli di biopsia e sull'*index lesion* dell'istologico definitivo. Modelli di regressione uni- e multivariata hanno valutato l'impatto dell'IRS di biopsia e istologico definitivo sul SUVmax.

Risultati

La percentuale di concordanza è risultata dell'80%, con un AC1 = 0,72 (intervallo di confidenza [CI 0,5-0,9]) statisticamente significativo ($p < 0,001$). Secondo l'analisi di regressione univariata, la percentuale media di cellule PSMA-positive su campioni biotici e l'IRS medio su campioni biotici impattano significativamente sul SUVmax ($\beta = 1,2$, CI 1,04-1,45, $p = 0,02$ e $\beta = 7,5$, CI 1,2-3,1, $p = 0,008$, rispettivamente). Secondo i modelli multivariati, sia la percentuale di cellule PSMA-positive dell'*index lesion* sia l'IRS dell'*index lesion* sono risultati predittori statisticamente significativi del SUVmax, dopo aggiustamento per il volume della neoplasia ($\beta = 1,22$, CI 1,05-1,4, $p = 0,01$ e $\beta = 6,66$, CI 2,03-21,8, $p = 0,01$, rispettivamente).

Conclusioni

L'espressione immunoistochimica della PSMA dei frustoli di biopsia prostatica ha un elevato grado di concordanza con quella dell'istologico

definitivo. Il grado di espressione della PSMA è un predittore indipendente del SUVmax.

Introduction

We investigated the predictive role of immunochemical expression of PSMA in positive prostate biopsy specimens compared to PSMA PET /CT parameters in staging.

Materials and Methods

Fifty patients scheduled for robot-assisted radical prostatectomy between June 2021 and December 2022 and staged with Ga68- PSMA PET were selected. For each patient, immunochemical analysis was performed for each inclusion corresponding to each ISUP grade in the biopsy specimens and for each index lesion in the final histology. Results were reported using the immunoreactive score (IRS). The Gwet's agreement coefficient (AC1) was used to test the agreement between immunochemical PSMA expression in the biopsy and the index lesion in the final histology. Univariate and multivariate regression models evaluated the influence of the biopsy and final histology IRS on the SUVmax.

Results

The concordance rate between immunochemical PSMA expression in biopsy specimens and the index lesion on the final histology was 80%, with a statistically significant AC1 = 0.72 (confidence interval [CI 0.5-0.9]) ($p < 0.001$). According to the univariate analysis, the average percentage of PSMA-positive cells in biopsy samples and the average IRS in biopsy samples had a significant effect on SUVmax ($\beta = 1.2$, CI 1.04-1.45, $p = 0.02$ and $\beta = 7.5$, CI 1.2-3.1, $p = 0.008$, respectively). In the multivariate regression models, both the percentage of PSMA-positive cells in the index lesion and the IRS of the index lesion were statistically significant predictors of SUVmax, after adjusting for tumor volume ($\beta = 1.22$, CI 1.05-1.4, $p = 0.01$, and $\beta = 6.66$, CI 2.03-21.8, $p = 0.01$, respectively).

Conclusions

Immunochemical expression of PSMA in prostate biopsy shows a high level of agreement with final histology. The PSMA expression is an independent predictor of the SUVmax. Assessment of PSMA immunochemical

expression in a preoperative setting can have significant implications for a more accurate diagnostic iter.

INTRODUZIONE

1. ADENOCARCINOMA PROSTATICO

1.1. EPIDEMIOLOGIA

Il cancro alla prostata è il secondo tumore più comunemente diagnosticato negli uomini, con una stima di 1,4 milioni di diagnosi in tutto il mondo nel 2020 [1, 2]. Una revisione sistematica di studi autoptici ha riportato una prevalenza del cancro alla prostata a età < 30 anni del 5% (intervallo di confidenza al 95% [CI]: 3-8%), aumentando con un odds ratio (OR) di 1.7 (1.6-1.8) ogni 10 anni, fino a una prevalenza del 59% (48-71%) oltre i 79 anni [3]. Vi è una variazione nella frequenza del cancro alla prostata rilevato durante l'autopsia tra uomini di diverse origini etniche e aree geografiche (ad esempio, 83 nei maschi bianchi degli Stati Uniti contro 41 in Giappone all'età di 71-80 anni) [4].

La variazione nell'incidenza della diagnosi di cancro alla prostata è ancora più evidente tra diverse aree geografiche, influenzata dalla frequenza dei test dell'antigene prostatico specifico (PSA) e dalle raccomandazioni sullo screening [5]. È più elevata in Australia/Nuova Zelanda e Nord America (age-standardised rates [ASRs] per 100.000 rispettivamente di 111,6 e 97,2) e in Europa Occidentale e Settentrionale (ASR di 94,9 e 85 rispettivamente). L'incidenza è bassa in Asia Orientale e Asia Centro-Meridionale (ASR di 10,5 e 4,5 rispettivamente), ma è in aumento [6]. Oltre ai test PSA, l'incidenza dipende anche dall'età della popolazione, dalla geografia e dall'etnia.

La mortalità dovuta al cancro alla prostata è diminuita nella maggior parte delle nazioni occidentali, ma l'entità della riduzione varia tra i paesi [2].

1.2. EZIOLOGIA

L'eziologia del carcinoma prostatico (PCa) è multifattoriale, come risultato di una complessa interazione tra fattori genetici di suscettibilità (responsabili della familiarità e della diversa incidenza nelle razze umane) ed ambientali (dieta, cancerogeni presenti nell'ambiente). Non esistono dati conclusivi che possano supportare misure preventive o dietetiche specifiche volte a ridurre il rischio di sviluppare il carcinoma prostatico [7].

1.2.1 Familiarità/ tumore della prostata ereditario

L'aumento di incidenza di PCa in presenza di una storia familiare o di una determinata etnia suggerisce una predisposizione genetica [15, 16]. Tuttavia, solo una piccola sottopopolazione di uomini con PCa ha veramente una malattia ereditaria (> 3 casi nella stessa famiglia, PCa in tre generazioni successive o > 2 uomini diagnosticati con PCa < 55 anni).

Secondo un registro USA, in caso di PCa ereditario (riportato dal 2,18% dei partecipanti), è stato riportato un rischio relativo (RR) di 2.30 per la diagnosi di qualsiasi PCa, 3.93 per PCa a insorgenza precoce, e 2.32 per PCa clinicamente significativo (csPCa) [8].

In uno studio svedese, in caso di padre e due fratelli affetti da PCa, la probabilità di PCa ad alto rischio all'età di 65 anni è stata stimata dell'11.4% (vs. 1.4% di rischio della popolazione generale [9]).

1.2.1 Mutazioni genetiche e tumore della prostata

Studi di genetica hanno identificato più di 100 loci che possono contribuire allo sviluppo di tumore di prostata [10, 11]. Studi di coorte hanno riportato tassi de 15-17% di mutazioni germinali indipendentemente dallo stadio [12, 13]. Secondo analisi genetiche di pazienti con malattia metastatica, è emerso che il 15,6% degli uomini con carcinoma prostatico presenta varianti patogene identificate nei geni testati (geni del cancro al seno [BRCA1, BRCA2], HOXB13, MLH1, MSH2, PMS2, MSH6, EPCAM, ATM, CHEK2, NBN e TP53), e il 10,9% degli uomini presenta varianti patogene ereditarie nei geni per la riparazione del DNA [12].

Uno studio prospettico di coorte su portatori maschi di mutazioni BRCA1 e BRCA2 ha confermato l'associazione di BRCA2 con il PCa aggressivo [14]. Un'analisi dei risultati di 2019 pazienti con carcinoma prostatico (18 portatori di BRCA1, 61 portatori di BRCA2 e 1,940 non portatori) ha dimostrato che il carcinoma prostatico con mutazioni ereditarie di BRCA1/2 era più frequentemente associato a un punteggio ISUP > 4, stadio T3/T4, coinvolgimento dei linfonodi e metastasi alla diagnosi rispetto al carcinoma prostatico nei non portatori [15]. Si è anche riscontrato che i portatori di mutazioni nei geni di suscettibilità BRCA avevano outcomes peggiori rispetto ai non portatori dopo terapie locali [15]. In uno studio retrospettivo su 313 pazienti deceduti a causa di carcinoma prostatico e 486 pazienti con

carcinoma prostatico localizzato a basso rischio, il tasso di portatori di mutazioni BRCA1/2 e ATM era significativamente più alto nei pazienti con carcinoma prostatico letale (6.07%) rispetto ai pazienti con carcinoma prostatico localizzato (1,44%) [16].

Dal punto di vista applicativo è attualmente difficile formulare raccomandazioni sullo screening genetico, anche per la indisponibilità (non rimborsabilità) del test per i pazienti affetti da carcinoma prostatico nel nostro Paese. Alcune linee guida, come ad esempio le linee guida NCCN americane [17], raccomandano uno screening genetico mediante tecniche di sequenziamento (*next generation sequencing*: NGS) a livello germinale includente un pannello di geni comprendente BRCA2, BRCA1, ATM, CHEK2, PALB2, MSH2, MSH6 e PMS2, specialmente nei pazienti con storia familiare positiva, in quelli a rischio alto e molto alto (indipendentemente dalla familiarità), in quelli con ascendenza Ashkenazi e in quelli con istologia intraduttale.

1.3. CLASSIFICAZIONE E STAGING

L'obiettivo di un sistema di classificazione è raggruppare pazienti con prognosi simile. Ciò consente la progettazione di studi clinici su popolazioni di pazienti relativamente omogenee, il confronto di dati clinici e patologici e la formulazione di raccomandazioni per il trattamento di queste popolazioni di pazienti. Per la compilazione delle correnti linee guida sono utilizzate la classificazione Tumor, Node, Metastasis (TNM) 2017 per la stadiazione del PCa [18] (Tabella 1) e la classificazione di rischio EAU (Tabella 2) [19]. Quest'ultima classificazione si basa sul sistema di classificazione di D'Amico per il carcinoma prostatico, combina informazioni cliniche sull'estensione del tumore, il PSA e la patologia.¹

Una stratificazione più precisa del sottogruppo clinicamente eterogeneo di pazienti a rischio intermedio potrebbe fornire una migliore base per la loro gestione. In particolare, le linee guida del National Cancer Center Network

¹ L'EANM (Associazione Europea di Medicina Nucleare) ha proposto una classificazione 'miTNM' (TNM di imaging molecolare), che tiene conto delle scoperte ottenute tramite la PET/CT con PSMA [20]. È probabile che il pronostico delle sottofasi miT, miN e miM sia migliore rispetto ai loro corrispettivi T, N e M a causa del 'fenomeno di Will Rogers'; l'entità di questo spostamento di prognosi deve ancora essere valutata, così come il suo interesse pratico e l'impatto clinico [5]. Questa riclassificazione non è avallata dall'UICC (Unione Internazionale Contro il Cancro) né dall'AJCC (American Joint Committee on Cancer).

(NCCN) suddividono la malattia a rischio intermedio in rischio intermedio favorevole e rischio intermedio sfavorevole, con caratteristiche sfavorevoli che includono grado ISUP 3, e/o > 50% dei campioni di biopsia positivi e/o almeno due fattori a rischio intermedi. Tuttavia, finora, la migliore stratificazione e il trattamento ottimale rimangono controversi.

T - Primary Tumour (stage based on digital rectal examination [DRE] only)	
TX	Primary tumour cannot be assessed
T0	No evidence of primary tumour
T1	Clinically inapparent tumour that is not palpable
	T1a Tumour incidental histological finding in 5% or less of tissue resected
	T1b Tumour incidental histological finding in more than 5% of tissue resected
	T1c Tumour identified by needle biopsy (e.g. because of elevated prostate-specific antigen [PSA])
T2	Tumour that is palpable and confined within the prostate
	T2a Tumour involves one half of one lobe or less
	T2b Tumour involves more than half of one lobe, but not both lobes
	T2c Tumour involves both lobes
T3	Tumour extends palpably through the prostatic capsule
	T3a Extracapsular extension (unilateral or bilateral)
	T3b Tumour invades seminal vesicle(s)
T4	Tumour is fixed or invades adjacent structures other than seminal vesicles: external sphincter, rectum, levator muscles, and/or pelvic wall
N - Regional (pelvic) Lymph Nodes¹	
NX	Regional lymph nodes cannot be assessed
N0	No regional lymph node metastasis
N1	Regional lymph node metastasis
M - Distant Metastasis²	
M0	No distant metastasis
M1	Distant metastasis
	M1a Non-regional lymph node(s)
	M1b Bone(s)
	M1c Other site(s)

Tabella 1: Classificazione clinica Tumor Node Metastasis (TNM) per il PCa1 Metastasi non più grandi di 0,2 cm possono essere definite pNmi.

2 Quando è presente più di un sito di metastasi, viene utilizzata lo stadio più avanzato. (p)M1c è lo stadio più avanzato.

1.3.1 Gleason score and International Society of Urological Pathology 2019 grade

In origine il sistema di grading secondo Gleason stabiliva su 5 diversi gradi sulla base della diversa architettura istologica del tumore, ma nel 2005 e poi nel 2014 la società internazionale di patologia urologica (ISUP) ha modificato i gradi di Gleason eliminando l' 1 e il 2 [21]. Secondo la

definizione 2005 della società internazionale di patologia urologica (ISUP), il Gleason Score (GS) deriva dalla somma tra il grado di Gleason più esteso (primario) e il secondo pattern più comune (secondario), in caso siano presenti due pattern diversi. Se è presente solo un pattern istologico, questo deve essere raddoppiato per ottenere lo score finale. Qualora siano presenti 3 differenti gradi istologici, il GS finale comprende il pattern più comune (primario) ed il pattern più aggressivo (secondario), indipendentemente dalla sua estensione [22]. Il grado di carcinoma intraduttale dovrebbe anche essere incorporato nel GS [22]. Oltre a riportare le caratteristiche del carcinoma per ogni singolo core bioptico, può essere fornito anche un GS globale che tenga conto dell'estensione pattern-specifica in tutti i frustoli bioptici. Come emerso dalla Conferenza ISUP 2014 e 2019 sulla classificazione istologica del carcinoma prostatico, il numero di gradi istologici di PCa dovrebbe essere limitato da 1 a 5 (Tabella 3) [21].

I gruppi di grado sono i seguenti:

- Gruppo di Grado 1 (ex score di Gleason $3+3=6$ e inferiori): gli acini neoplastici sono bene distinti tra loro.
- Gruppo di Grado 2 (ex score di Gleason $3+4=7$): presenza di acini neoplastici ben distinti con una quota di ghiandole micro-acinari confluenti, mal definibili, con lume ghiandolare scarsamente formato o cribriformi <50%.
- Gruppo di Grado 3 (ex score di Gleason $4+3=7$): presenza di ghiandole micro-acinari confluenti, mal definibili, con lume ghiandolare scarsamente formato o glomeruloidi o cribriformi >50%.
- Gruppo di Grado 4 (ex score di Gleason $4+4=8$ e $3+5=8$): presenza esclusiva di ghiandole microacinarie confluenti, mal definibili, con lume ghiandolare scarsamente formato o glomeruloidi o cribriformi oppure combinazione di acini bene distinti e di una popolazione di cellule singole o solida o con necrosi comedonica.
- Gruppo di Grado 5 (ex score di Gleason $4+5=9$, $5+4=9$ e $5+5=10$): presenza di una commistione variabile di ghiandole micro-acinarie confluenti, mal definibili, con lume ghiandolare scarsamente formato o cribriformi e di una popolazione di cellule singole o solida o con necrosi comedonica.

Definizione			
Low-risk	Intermediate-risk	High-risk	
PSA < 10 ng/mL	PSA 10–20 ng/mL	PSA > 20 ng/mL	any PSA
and GS < 7 (ISUP grade 1)	or GS 7 (ISUP grade 2/3)	or GS > 7 (ISUP grade 4/5)	any GS (any ISUP grade)
and cT1-2a*	or cT2b*	or cT2c*	cT3-4* or cN+**
Localised			Locally advanced

Tabella 2: Classi di rischio EAU per la ripresa biochimica in malattia localizzata e localmente avanzata

GS = Gleason score; ISUP = International Society for Urological Pathology; PSA = prostate-specific antigen.

*Based on digital rectal examination.

** Based on CT/bone scan.

Gleason score	ISUP grade
2-6	1
7 (3+4)	2
7 (4+3)	3
8 (4+4 or 3+5 or 5+3)	4
9-10 (4+5 or 5+4 or 5+5)	5

Tabella 3: Gruppi istologici secondo la revisione 2014 della Società Internazionale di Patologia Urologica (ISUP)

1.4. ANATOMIA PATOLOGICA E BIOLOGIA MOLECOLARE

La classificazione di riferimento per individuare gli istotipi di neoplasia della prostata è quella indicata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) nel 2022 [23].

Neoplasie ghiandolari

- Neoplasia prostatica intraepiteliale di alto grado
- Carcinoma intraduttale
- Adenocarcinoma tipo acinare
 - Atrofico
 - Pseudoiperplastico
 - Microcistico
 - A cellule schiumose
 - Mucinoso (colloide)
 - A cellule ad anello con castone
 - Pleomorfo a cellule giganti

- Sarcomatoide
- Cribriforme
- Duttale

Neoplasie squamose*

- Carcinoma adenosquamoso
- Carcinoma squamoso

Tumori neuroendocrini*

- Adenocarcinoma acinare con differenziazione neuroendocrina
- Tumore neuroendocrino bene differenziato
- Carcinoma neuroendocrino a piccole cellule
- Carcinoma neuroendocrino a grandi cellule

Carcinoma a cellule transizionali*

Tumori dello stroma prostatico e tumori mesenchimali*

**La stadiazione TNM non deve essere applicata a questi istotipi*

La neoplasia prostatica intraepiteliale di alto grado (HG-PIN) è una lesione precancerosa costituita da una proliferazione cellulare all'interno dei dotti e degli acini della prostata. La probabilità di riscontro di cancro dopo diagnosi di un singolo focolaio di HG-PIN è 20% e quindi simile a quello della prostata normale mentre sale al 30% in caso di focolai multipli. Inoltre la maggior parte dei tumori insorti dopo diagnosi di HG-PIN ricade nel gruppo a basso rischio. Ne deriva che in caso di un singolo focolaio di HG-PIN diagnosticato su biopsia non sia necessario ripetere le biopsie mentre in caso di focolai multipli sia indicato solo un monitoraggio clinico e radiologico [24].

La proliferazione microacinare atipica (atypical small acinar proliferation, ASAP) è caratterizzata da piccoli gruppi di acini atipici sospetti ma insufficienti per una diagnosi definitiva di carcinoma [25]. La probabilità che un paziente con una diagnosi di ASAP possa avere effettivamente un cancro è di circa il 40% e la metà di essi ricade nel gruppo a rischio intermedio o alto. Pertanto, per i pazienti che abbiano ricevuto una diagnosi di ASAP si può riconsiderare una re-biopsia con un campionamento particolare della zona sospetta [24].

Il carcinoma intraduttale (IDC-P) è una proliferazione epiteliale neoplastica intra-acinare /intra-tubulare che ha gli stessi aspetti della neoplasia

prostatica intraepiteliale di alto grado (HG-PIN) ma mostra una atipia citologica/architetturale maggiore, tipicamente associata all'adenocarcinoma di alto grado e di alto stadio. Il carcinoma intraduttale è associato ad una prognosi peggiore del tumore [26]. Il carcinoma intraduttale è una lesione diversa dalla neoplasia prostatica intraepiteliale ad alto grado (HG-PIN) dal punto di vista istologico e molecolare. Le lesioni che mostrano un'atipia maggiore rispetto alla HG-PIN ma che al contempo non raggiungono i criteri del IDC-P rientrano nel concetto di Proliferazione Intraduttale Atipica (AIP) e richiedono la ripetizione di ulteriori prelievi [27].

1.2.2 Immunofenotipo del carcinoma prostatico

I markers immunofenotipici di carcinoma prostatico più comunemente utilizzati sono il PSA, la racemasi (AMACR) e NKX3.1 [28].

Quest'ultimo antigene è particolarmente utile nella diagnosi differenziale col carcinoma uroteliale e nelle metastasi per confermare l'origine prostatica [29]. Una immunocolorazione doppia o tripla comprendente la citocheratina ad alto peso molecolare (34betaE12), p63 e racemasi è utile per la valutazione dello strato basale nella diagnosi di lesioni dubbie per infiltrazione e in tutti i tipi di proliferazioni intraduttali e di ASAP [30].

1.5. VALUTAZIONE DIAGNOSTICA

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

- Esplorazione rettale
- Dosaggio del PSA
- Tecniche di immagini
- Agobiopsia prostatica

Esplorazione rettale

L'esplorazione rettale (ER) deve costituire il primo approccio diagnostico al paziente che presenti sintomatologia riferibile ad una possibile patologia prostatica. Dato che il carcinoma prostatico insorge in oltre il 70% dei casi a livello della porzione periferica della ghiandola, il nodulo neoplastico può essere rilevato già con la semplice palpazione. In particolare, ciò risulta più agevole quando la lesione presenta un volume di 0,2 mL o maggiore [32]. Circa il 18% delle neoplasie prostatiche sono rilevate dalla sola ER, a

prescindere dai valori di PSA. Un sospetto palpatorio all'ER, associato ad un PSA >2 ng/ml, presenta un valore predittivo positivo tra il 5 e il 30%. Sebbene indispensabile nella valutazione del paziente, l'ER non può essere utilizzata singolarmente come unica metodica diagnostica, in quanto presenta bassi livelli di sensibilità (valore predittivo positivo) e specificità. In grandi casistiche di pazienti è stato evidenziato che l'ER fallisce la diagnosi di tumore in circa la metà dei casi, in quanto non vi è una corrispondenza dimostrata fra un'alterazione palpatoria e la presenza di tumore in tale sede [33].

Dosaggio del PSA

Il PSA è una glicoproteina prodotta principalmente dal tessuto ghiandolare prostatico secreta nel liquido seminale e rilasciata nel sangue solo in quantità minime in condizioni fisiologiche. Il sovvertimento della normale istoarchitettura prostatica in caso di patologia benigna o maligna della prostata determina un incremento dei livelli ematici di PSA, rendendo quest'ultimo un marcatore di patologia prostatica.

Il PSA è presente in circolo sia in forma libera che coniugato a inibitori enzimatici. I metodi immunometrici di dosaggio del PSA totale misurano una miscela di isoforme rappresentate dal PSA libero e da parte di quello legato. Il PSA può essere elevato in circolo non solo in presenza del cancro della prostata, ma anche in condizioni fisiologiche (es. eiaculazione recente, attività fisica intensa), in caso di patologia benigna (es. ipertrofia prostatica, prostatite, infarto prostatico, ritenzione urinaria), nonché dopo l'esecuzione di alcune manovre diagnostiche, quali la cistoscopia o la biopsia prostatica. Il PSA è generalmente valutato in riferimento a un valore soglia positivo/negativo (cut-off) calcolato sulla base della distribuzione del marcatore nei soggetti normali. Il valore soglia tradizionalmente utilizzato di 4 ng/mL deve essere considerato convenzionale ed è caratterizzato da un basso valore predittivo, sia positivo che negativo. Infatti, esiste un'ampia sovrapposizione fra soggetti con neoplasia confinata all'organo e soggetti con ipertrofia prostatica, che presentano spesso valori compresi fra 4 e 10 ng/mL. Per contro, circa il 20% dei pazienti con neoplasia confinata all'organo presenta valori di PSA inferiori a 3 ng/mL [34]. Oggi la posizione

della comunità scientifica sul cut-off del PSA da utilizzare per orientare alla biopsia è variabile; alcune linee guida fanno ancora riferimento al valore di 4 ng/mL per il quale esiste una estesa letteratura; altri documenti suggeriscono di utilizzare valori soglia più bassi (3,0 o 2,5 ng/mL) allo scopo di aumentare la sensibilità per i tumori iniziali.

Fra gli approcci impiegati per migliorare l'accuratezza diagnostica del PSA sono di interesse la PSA velocity, la PSA density e il rapporto PSA libero/totale, chiamati convenzionalmente "derivati del PSA" [7].

1.5.3 Tecniche di imaging

Ecografia transrettale

I noti limiti dell'ecografia transrettale (*TransRectal UltraSound*, TRUS) sono legati al fatto che, sebbene la maggior parte dei carcinomi prostatici si configuri come lesioni ipoecogene, non si può trascurare la possibile iperecogenicità di alcune forme di carcinoma della prostata e che un'elevata percentuale di carcinomi sono di aspetto isoecogeno, anche se localizzati nella parte periferica (circa il 40%) [35]. Si è cercato di porre rimedio a tale limite con lo sviluppo di metodiche quali la *Shear-wave elastography* (SWE) capaci di individuare processi patologici tramite la loro alterata elasticità tissutale e sonde ad alta frequenza come la Micro-u/s che con una frequenza di 29 MHz avrebbero maggior capacità di individuare aree con anatomia duttale e densità cellulare alterati [36]. Nella pratica clinica corrente l'ecografia transrettale trova le seguenti indicazioni [7]: • nella fusione di immagini con Risonanza Magnetica (RM) per una migliore localizzazione e campionamento biptico della lesione identificata alla RM (MR-TRUS *guided fusion biopsy*) [37–39], con un significativo miglioramento della performance diagnostica sia nei pazienti sottoposti a campionamento biptico per la prima volta, sia nel campionamento mirato di aree sospette alla risonanza in pazienti con pregresse biopsie negative [38, 39]. • nel caso di un importante interessamento extra-capsulare, la TRUS è in grado di dimostrarne la sede e l'estensione, anche se la sensibilità è minore rispetto alla risonanza magnetica, mentre il valore predittivo positivo è simile, ove quest'ultima non sia disponibile [40]. • nel calcolo del volume prostatico finalizzato alla determinazione della PSA *density* (PSAD); • nel controllo dei pazienti sottoposti a prostatectomia radicale per la

visualizzazione di un'eventuale lesione solida (recidiva) in loggia prostatica o in sede peri-anastomotica.

Tomografia computerizzata

La TC non è una tecnica adeguata per la diagnosi di carcinoma prostatico, poiché, per la ridotta risoluzione di contrasto per quest'organo, l'anatomia zonale della ghiandola non è riconoscibile, né vi è differenza fra tessuto neoplastico e tessuto normale in termini di densità radiologica. Detiene tuttavia un importante ruolo nella stadiazione e nel follow up di malattia avanzata metastatica [7].

Risonanza magnetica multiparametrica della prostata

La RM multiparametrica (RMmp) ricopre un ruolo fondamentale nell'individuazione del cancro della prostata in pazienti con sospetto clinico: l'ormai consolidato protocollo multiparametrico, che prevede sequenze anatomiche T2-pesate, T1-pesate in perfusione (*Dynamic Contrast Enhanced Magnetic Resonance Imaging*, DCE-MRI) e pesate in diffusione (*Diffusion Weighted Imaging*, DWI) è in grado di fornire una combinazione di informazioni anatomiche, biologiche e funzionali necessarie per una più precisa definizione delle lesioni sospette [41]. La RM trova indicazione per la guida del campionamento biptico in pazienti con precedenti biopsie negative e persistente sospetto clinico di cancro della prostata [7].

Studi monocentrici condotti per la valutazione della performance diagnostica del protocollo multiparametrico, hanno evidenziato un'elevata sensibilità e specificità della metodica, con un valore predittivo negativo (VPN) compreso tra il 63% ed il 91% per i tumori prostatici di qualsiasi grado e tra il 92% ed il 100% per i soli tumori clinicamente significativi [41].

La RM intesa come uno strumento addizionale che, unitamente ai valori di PSA, all'ER, all'età del paziente, alle comorbidità e all'anamnesi familiare, possa essere dirimente nella selezione dei pazienti da sottoporre a biopsia, trova conferma nello studio PROMIS (multicentrico su larga scala), che dimostra come tale metodica di imaging possa svolgere il ruolo di triage test prima della biopsia con duplici vantaggi in termini clinico-epidemiologici:

da una parte riducendo del 25% biopsie non necessarie, e, di conseguenza, prevenendo sovradiagnosi e sovratrattamento di tumori clinicamente indolenti; dall'altra, incrementando del 18% la diagnosi dei tumori clinicamente significativi, altrimenti diagnosticati con la sola biopsia random eco-guidata [42]. Le conclusioni di questo studio suggeriscono pertanto di spostare il momento dell'esecuzione della risonanza magnetica a prima dell'esecuzione della biopsia prostatica.

In aggiunta, il successivo studio PRECISION (studio di non inferiorità randomizzato e multicentrico) ha dimostrato come la RM seguita da campionamento biptico mirato abbia identificato un maggior numero di cancro clinicamente significativi rispetto alla sola biopsia standard (38% vs. 26%), riducendo la diagnosi dei cancro clinicamente indolenti [43]. Tra gli studi che devono essere citati, va annoverato anche lo studio MRI-FIRST [44] che è lo studio controtendenza che ha evidenziato come biopsia in fusione di immagini (Biopsia Target) e Biopsia a sestanti (Biopsia Standard) abbiano capacità diagnostica sovrapponibile nella diagnosi dei cancro prostatici clinicamente significativi, e come, piuttosto, l'esecuzione della Biopsia Target in aggiunta alla Biopsia Standard migliori il tasso di diagnosi, pur restando la seconda indispensabile ed ineliminabile [7].

Agobiopsia prostatica

La biopsia prostatica eco-guidata è attualmente il *gold standard* e viene eseguita mediante approccio transrettale o transperineale. Le percentuali diagnostiche, in assenza di *imaging* preliminare con risonanza magnetica sono comparabili tra i due approcci [45]; tuttavia secondo le più recenti linee guida EAU, sarebbe preferibile utilizzare l'approccio transperineale per il minor rischio di complicanze infettive [7]

1.6 STADIAZIONE

Una corretta stadiazione, cioè una definizione accurata dell'estensione della malattia, rappresenta il punto di partenza per stabilire quale sia la miglior strategia terapeutica, per ottenere informazioni riguardo alla prognosi e per confrontare i risultati delle varie opzioni terapeutiche.

Il mezzo di stadiazione ideale dovrebbe possedere una bassa variabilità nell'interpretazione inter-osservatore ed avere un elevato grado di predittività sia per la valutazione dell'estensione locale sia per la valutazione dell'estensione linfonodale e a distanza della neoplasia.

Per valutare l'estensione del tumore prostatico a livello locale (T) può essere utilizzata, oltre all'esplorazione rettale, la RMmp mentre appare più limitato l'uso della TC. I linfonodi pelvici (N) vengono studiati con la TC o con la RM; considerata la scarsa accuratezza di tali metodiche nella determinazione del parametro cN, la linfadenectomia pelvica conserva ancora oggi un importante ruolo nella stadiazione [7]. La malattia metastatica(M) viene tradizionalmente valutata con la scintigrafia ossea e con la TC con m.d.c. Più recentemente sono state introdotte altre metodiche di imaging che possono rendere più accurata la stadiazione, soprattutto nei pazienti ad alto rischio, quali la RM total body ancora poco diffusa e la PET con diversi traccianti in particolare colina e soprattutto, più recentemente, PSMA radiomarcato [46, 47].

Più parametri clinici e anatomopatologici possono contribuire alla stadiazione, soprattutto se inseriti nell'ambito di nomogrammi specifici o mediante modelli predittivi [48, 49].

In ogni caso l'esecuzione di ulteriori indagini di stadiazione è da raccomandarsi solo in funzione della classe di rischio del singolo paziente, laddove una stadiazione più accurata possa modificare l'iter terapeutico.

TRUS

L'ecografia trans-rettale non è più precisa nel predire estensione extracapsulare rispetto all'esplorazione rettale. Alcuni studi monocentrici hanno riportato buoni risultati nella stadiazione locale utilizzando 3D TRUS o color Doppler, ma questi buoni risultati non sono stati confermati da studi su larga scala [7].

RMmp

L'imaging T2-pesato rimane il metodo più efficiente per la stadiazione locale in mpMRI. A 1.5 Tesla, la mpMRI è in grado di identificare tumori T3 con una buona specificità ma con scarsa sensibilità. I dati raggruppati da una meta-analisi per interessamento extraprostatico(EPE), invasione delle

vescichette (SVI) ovvero malattia in stadio T3, hanno mostrato una sensibilità e specificità di, rispettivamente, 0,57 (IC 95%: 0,49-0,64), 0,91 (IC 95%: 0,88-0,93) e 0,58 (IC 95%: 0,47-0,68), e 0,96 (IC 95%: 0,95-0,97), 0,61 (IC 95%: 0,54-0,67) e 0,88 (IC 95%: 0,85-0,91) [50]. La risonanza magnetica multiparametrica non è in grado di rilevare un'estensione extracapsulare microscopica. La sua sensibilità aumenta con il grado di estensione all'interno del grasso periprostatico.

Data la sua bassa sensibilità per EPE focale (microscopica), la mpMRI non è attualmente raccomandata per la stadiazione locale in pazienti a basso rischio [7]. Tuttavia, può comunque essere utile per la pianificazione del trattamento.

Scintigrafia Ossea con Radiofarmaci Osteotropi e PET/TC con 18F fluoruro

Nei pazienti con carcinoma prostatico esiste un'elevata incidenza di metastasi scheletriche, talvolta anche all'esordio della malattia, le quali sono frequentemente asintomatiche. La scintigrafia ossea total-body con 99mTc-fosfonati ha una elevata sensibilità diagnostica (>90-95%), con una specificità relativamente moderata (60-80% a seconda delle casistiche), nel rilevare le metastasi scheletriche. La sua sensibilità è superiore a quella della radiografia convenzionale (circa 70%) e del dosaggio delle fosfatasi alcalina e acida (50-60%), anticipando di circa 6 mesi la diagnosi della malattia scheletrica. L'elevata accuratezza di questa metodica consente di includere le affidabili informazioni da essa fornite negli algoritmi di cura dei pazienti¹. I dubbi interpretativi di questa metodica possono essere approfonditi ricorrendo all'esame tomografico dei segmenti ossei, impiegando la strumentazione ibrida (SPECT/CT) che ha dimostrato di ridurre la quota dei falsi positivi². Un'ulteriore valutazione delle aree sospette può essere effettuata con esami radiologici mirati, quali la TC o la RM.

Poiché la probabilità di sviluppare metastasi ossee negli stadi iniziali è estremamente bassa, l'esecuzione della scintigrafia ossea è comunemente evitata nei pazienti con PSA < 10 ng/ml e/o Gleason score ≤ 6 e/oneoplasia a molto basso /basso rischio in assenza di sintomi o segni biochimici (per es. incremento della fosfatasi alcalina). In particolare, nella pratica clinica

l'esecuzione della scintigrafia ossea a scopo stadiativo è effettuata nelle seguenti situazioni: 1) T1 clinico e PSA > 20 ng/ml, 2) T2 clinico e PSA > 10 ng/ml, oppure Gleason score \geq 8, 3) T3 o T4 clinico, 4) presenza di sintomi scheletrici associabili alla neoplasia [7].

La PET/TC con 18F-Fluoruro rappresenta una valida alternativa alla scintigrafia ossea con difosfonati per la ricerca della malattia scheletrica. Ha una sensibilità diagnostica superiore, pur mantenendo limitazioni nella specificità [51]. Non è comunemente utilizzata nella pratica clinica.

PET/TC con colina

Due meta-analisi hanno mostrato una sensibilità globale ed una specificità globale della 11C/18F-Colina PET/TC, per la valutazione della malattia linfonodale di 49,5% e 95% rispettivamente in 441 pazienti e di 62% e 92% rispettivamente in 609 pazienti [52]. La PET/TC con Colina radiomarcata potrebbe essere indicata per il completamento della stadiazione di pazienti a rischio alto o molto alto, per il vantaggio dell'acquisizione total-body che consente la valutazione locale e a distanza, con impatto sul trattamento pianificato. In tale scenario, la PET/TC con Colina radiomarcata sembrerebbe più sensibile e specifica della scintigrafia ossea e della TC, ma ad oggi le limitate evidenze scientifiche non ne consigliano l'uso sistematico.

Prostate-specific membrane antigen (PSMA) PET/TC

Il PSMA è un bersaglio attraente a causa della sua specificità per il tessuto prostatico, anche se l'espressione in altre neoplasie non prostatiche o condizioni benigne può determinare occasionalmente risultati falsi positivi [53, 54]

Uno studio prospettico multicentrico di fase III sull'imaging ha analizzato uomini con carcinoma prostatico a rischio intermedio ed elevato sottoposti a prostatectomia radicale (RP) e linfadenectomia pelvica (PLND) e ha mostrato una sensibilità e specificità della 68Ga-PSMA-11 PET del 0,40 (IC al 95%: 0,34-0,46) e 0,95 (IC al 95%: 0,92-0,97), rispettivamente [55]. Questi risultati sono linea con studi prospettici multicentrici precedenti che valutavano l'accuratezza di 68Ga-PSMA e 18F-DCFPyL PET/CT per la stadiazione linfonodale [56, 57].

In una revisione e meta-analisi che includeva 37 articoli, è stata eseguita un'analisi di sottogruppo per i pazienti sottoposti a PSMA PET/CT per la stadiazione primaria. Secondo l'analisi per paziente, la sensibilità e la specificità della 68Ga-PSMA PET erano rispettivamente del 77% e del 97% dopo l'eLND al momento della RP. Secondo l'analisi per lesione, la sensibilità e la specificità erano rispettivamente del 75% e del 99% [58].

Nonostante i risultati promettenti, l'imaging PET/CT basato su PSMA non può ancora sostituire per accuratezza la linfadenectomia chirurgica per l'N-staging [7].

Il primo studio randomizzato di fase 3, che ha confrontato la PET/TC con 68Ga-PSMA con l'imaging convenzionale (scintigrafia ossea e TC addome/pelvi) in termini di accuratezza diagnostica è stato pubblicato nel 2020 [47]. Lo studio, che ha incluso 302 pazienti affetti da neoplasia prostatica a rischio alto o molto alto, ha dimostrato la superiorità della PET/TC con PSMA rispetto all'imaging convenzionale, sia in termini di accuratezza diagnostica che relativamente alla guida ad una più corretta scelta terapeutica.

Gli autori riportano in particolare un incremento nell'area sotto la curva (AUC) per accuratezza diagnostica del 27% a favore di 68Ga-PSMA PET/TC vs. imaging convenzionale (92% vs. 65%, rispettivamente) ed un incremento del 13% nella corretta gestione del trattamento dei pazienti a favore di 68Ga-PSMA vs. imaging convenzionale (28% vs. 15%, rispettivamente $p=0,008$). Lo studio dimostra anche un potenziale vantaggio in termini di esposizione alle radiazioni che è risultata maggiore nei pazienti sottoposti a imaging tradizionale (19,2 mSv vs 8,4 mSv, $p<0,001$) [47].

In sintesi, la PSMA PET/CT è più sensibile nella stadiazione dei linfonodi rispetto alla MRI, alla TC con contrasto addominale o alla PET/CT con colina; tuttavia, le metastasi linfonodali di piccole dimensioni, al di sotto della risoluzione spaziale della PET (circa 5 mm), potrebbero comunque sfuggire alla rilevazione.

1.7 TRATTAMENTO DEL TUMORE DELLA PROSTATA LOCALIZZATO

Molti uomini con carcinoma prostatico localizzato potrebbero non trarre beneficio da un trattamento attivo, e il 45% degli uomini con carcinoma

prostatico diagnosticato tramite il test dell'antigene prostatico specifico (PSA) potrebbe essere candidato a un trattamento differito.

Negli uomini con comorbidità e un'aspettativa di vita limitata, il trattamento del carcinoma prostatico localizzato potrebbe essere rinviato per evitare una riduzione della qualità della vita (QoL).

Pazienti a rischio molto basso e basso [17]

Questi pazienti andrebbero adeguatamente informati sui risultati dei due trials randomizzati di confronto tra PR e vigile attesa (SPCG-4 e PIVOT trial) e del più recente PROTECT trial (confronto fra radioterapia, prostatectomia radicale e sorveglianza attiva) aggiornato al 2023 [59, 60]. Nello studio SPCG-4 la mortalità globale era significativamente ridotta nei pazienti sottoposti a PR rispetto a quelli sottoposti a watchful waiting), sebbene la mortalità cancro specifica non risultasse ridotta a 18 anni di follow up nel gruppo di pazienti a basso rischio [61, 62]. Tuttavia, in tale studio solo una minoranza di pazienti apparteneva al basso rischio, mentre la maggior parte presentava un tumore palpabile e un PSA superiore a 10. La riduzione della mortalità globale, non veniva riportata in modo significativo nello studio PIVOT (43% di tumori basso rischio) e nello studio PROTECT (78% tumori basso rischio) [63].

I tumori in stadio T1a non erano elegibili per lo studio SPCG-4 [61]. Tali tumori, considerati globalmente, se non trattati, progrediscono nel 5% dei casi a 5 anni e nel 10% circa dopo 10 anni, per cui, nei pazienti con un'attesa di vita di almeno 10-15 anni, il rischio di progressione è reale. Dopo l'intervento per adenoma della prostata, in caso di tumore T1a occorre ripetere il PSA e potrebbe essere utile, in casi selezionati, eseguire una RM multiparametrica (mRM) della prostata ed eventualmente biopsiare la ghiandola residua.

In questo gruppo di rischio, la chirurgia può essere offerta a pazienti con lunga aspettativa di vita, come alternativa alla sorveglianza attiva o alla radioterapia, qualora accettino il rischio di complicanze e di possibile *over treatment*. La linfadenectomia pelvica estesa non è necessaria nei pazienti a basso rischio con carcinoma localizzato perché l'incidenza di linfonodi positivi non supera il 5% [7].

Pazienti a rischio intermedio [17]

La prostatectomia radicale (PR) è uno dei trattamenti standard utilizzati nei pazienti con rischio intermedio e con un'aspettativa di vita superiore ai 10 anni [7].

Il tempo mediano alla progressione delle neoplasie T2 non trattate è di 6-10 anni. Lo stadio T2b progredisce in più del 70% dei pazienti entro 5 anni; questi dati sono stati confermati dagli studi randomizzati di confronto tra vigile attesa e chirurgia, con significativa riduzione della mortalità specifica a favore della PR [61]. Lo studio SPCG-4 ha dimostrato, a 18 anni di follow up, una riduzione significativa del rischio di mortalità globale (15,5%), cancro specifica (24,2%) e del rischio di metastasi (19,9%) nel gruppo con carcinoma a rischio intermedio trattato con PR versus osservazione [62]. Nell'update a 29 anni di follow up, la PR conserva un vantaggio di 2,9 anni di vita guadagnati rispetto all'osservazione. Nei pazienti a rischio intermedio, il rischio di positività istologica linfonodale è tra il 3,7% ed il 21,1%. Nello studio PIVOT di confronto fra PR ed osservazione in pazienti affetti da neoplasie T1-T2, con un follow up di quasi 20 anni, si è osservata una riduzione significativa della mortalità globale in quelli con PSA > 10 ng/ml (HR 0,73; LC95%: 0,54 – 0,98) e in quelli a rischio intermedio (HR: 0,68; LC95%: 0,50–0,92) [63].

La linfadenectomia dovrebbe essere effettuata qualora il rischio di N+ sia maggiore del 5-7% a seconda del nomogramma impiegato, altrimenti può venire omessa [64].

Pazienti a rischio alto e molto alto [17]

Queste categorie di rischio comprendono in realtà pazienti relativamente eterogenei dal punto di vista prognostico, con malattia organo-confinata associata a Gleason score 8-10 o con un PSA>20 ng/ml, oppure con malattia non organo confinata [7, 17]. Il ruolo della PR nel trattamento dei pazienti ad alto rischio è ancora controverso, per la mancanza di studi prospettici di confronto con radioterapia a fasci esterni combinata alla terapia ormonale. Alla luce di queste premesse, la PR è una opzione terapeutica che può essere prospettata a pazienti selezionati, con una speranza di vita adeguata, fortemente motivati ad affrontare un trattamento certamente invasivo che

spesso rende necessari trattamenti combinati come radioterapia (RT) e ormonoterapia, in assenza di comorbidità importanti e di controindicazioni alla procedura chirurgica. In questi pazienti l'indicazione alla PR presuppone l'esecuzione di una linfadenectomia pelvica estesa [7].

Radioterapia

La radioterapia a fasci esterni è un'opzione di trattamento standard per gli uomini con cancro alla prostata localizzato e conferisce a lungo termine risultati sovrapponibili a quelli della prostatectomia radicale sul controllo di malattia [59]. I miglioramenti tecnologici nella diagnostica per immagini e nella pianificazione e somministrazione dei trattamenti degli ultimi due decenni hanno portato ad una serie di progressi in ambito radioterapico. In particolare, questi includono l'uso di trattamenti ad intensità modulata e i trattamenti guidati dalle immagini (IGRT) [7]; questi progressi tecnologici hanno consentito in particolare l'implementazione di programmi di dose-escalation sulla prostata, migliorando così l'indice terapeutico.

Lo studio PROTECT [59] ha dimostrato che nei pazienti a rischio molto basso, basso e intermedio, la PR, la RT a fasci esterni e la brachiterapia producono risultati a 10 e a 15 anni sovrapponibili in termini di sopravvivenza globale, di ripresa biochimica e di ricaduta a distanza della malattia. Anche i principali studi di *outcomes* suggeriscono che chirurgia e radioterapia producono risultati comparabili a 10 anni [7]. Ancora oggi, in alcuni centri, il trattamento radiante è tuttavia riservato ai pazienti più anziani, a quelli con co-morbidità che controindichino una procedura chirurgica maggiore o a quelli che, indipendentemente dall'età, vogliono evitare le sequele più frequentemente causate dalla chirurgia (incontinenza urinaria, disfunzioni erettili). Questo atteggiamento non trova robuste giustificazioni su base scientifica. E' parere condiviso dalla comunità scientifica che i pazienti con malattia localizzata vengano adeguatamente informati sul potenziale impatto in termini di qualità di vita associato alle varie opzioni terapeutiche e che, in ogni caso, il trattamento sia pianificato da un gruppo multidisciplinare di esperti [7, 17].

PARTE SPERIMENTALE

2.1 BACKGROUND

L'evoluzione delle tecnologie diagnostiche sta rivoluzionando l'approccio alla stadiazione primaria del PCa localizzato.

Recenti studi hanno dimostrato la superiorità della PSMA PET/CT rispetto all'imaging convenzionale in termini di accuratezza diagnostica nello staging in pazienti con PCa [47, 65].

La probabilità di positività per la PSMA-PET/CT è influenzata da diversi parametri e diversi modelli predittivi sono stati proposti per selezionare i pazienti che potrebbero trarre il massimo beneficio dall'immagine PSMA-PET/CT [66–68]. È stato dimostrato che l'analisi immunohistochimica dell'espressione di PSMA sul campione istologico definitivo può essere uno strumento utile per l'interpretazione delle scansioni PSMA PET/CT [69–72].

Come evidenziato da studi di immunohistochimica è noto che esista un'espressione eterogenea di PSMA sia nei tumori primari che nelle metastasi a distanza [73]. Inoltre, è stato riportato che una percentuale variabile tra il 5 e il 10% dei PCa primitivi non è dotato di significativa captazione di ^{68}Ga -PSMA, determinando pertanto un risultato falsamente negativo della PET/CT, nonostante i livelli di PSA [66, 73–75].

Definire i fattori istopatologici e molecolari dell'eterogeneità intra- ed inter-paziente di espressione del PSMA rappresenta pertanto ad oggi un *unmet need* in considerazione della ricaduta sull'accuratezza diagnostica della PET/CT. L'identificazione di biomarcatori o l'impiego di tecniche di analisi avanzate, come l'immunohistochimica, nel contesto preoperatorio, potrebbe guidare la selezione dell'imaging diagnostico più appropriato in base alle caratteristiche uniche di ciascun paziente, aprendo la strada a una gestione più precisa e ottimizzata della malattia. Abbiamo pertanto condotto uno studio prospettico con lo scopo di analizzare il ruolo predittivo dell'espressione immunohistochimica del PSMA sui frustoli di biopsia prostatica positivi per PCa rispetto ai parametri della PSMA PET/CT nel contesto della stadiazione.

2.2 MATERIALI E METODI

2.2.1 Selezione del campione

Sono stati prospetticamente selezionati i pazienti candidati a prostatectomia radicale robotica (RARP) come trattamento primario presso il nostro centro da giugno 2021 a dicembre 2022.

Sono stati inclusi: pazienti con diagnosi di tumore della prostata confermato alla biopsia prostatica (eseguita presso il nostro centro con approccio transrettale) e indicazione a trattamento chirurgico; pazienti classificati ad alto e intermedio rischio secondo le classi EAU [7] (PSA >10 ng/mL o GS > 7 - grado ISUP 2/3/4/5- o stadio clinico superiore o uguale a cT2b). I pazienti sono stati sottoposti a prelievi target (tecnica fusion) + standard o solo prelievi standard sulla base dell'esito della mRM. Tutti i pazienti hanno ricevuto una stadiazione preoperatoria con 68Ga-PSMA-PET entro 4 settimane della chirurgia e mRM prostatica.

Per ogni reperto positivo alla PET/CT è stato registrato lo *Standardized Uptake Value* massimo (SUV_{max}) così come la sede e la dimensione dei reperti positivi identificati. Le RM eseguite presso il nostro centro sono state refertate secondo il sistema MRI *Prostate Imaging – Reporting and Data System* (PI-RADS) v2.1 score [76]. Le mRM eseguite in altra sede sono state centralmente revisionate.

Sono stati esclusi i pazienti con precedente radioterapia pelvica o terapia ormonale e/o pazienti non candidabili a trattamento radicale sulla base della stadiazione preoperatoria. Dopo l'intervento chirurgico i pazienti sono stati sottoposti a follow-up secondo le raccomandazioni delle linee guida EAU [7]. Specificamente, è stato raccomandato un dosaggio del PSA a 40-45 giorni dall'intervento chirurgico e successivamente trimestralmente per il primo anno con contestuale visita urologica. A seguire, in caso di risposta biochimica completa (PSA < 0.1 ng/ml), è stato raccomandato un dosaggio del PSA eseguito semestralmente.

2.2.2 Analisi immunoistochimica

Per ciascun paziente, è stata condotta l'analisi immunoistochimica per ogni

inclusione corrispondente a ciascun grado ISUP presente nei frustoli di biopsia prostatica. Nel caso di più frustoli positivi per lo stesso grado ISUP, è stato selezionato quello con la percentuale maggiore di tumore.

Inoltre, è stata eseguita l'immunoistochimica sui blocchetti in paraffina corrispondenti all'*index lesion* nell'istologico definitivo della prostatectomia radicale, che è stata valutata mediante macrosezioni.

L'*index lesion* è stata definita come il nodulo di adenocarcinoma prostatico più voluminoso su istologico definitivo [77].

Per l'immunocolorazione dell'antigene PSMA (clone EP192, 10µg/ml, Cell Marque) sono state utilizzate sezioni dello spessore di µm 2 di tessuto fissato in formalina, incluso in paraffina. L'immunoistochimica è stata eseguita sulla piattaforma Benchmark ULTRA (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) con procedura automatica. Nello specifico, la procedura di smascheramento antigenico è stata eseguita mediante l'utilizzo del tampone EDTA borato (pH8) a 98°C per un totale di 36 minuti e la successiva incubazione con anticorpo PSMA è avvenuta a temperatura ambiente per una durata di 32 minuti. Per lo sviluppo della reazione è stato utilizzato UltraView DAB IHC Detection Kit. Le sezioni sono state infine controcolorate con Ematossilina e successivamente analizzate.

L'analisi immunoistochimica è stata eseguita da un uro-patologo dedicato (NP).

I risultati dell'immunocolorazione sono stati riportati utilizzando l'*immunoreactive score* (IRS). L'IRS è un punteggio da 0 a 12 sulla base dell'intensità di colorazione e della percentuale di cellule a colorazione positiva [78]. Il punteggio dell'IRS è stato inoltre riportato secondo la classificazione a 4 punti proposta da Kaemmerer et al. (4 punti da 0 a 3) [78].

Per l'analisi statistica relativa alle variabili di espressione immunoistochimica sui frustoli biopistici è stato considerato per ogni paziente il valore medio di IRS, il valore medio del 4-point IRS e la percentuale media di cellule PSMA-positive.

2.2.3 Scopo dello studio

Sono stati raccolti i dati relativi alle variabili clinico-demografiche per caratterizzare il campione. Lo scopo principale di questo studio è stato di

valutare se le caratteristiche immunoistochimiche rilevate nei campioni di frustoli di biopsia prostatica siano indicative in modo coerente dell'espressione del PSMA del blocco vescicolo-prostatico. Inoltre, è stata esaminata come endpoint secondario la correlazione tra espressione del PSMA all'immunoistochimica su biopsia/blocco vescicolo-prostatico e parametri di captazione di ^{68}Ga -PSMA alla PET/CT. Infine, sono stati riportati i dati relativi al follow-up oncologico a breve termine. Specificamente sono stati valutati: la persistenza postoperatoria del PSA (PSA > 0.1 ng/mL entro 4 - 8 settimane dalla chirurgia), il tasso di recidiva biochimica del PSA (PSA > 0.2 ng/ml), eventuali terapie adiuvanti e di salvataggio durante il follow up.

2.2.4 Analisi statistica

La statistica descrittiva ha incluso frequenze e proporzioni per le variabili categoriche. Sono stati riportati media, mediana e range interquartile (IQR) per le variabili codificate in modo continuo.

Il *Gwet's agreement coefficient* per variabili ordinali (AC1) [79] è stato utilizzato per calcolare il grado di agreement tra l'espressione immunoistochimica di PSMA sui frustoli di biopsia (calcolato come 4-point IRS medio) e sull'*index lesion* dell'istologico definitivo. Per tale analisi, l'immuno-espressione è stata categorizzata come 4-point IRS < 2 e 4-point IRS \geq 2.

Sono stati eseguiti modelli di regressione lineare uni- e multivariata per valutare l'impatto dell'IRS di biopsia e istologico definitivo (codificato come variabile continua da 0 a 12) sul valore di SUVmax (codificato come variabile continua). Come covariate per aggiustare i modelli di regressione sono state utilizzate: la percentuale media di cellule PSMA-positivo su campioni biopsici, la percentuale di cellule PSMA-positivo sull'istologico positivo, il volume totale del tumore rispetto al volume della prostata, il PSA alla diagnosi, (tutte variabili codificate come continue), il grado ISUP più alto sui frustoli di biopsia (ISUP 2-3 vs. 4-5), la classe di rischio secondo la stratificazione delle linee guida EAU (intermedio localizzato vs. alto rischio localizzato + alto rischio localmente avanzato).

Considerando la fase di studio iniziale e l'assenza di modelli analoghi in letteratura, per sviluppare il miglior modello di regressione lineare

utilizzando le variabili preoperatorie e l'IRS medio dei frustoli biotici, è stata utilizzata una procedura di regressione *stepwise forward* [80].

Il software R environment for statistical computing and graphics (version 4.1.2) è stato utilizzato per tutte le analisi statistiche. Tutti i test sono stati a due code con un livello di significatività fissato a $p < 0.05$.

2.3 RISULTATI

Le caratteristiche descrittive del campione sono state riportate nella tabella 1. Sono stati prospetticamente selezionati 50 pazienti di cui 23 (46%) con adenocarcinoma prostatico localizzato a rischio intermedio, 20 (40%) con tumore localizzato ad alto rischio e 7 (14%) con tumore localmente avanzato secondo le classi di rischio EAU per la recidiva biochimica [7].

Variabile	RARP (n = 50)
Età (anni), mediana (IQR)	68 (63, 71)
BMI (kg/cm²), mediana (IQR)	26,1 (24,1, 28)
PSA (ng/ml), mediana (IQR)	7 (4, 11)
Volume prostatico (ml), mediana (IQR)*	49 (40, 59)
Setting biotico, n (%)	
Prima biopsia	44 (88)
Seconda biopsia	6 (12)
Approccio biotico, n (%)	
Transrettale con tecnica fusion**	37 (74)
Transrettale standard	13 (26)
N° totale di prelievi, mediana (IQR)	12 (12, 15)
N° totale di prelievi positivi, mediana (IQR)	7 (5, 9)
EAU risk groups for BCR, n (%)	
Localizzato, rischio intermedio	23 (46)
Localizzato, alto rischio	20 (40)
Localmente avanzato, alto rischio	7 (14)
ISUP grade group alla biopsia, n (%)	

Variabile	RARP (n = 50)
2	10 (20)
3	27 (54)
4-5	13 (26)
PI-RADS, n (%)	
2	1 (2)
3	7 (14)
4	21 (42)
5	21 (42)
ASA score [81], n (%)	
1	12 (24)
2	32 (64)
3	6 (12)

RARP = prostatectomia radicale robot-assisted; IQR = interquartile range; BMI = body mass index; PSA = prostate specific antigen; N° = numero; EAU = European Association of Urology; ISUP grade = International Society of Urological Pathology 2014 grade (group) system; BCR = biochemical recurrence; PI-RADS = MRI Prostate Imaging – Reporting and Data System; ASA score = American Society of Anesthesiologists Physical Status Classification System [81].

** Volume prostatico misurato con la risonanza magnetica.*

*** Tecnica fusion: prelievi standard + target.*

Tabella 1 – Caratteristiche preoperatorie di 50 pazienti sottoposti a prostatectomia radicale robot-assistita (RARP) presso un singolo centro ad alto volume, da giugno 2021 a dicembre 2022.

L'esame istologico definitivo ha rilevato 15 (30%) pazienti con adenocarcinoma prostatico di tipo acinare con grado ISUP 2, 30 (60%) casi con grado ISUP 3 e 5 (10%) casi con grado ISUP 4-5, rispettivamente (Tabella 2).

È stato riportato un volume mediano del tumore di 11 cc (range interquartile [IQR] 8, 18) con percentuale mediana del 22% (IQR 15, 33) rispetto al volume prostatico. In 7 (14%) casi non c'è stata una risposta biochimica completa postoperatoria e 4 (8.2%) pazienti hanno avuto una recidiva biochimica a un follow up mediano di 12 mesi (IQR 8, 16). In totale 10 (20%) pazienti hanno ricevuto terapia di salvataggio (Tabella 2).

Variabile	RARP (n = 50)
OT (min), mediana (IQR)	220 (190, 256)
EBL (ml), mediana (IQR)	150 (100, 200)
LOS (giorni), mediana (IQR)	6 (4,5, 7)
ISUP grade*, n (%)	
2	15 (30)
3	30 (60)
4-5	5 (10)
Volume della neoplasia (cc), mediana (IQR)	11 (8, 18)
Percentuale di volume neoplastico (%), mediana (IQR)	22 (15, 33)
pT, n (%)	
T2c	30 (60)
T3a	9 (18)
T3b	11 (22)
pN, n (%)	
0	37 (74)
1	10 (20)
x	3 (6)
Persistenza del PSA**, n (%)	7 (14)
Complete biochemical response, n (%)	38 (78)
BCR, n (%)	4 (8,2)
Radioterapia adiuvante, n (%)	4 (8,2)
Terapia ormonale adiuvante, n (%)	3 (6,2)
Terapia di salvataggio, n (%)	
Radioterapia + terapia ormonale	4 (8)
Radioterapia	5 (10)
Terapia ormonale	1 (2)
Follow-up (mesi), mediana, IQR	12 (8, 16)
Lost to follow-up	1 (2)

RARP = prostatectomia radicale robot-assisted; IQR = interquartile range; OT = operative time; EBL = estimated blood loss; LOS = length of stay; N° = numero, EAU = European Association of Urology; BCR = biochemical recurrence; ISUP grade = International Society of Urological Pathology 2014 grade (group) system.

* ISUP grade su istologico definitivo.

** Persistenza del PSA = post-RARP, PSA > 0.1 ng/mL entro 4 - 8 settimane dalla chirurgia.

Tabella 2 – Outcomes chirurgici, patologici e oncologici di 50 pazienti sottoposti a prostatectomia radicale robot-assistita (RARP) presso un singolo centro ad alto volume, da giugno 2021 a dicembre 2022.

È stato riportato un valore di SUV_{max} mediano di 10 (IQR 6, 15). La mediana dell'IRS medio valutato sui frustoli di biopsia è stata di 6 (IQR 4, 8,8), con 11 (22%) pazienti aventi un 4-point IRS < 2 e 39 (78%) pazienti con 4-point IRS \geq 2.

La mediana della percentuale media di cellule PSMA-positive su campioni bioptici è del 74% (IQR 50, 87). Per quanto riguarda l'index lesion dell'istologico definitivo, l'IRS mediano è stato di 7 (4, 9) con 7 (14%) pazienti aventi un 4-point IRS < 2 e 43 (86%) pazienti con 4-point IRS \geq 2) (figura 1 e 2). La mediana della percentuale media di cellule PSMA-positive sull'index lesion dell'istologico definitivo è del 75% (IQR 60, 95) (Tabella 3).

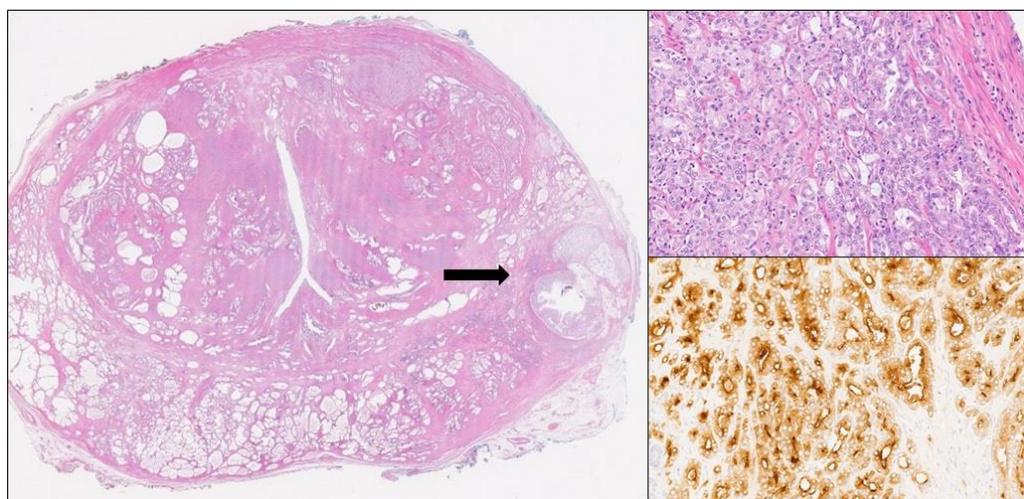


Figura 1: fotografia esemplificativa di un adenocarcinoma prostatico (segnalato con freccia nell'immagine a sinistra, EE, 0,15x; dettaglio nell'immagine in alto a destra, EE, 20x) con intensa positività all'immunocolorezione per PSMA (immagine in basso a destra, PSMA, 20x).

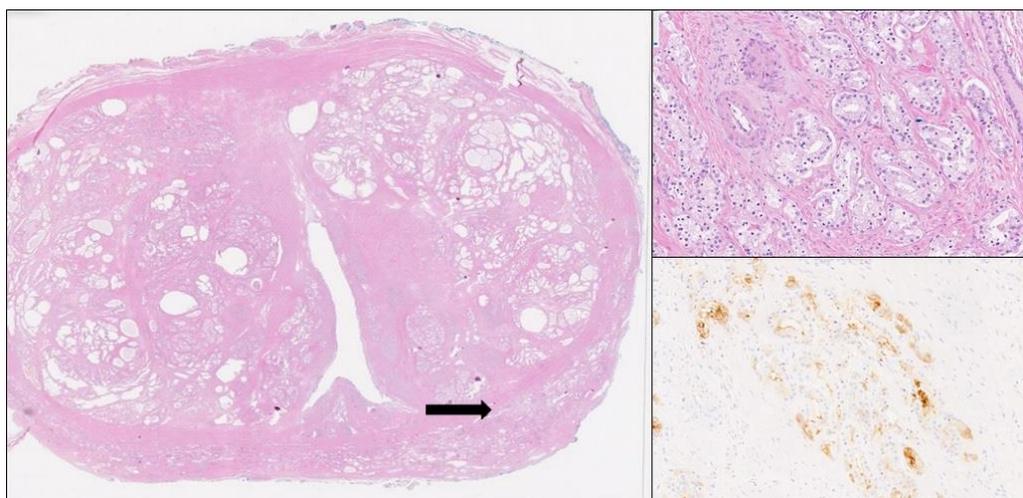


Figura 2: fotografia esemplificativa di un adenocarcinoma prostatico (segnalato con freccia nell'immagine a sinistra, EE, 0,15x; dettaglio nell'immagine in alto a destra, EE, 20x) con debole positività all'immunocolorazione per PSMA (immagine in basso a destra, PSMA, 20x).

Variabile	RARP (n = 50)
SUV_{max} PET-PSMA, mediana (IQR)	10 (6, 15)
Mediana IRS medio su campioni bioptici (IQR)	6 (4, 8,8)
Mediana 4-point IRS medio su campioni bioptici (IQR)	2 (2, 3)
4-point IRS su campioni bioptici, < 2, n (%)	11 (22)
4-point IRS su campioni bioptici ≥ 2, n (%)	39 (78)
Mediana percentuale media di cellule PSMA-positivo su campioni bioptici (IQR)*	74 (50, 87)
IRS (istologico definitivo), mediana (IQR)	7 (4, 9)
4-point IRS (istologico definitivo), mediana (IQR)	2 (2, 3)
IRS (istologico definitivo) < 2, n (%)	7 (14)
IRS (istologico definitivo) ≥ 2, n (%)	43 (86)
Percentuale di cellule PSMA-positivo (istologico definitivo), mediana (IQR)	75 (60, 95)

IQR = interquartile range; IRS = immunoreactive score.

Tabella 3 – Caratteristiche immunoistochimiche e della [68Ga] Ga-PSMA-I&T PET di 50 pazienti sottoposti a prostatectomia radicale robot-assistita (RARP) presso un singolo centro ad alto volume, da giugno 2021 a dicembre 2022

La percentuale semplice di concordanza tra l'espressione immunoistochimica di PSMA sui frustoli di biopsia (calcolato come 4-point IRS medio) e sull'index lesion dell'istologico definitivo è risultata dell'80%, con un AC1 = 0,72 (intervallo di confidenza [CI 0,5-0,9]) statisticamente significativo ($p < 0.001$).

Secondo l'analisi di regressione lineare univariata, la percentuale media di cellule PSMA-positiva su campioni bioptici e l'IRS medio su campioni bioptici impattano significativamente il SUV_{max} ($\beta = 1.2$, CI 1.04-1.45, $p = 0.02$ e $\beta = 7.5$, CI 1.2-3.1, $p = 0.008$, rispettivamente) (Tabella 4a).

Secondo i modelli di regressione multivariata, sia la percentuale di cellule PSMA-positiva dell'index lesion sia l'IRS dell'index lesion sono risultati predittori statisticamente significativi del SUV_{max} , dopo aggiustamento per il volume della neoplasia ($\beta = 1.22$, CI 1.05-1.4, $p = 0.01$ e $\beta = 6.66$, CI 2.03-21.8, $p = 0.01$, rispettivamente) (Tabella 4b, 4c).

Dall'analisi di regressione stepwise, il modello di regressione lineare migliore includente variabili preoperatorie e l'IRS medio dei frustoli bioptici, include solo l'IRS medio come predittore (AIC = 208).

Variabile	Coefficienti stimati¹	95% CI¹	p-value
Percentuale media di cellule PSMA-positiva su campioni bioptici	1.2	1.04, 1.45	0.02
IRS medio su campioni bioptici	7.5	2.2, 26.3	0.003
Volume della neoplasia (cc)	1.9	1.2, 3.1	0.008
PSA (ng/ml)	1.17	0.7, 1.9	0.6
ISUP grade group alla biopsia			
2-3	Ref.		
4-5	43	2.7, 717	0.04*
EAU risk groups for BCR			

Variabile	Coefficienti stimati ¹	95% CI ¹	p-value
Localizzato, rischio intermedio	Ref.		
Alto rischio localizzato e localmente avanzato	57	3.6, 957	0.09*

Tabella 4a – Modelli di regressione lineare univariata per testare i predittori indipendenti per il valore di SUV_{max} della PET PSMA di stadiazione.

* overfitting

Variabile	Coefficienti stimati ¹	95% CI ¹	p-value
Percentuale di cellule PSMA-positive (istologico definitivo)	1.22	1.05, 1.4	0.01
Volume della neoplasia (cc)	1.93	1.2, 2.9	0.005

Tabella 4b – Modelli di regressione lineare multivariata per testare i predittori indipendenti per il valore di SUV_{max} della PET PSMA di stadiazione.

Variabile	Coefficienti stimati ¹	95% CI ¹	p-value
IRS (istologico definitivo)	6.66	2.03, 21.8	0.01
Volume della neoplasia (cc)	1.76	1.14, 2.71	0.01

CI = confidence interval; IRS = immunoreactive score.

Tabella 4c – Modelli di regressione lineare multivariata per testare i predittori indipendenti per il valore di SUV_{max} della PSMA PET PSMA di stadiazione.

2.4 DISCUSSIONE

Negli ultimi anni, con la diffusione della PET/CT PSMA per la stadiazione del tumore alla prostata [47], si è riconosciuta l'importanza di approfondire i determinanti istopatologici e molecolari dell'eterogeneità intra- ed inter-paziente di espressione del PSMA in considerazione delle potenziali ricadute sull'accuratezza diagnostica della metodica.

La nostra analisi rappresenta il primo tentativo riportato in letteratura di caratterizzazione bioptica e postoperatoria dell'espressione del PSMA.

I risultati ottenuti hanno fornito informazioni significative su come variabili istopatologiche e molecolari pre- e post-operatorie possano influenzare l'immagine della PET/CT PSMA.

Primo, abbiamo dimostrato una correlazione elevata (statisticamente significativa) tra il pattern di espressione di PSMA dei frustoli bioptici e dell'*index lesion* del campione istologico definitivo. Questo risultato sottolinea che l'analisi immunohistochimica effettuata sui campioni bioptici, come descritto nei dettagli della metodologia, può fornire dati coerenti con le caratteristiche del tumore prostatico stesso.

Lo sviluppo di una strategia di diagnostica molecolare basata sulla biopsia ha il potenziale di offrire un imaging personalizzato e adattato alle caratteristiche del tumore. Attualmente, questo dato è stato confermato da un precedente studio che ha valutato l'impatto prognostico dell'analisi immunohistochimica del PSMA sui frustoli bioptici [82]. Benché poche ricerche abbiano esplorato lo stesso topic, queste hanno riconosciuto l'interesse nell'affermare quanto abbiamo raggiunto con la nostra analisi [72, 78, 83].

Secondo, abbiamo analizzato i parametri istopatologici e i pattern di espressione immunohistochimica del PSMA sui frustoli bioptici e sui campioni di prostatectomia radicale. Abbiamo dimostrato che la percentuale media di cellule PSMA-positivo e l'IRS medio dei frustoli di biopsia sono predittori del livello di SUV_{max} . Inoltre, secondo i modelli di regressione multivariata, abbiamo trovato che l'IRS e la percentuale di cellule PSMA-positivo dell'istologico definitivo predicono il livello di SUV_{max} .

I risultati indicano che l'espressione del PSMA nei campioni di biopsie (così come nell'istologico definitivo) può fornire indicazioni sull'intensità del segnale PSMA PET/CT e questi dati potrebbero essere utilizzati per prevedere come il tumore risponderà alla valutazione imaging con PSMA PET/CT. Questo aspetto potrebbe avere delle ricadute sia durante l'iter diagnostico di stadiazione del tumore della prostata (imaging standard vs.

PSMA PET/CT) che in caso di recidiva biochimica (PET colina vs. PSMA PET/CT).

In letteratura sono presenti studi che hanno analizzato lo stesso argomento con dati pressoché allineati ai nostri.

Rüschoff et al. hanno analizzato i reperti istopatologici e i pattern di espressione immunohistochimica del PSMA su campioni di prostatectomia radicale, correlandoli alle caratteristiche della ^{68}Ga -PSMA-PET/CT [83].

Secondo la loro analisi, la percentuale di cellule PSMA-negative, il pattern di crescita infiltrativo, un minor diametro tumorale e il grado ISUP 2 sono significativamente correlati con valori di SUV_{max} inferiori [83].

In considerazione di tutti gli aspetti citati, l'impatto nella pratica clinica dell'analisi immunohistochimica sui frustoli di biopsia prostatica potrebbe offrire un valido supporto per definire il miglior iter diagnostico paziente-specifico.

Inoltre, alcuni studi hanno dimostrato che l'intensità di captazione di PSMA da parte del tumore primitivo sui frustoli di biopsia prostatica rappresenta un predittore indipendente di prognosi sfavorevole [82] così come l'espressione immunohistochimica del PSMA sul campione istologico definitivo [71, 84, 85]. Hupe et al hanno valutato il valore prognostico dell'espressione di PSMA sui frustoli che esprimevano il massimo grado ISUP nei pazienti affetti da tumore della prostata biopsie. I risultati hanno dimostrato che un'alta espressione di PSMA sia nella biopsia che nell'istologico definitivo è associata a un maggior rischio di recidiva biochimica della malattia [82].

Sulla base dei nostri risultati e dei dati presenti in letteratura, crediamo che valutare l'espressione di PSMA sulle biopsie prostatiche abbia un grande potenziale per essere implementato come biomarcatore aggiuntivo nella gestione preoperatoria dei pazienti affetti da tumore della prostata.

Tuttavia, alcuni limiti del presente studio devono essere citati. Il campione analizzato è piccolo e il numero di eventi non consente di sviluppare modelli di regressione solidi per il rischio di overfitting. Un punto di forza è rappresentato dal disegno prospettico.

Il nostro studio rappresenta un input innovativo per includere nel percorso diagnostico preoperatorio del paziente l'analisi immunohistochimica dei

frustoli di biopsia. Ricerche future sono necessarie per definire con maggior potenza statistica il ruolo dell'immunoistochimica nel setting preoperatorio,

2.3 CONCLUSIONE

L'analisi immunoistochimica dell'espressione del PSMA dei frustoli di biopsia prostatica ha un elevato grado di agreement con l'espressione immunoistochimica del PSMA dell'istologico definitivo. Il grado di espressione di PSMA è un predittore indipendente del livello di SUV_{max}.

Valutare l'espressione immunoistochimica di PSMA in un setting preoperatorio può avere importanti implicazioni nella definizione di un iter diagnostico più accurato paziente-specifico.

BIBLIOGRAFIA

1. IARC. WHO. Data visualization tools for exploring the global cancer burden in 2020. Access date December 2022.
2. Culp MB, Soerjomataram I, Efstathiou JA, et al (2020) Recent Global Patterns in Prostate Cancer Incidence and Mortality Rates. *Eur Urol* 77:38–52. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2019.08.005>
3. Bell KJL, Del Mar C, Wright G, et al (2015) Prevalence of incidental prostate cancer: A systematic review of autopsy studies. *Int J Cancer* 137:1749–1757. <https://doi.org/10.1002/ijc.29538>
4. Haas GP, Delongchamps N, Brawley OW, et al (2008) The worldwide epidemiology of prostate cancer: perspectives from autopsy studies. *Can J Urol* 15:3866–3871
5. Fleshner K, Carlsson SV, Roobol MJ (2017) The effect of the USPSTF PSA screening recommendation on prostate cancer incidence patterns in the USA. *Nat Rev Urol* 14:26–37. <https://doi.org/10.1038/nrurrol.2016.251>
6. Kimura T, Sato S, Takahashi H, Egawa S (2021) Global Trends of Latent Prostate Cancer in Autopsy Studies. *Cancers* 13:359. <https://doi.org/10.3390/cancers13020359>
7. (2022) EAU EANM ESTRO ESUR ESUP SIOG Guidelines on Prostate Cancer 2022
8. Beebe-Dimmer JL, Kapron AL, Fraser AM, et al (2020) Risk of Prostate Cancer Associated With Familial and Hereditary Cancer Syndromes. *J Clin Oncol* 38:1807–1813. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.02808>
9. Bratt O, Drevin L, Akre O, et al (2016) Family History and Probability of Prostate Cancer, Differentiated by Risk Category: A Nationwide Population-Based Study. *J Natl Cancer Inst* 108:djw110. <https://doi.org/10.1093/jnci/djw110>
10. Gulati R, Cheng HH, Lange PH, et al (2017) Screening Men at Increased Risk for Prostate Cancer Diagnosis: Model Estimates of Benefits and Harms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 26:222–227. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-16-0434>
11. The Profile Study, Australian Prostate Cancer BioResource (APCB), The IMPACT Study, et al (2018) Association analyses of more than 140,000 men identify 63 new prostate cancer susceptibility loci. *Nat Genet* 50:928–936. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0142-8>
12. Giri VN, Hegarty SE, Hyatt C, et al (2019) Germline genetic testing for inherited prostate cancer in practice: Implications for genetic testing, precision therapy, and cascade testing. *The Prostate* 79:333–339. <https://doi.org/10.1002/pros.23739>

13. Nicolosi P, Ledet E, Yang S, et al (2019) Prevalence of Germline Variants in Prostate Cancer and Implications for Current Genetic Testing Guidelines. *JAMA Oncol* 5:523. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.6760>
14. Nyberg T, Frost D, Barrowdale D, et al (2020) Prostate Cancer Risks for Male BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: A Prospective Cohort Study. *Eur Urol* 77:24–35. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2019.08.025>
15. Castro E, Goh C, Olmos D, et al (2013) Germline *BRCA* Mutations Are Associated With Higher Risk of Nodal Involvement, Distant Metastasis, and Poor Survival Outcomes in Prostate Cancer. *J Clin Oncol* 31:1748–1757. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.43.1882>
16. Na R, Zheng SL, Han M, et al (2017) Germline Mutations in *ATM* and *BRCA1/2* Distinguish Risk for Lethal and Indolent Prostate Cancer and are Associated with Early Age at Death. *Eur Urol* 71:740–747. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.11.033>
17. Schaeffer E, Srinivas S, Antonarakis ES, et al (2021) NCCN Guidelines Insights: Prostate Cancer, Version 1.2021. *J Natl Compr Cancer Netw JNCCN* 19:134–143. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2021.0008>
18. (2017) Brierley, J.D., et al., TNM classification of malignant tumors. UICC International Union Against Cancer. 8th edn. 2017.
19. Cooperberg MR, Pasta DJ, Elkin EP, et al (2005) THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA, SAN FRANCISCO CANCER OF THE PROSTATE RISK ASSESSMENT SCORE: A STRAIGHTFORWARD AND RELIABLE PREOPERATIVE PREDICTOR OF DISEASE RECURRENCE AFTER RADICAL PROSTATECTOMY. *J Urol* 173:1938–1942. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000158155.33890.e7>
20. Ceci F, Oprea-Lager DE, Emmett L, et al (2021) E-PSMA: the EANM standardized reporting guidelines v1.0 for PSMA-PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 48:1626–1638. <https://doi.org/10.1007/s00259-021-05245-y>
21. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, et al (2016) The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am J Surg Pathol* 40:244–252. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000530>
22. Van Leenders GJLH, Van Der Kwast TH, Grignon DJ, et al (2020) The 2019 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 44:e87–e99. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001497>
23. Surintranont J, Zhou M (2022) Prostate Pathology: What is New in the 2022 WHO Classification of Urinary and Male Genital Tumors? *Pathologica* 115:41–56. <https://doi.org/10.32074/1591-951X-822>

24. Tosoian JJ, Alam R, Ball MW, et al (2018) Managing high-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and atypical glands on prostate biopsy. *Nat Rev Urol* 15:55–66. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.134>
25. Epstein JI, Herawi M (2006) Prostate needle biopsies containing prostatic intraepithelial neoplasia or atypical foci suspicious for carcinoma: implications for patient care. *J Urol* 175:820–834. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)00337-X](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)00337-X)
26. Montironi R, Zhou M, Magi-Galluzzi C, Epstein JI (2018) Features and Prognostic Significance of Intraductal Carcinoma of the Prostate. *Eur Urol Oncol* 1:21–28. <https://doi.org/10.1016/j.euo.2018.03.013>
27. Shah RB, Nguyen JK, Przybycin CG, et al (2019) Atypical intraductal proliferation detected in prostate needle biopsy is a marker of unsampled intraductal carcinoma and other adverse pathological features: a prospective clinicopathological study of 62 cases with emphasis on pathological outcomes. *Histopathology* 75:346–353. <https://doi.org/10.1111/his.13878>
28. Epstein JI, Egevad L, Humphrey PA, Montironi R (2014) Best Practices Recommendations in the Application of Immunohistochemistry in the Prostate: Report From the International Society of Urologic Pathology Consensus Conference. *Am J Surg Pathol* 38:e6–e19. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000238>
29. Gurel B, Ali TZ, Montgomery EA, et al (2010) NKX3.1 as a marker of prostatic origin in metastatic tumors. *Am J Surg Pathol* 34:1097–1105. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3181e6cbf3>
30. Magi-Galluzzi C (2018) Prostate cancer: diagnostic criteria and role of immunohistochemistry. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* 31:S12–21. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2017.139>
31. Epstein JI, Amin MB, Fine SW, et al (2021) The 2019 Genitourinary Pathology Society (GUPS) White Paper on Contemporary Grading of Prostate Cancer. *Arch Pathol Lab Med* 145:461–493. <https://doi.org/10.5858/arpa.2020-0015-RA>
32. Richie JP, Catalona WJ, Ahmann FR, et al (1993) Effect of patient age on early detection of prostate cancer with serum prostate-specific antigen and digital rectal examination. *Urology* 42:365–374. [https://doi.org/10.1016/0090-4295\(93\)90359-i](https://doi.org/10.1016/0090-4295(93)90359-i)
33. Mettlin C, Lee F, Drago J, et al (1991) The American cancer society national prostate cancer detection project. Findings on the detection of early prostate cancer in 2425 men. *Cancer* 67:2949–2958. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19910615\)67:12<2949::AID-CNCR2820671202>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19910615)67:12<2949::AID-CNCR2820671202>3.0.CO;2-X)
34. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, et al (2004) Prevalence of Prostate Cancer among Men with a Prostate-Specific Antigen Level ≤ 4.0 ng per Milliliter. *N Engl J Med* 350:2239–2246. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa031918>

35. Ellis WJ, Chetner MP, Preston SD, Brawer MK (1994) Diagnosis of prostatic carcinoma: the yield of serum prostate specific antigen, digital rectal examination and transrectal ultrasonography. *J Urol* 152:1520–1525. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)32460-6](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)32460-6)
36. Sountoulides P, Pyrgidis N, Polyzos SA, et al (2021) Micro-Ultrasound–Guided vs Multiparametric Magnetic Resonance Imaging–Targeted Biopsy in the Detection of Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Urol* 205:1254–1262. <https://doi.org/10.1097/JU.0000000000001639>
37. Kasivisvanathan V, Hussain M (2018) Aquablation versus transurethral resection of the prostate: 1 year United States - cohort outcomes. *Can J Urol* 25:9317–9322
38. Zhang Z-X, Yang J, Zhang C-Z, et al (2014) The value of magnetic resonance imaging in the detection of prostate cancer in patients with previous negative biopsies and elevated prostate-specific antigen levels: a meta-analysis. *Acad Radiol* 21:578–589. <https://doi.org/10.1016/j.acra.2014.01.004>
39. Filson CP, Natarajan S, Margolis DJA, et al (2016) Prostate cancer detection with magnetic resonance-ultrasound fusion biopsy: The role of systematic and targeted biopsies. *Cancer* 122:884–892. <https://doi.org/10.1002/cncr.29874>
40. Chang DTS, Challacombe B, Lawrentschuk N (2013) Transperineal biopsy of the prostate—is this the future? *Nat Rev Urol* 10:690–702. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2013.195>
41. De Visschere PJJ, Standaert C, Fütterer JJ, et al (2019) A Systematic Review on the Role of Imaging in Early Recurrent Prostate Cancer. *Eur Urol Oncol* 2:47–76. <https://doi.org/10.1016/j.euo.2018.09.010>
42. Ahmed HU, El-Shater Bosaily A, Brown LC, et al (2017) Diagnostic accuracy of multi-parametric MRI and TRUS biopsy in prostate cancer (PROMIS): a paired validating confirmatory study. *Lancet Lond Engl* 389:815–822. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32401-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32401-1)
43. Kasivisvanathan V, Rannikko AS, Borghi M, et al (2018) MRI-Targeted or Standard Biopsy for Prostate-Cancer Diagnosis. *N Engl J Med* 378:1767–1777. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1801993>
44. Rouvière O, Puech P, Renard-Penna R, et al (2019) Use of prostate systematic and targeted biopsy on the basis of multiparametric MRI in biopsy-naive patients (MRI-FIRST): a prospective, multicentre, paired diagnostic study. *Lancet Oncol* 20:100–109. [https://doi.org/10.1016/S1473-2045\(18\)30569-2](https://doi.org/10.1016/S1473-2045(18)30569-2)
45. Xue J, Qin Z, Cai H, et al (2017) Comparison between transrectal and transperineal prostate biopsy for detection of prostate cancer: a meta-

analysis and trial sequential analysis. *Oncotarget* 8:23322–23336. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15056>

46. Trabulsi EJ, Rumble RB, Jadvar H, et al (2020) Optimum Imaging Strategies for Advanced Prostate Cancer: ASCO Guideline. *J Clin Oncol* 38:1963–1996. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.02757>
47. Hofman MS, Lawrentschuk N, Francis RJ, et al (2020) Prostate-specific membrane antigen PET-CT in patients with high-risk prostate cancer before curative-intent surgery or radiotherapy (proPSMA): a prospective, randomised, multicentre study. *Lancet Lond Engl* 395:1208–1216. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30314-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30314-7)
48. Kattan MW, Eastham JA, Stapleton AMF, et al (1998) A Preoperative Nomogram for Disease Recurrence Following Radical Prostatectomy for Prostate Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst* 90:766–771. <https://doi.org/10.1093/jnci/90.10.766>
49. Patel VR, Sandri M, Grasso AAC, et al (2018) A novel tool for predicting extracapsular extension during graded partial nerve sparing in radical prostatectomy. *BJU Int* 121:373–382. <https://doi.org/10.1111/bju.14026>
50. de Rooij M, Hamoen EHJ, Witjes JA, et al (2016) Accuracy of Magnetic Resonance Imaging for Local Staging of Prostate Cancer: A Diagnostic Meta-analysis. *Eur Urol* 70:233–245. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2015.07.029>
51. Beer AJ, Eiber M, Souvatzoglou M, et al (2011) Radionuclide and hybrid imaging of recurrent prostate cancer. *Lancet Oncol* 12:181–191. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70103-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70103-0)
52. Von Eyben FE, Kairemo K (2014) Meta-analysis of ¹¹C-choline and ¹⁸F-choline PET/CT for management of patients with prostate cancer. *Nucl Med Commun* 35:221–230. <https://doi.org/10.1097/MNM.0000000000000040>
53. Maurer T, Eiber M, Schwaiger M, Gschwend JE (2016) Current use of PSMA–PET in prostate cancer management. *Nat Rev Urol* 13:226–235. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2016.26>
54. Werner RA, Derlin T, Lapa C, et al (2020) ¹⁸F-Labeled, PSMA-Targeted Radiotracers: Leveraging the Advantages of Radiofluorination for Prostate Cancer Molecular Imaging. *Theranostics* 10:1–16. <https://doi.org/10.7150/thno.37894>
55. Hope TA, Eiber M, Armstrong WR, et al (2021) Diagnostic Accuracy of ⁶⁸Ga-PSMA-11 PET for Pelvic Nodal Metastasis Detection Prior to Radical Prostatectomy and Pelvic Lymph Node Dissection: A Multicenter Prospective Phase 3 Imaging Trial. *JAMA Oncol* 7:1635. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2021.3771>
56. Jansen BHE, Bodar YJL, Zwezerijnen GJC, et al (2021) Pelvic lymph-node staging with ¹⁸F-DCFPyL PET/CT prior to extended pelvic lymph-node

dissection in primary prostate cancer - the SALT trial -. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 48:509–520. <https://doi.org/10.1007/s00259-020-04974-w>

57. Van Kalmthout LWM, Van Melick HHE, Lavalaye J, et al (2020) Prospective Validation of Gallium-68 Prostate Specific Membrane Antigen-Positron Emission Tomography/Computerized Tomography for Primary Staging of Prostate Cancer. *J Urol* 203:537–545. <https://doi.org/10.1097/JU.0000000000000531>
58. Perera M, Papa N, Roberts M, et al (2020) Gallium-68 Prostate-specific Membrane Antigen Positron Emission Tomography in Advanced Prostate Cancer—Updated Diagnostic Utility, Sensitivity, Specificity, and Distribution of Prostate-specific Membrane Antigen-avid Lesions: A Systematic Review and Meta-analysis. *Eur Urol* 77:403–417. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2019.01.049>
59. Hamdy FC, Donovan JL, Lane JA, et al (2023) Fifteen-Year Outcomes after Monitoring, Surgery, or Radiotherapy for Prostate Cancer. *N Engl J Med* 388:1547–1558. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2214122>
60. Donovan JL, Hamdy FC, Lane JA, et al (2016) Patient-Reported Outcomes after Monitoring, Surgery, or Radiotherapy for Prostate Cancer. *N Engl J Med* 375:1425–1437. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1606221>
61. Bill-Axelsson A, Holmberg L, Garmo H, et al (2014) Radical Prostatectomy or Watchful Waiting in Early Prostate Cancer. *N Engl J Med* 370:932–942. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1311593>
62. Bill-Axelsson A, Holmberg L, Garmo H, et al (2018) Radical Prostatectomy or Watchful Waiting in Prostate Cancer — 29-Year Follow-up. *N Engl J Med* 379:2319–2329. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1807801>
63. Wilt TJ, Jones KM, Barry MJ, et al (2017) Follow-up of Prostatectomy versus Observation for Early Prostate Cancer. *N Engl J Med* 377:132–142. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1615869>
64. Briganti A, Larcher A, Abdollah F, et al (2012) Updated Nomogram Predicting Lymph Node Invasion in Patients with Prostate Cancer Undergoing Extended Pelvic Lymph Node Dissection: The Essential Importance of Percentage of Positive Cores. *Eur Urol* 61:480–487. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2011.10.044>
65. Berger I, Annabattula C, Lewis J, et al (2018) 68Ga-PSMA PET/CT vs. mpMRI for locoregional prostate cancer staging: correlation with final histopathology. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 21:204–211. <https://doi.org/10.1038/s41391-018-0048-7>
66. Rauscher I, Düwel C, Haller B, et al (2018) Efficacy, Predictive Factors, and Prediction Nomograms for 68 Ga-labeled Prostate-specific Membrane Antigen–ligand Positron-emission Tomography/Computed Tomography in Early Biochemical Recurrent Prostate Cancer After Radical Prostatectomy. *Eur Urol* 73:656–661. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.01.006>

67. Ceci F, Bianchi L, Borghesi M, et al (2020) Prediction nomogram for ^{68}Ga -PSMA-11 PET/CT in different clinical settings of PSA failure after radical treatment for prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 47:136–146. <https://doi.org/10.1007/s00259-019-04505-2>
68. Bianchi L, Castellucci P, Farolfi A, et al (2023) Multicenter External Validation of a Nomogram for Predicting Positive Prostate-specific Membrane Antigen/Positron Emission Tomography Scan in Patients with Prostate Cancer Recurrence. *Eur Urol Oncol* 6:41–48. <https://doi.org/10.1016/j.euo.2021.12.002>
69. Ferraro DA, Rüschoff JH, Muehlematter UJ, et al (2020) Immunohistochemical PSMA expression patterns of primary prostate cancer tissue are associated with the detection rate of biochemical recurrence with ^{68}Ga -PSMA-11-PET. *Theranostics* 10:6082–6094. <https://doi.org/10.7150/thno.44584>
70. Hupe MC, Philippi C, Roth D, et al (2018) Expression of Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) on Biopsies Is an Independent Risk Stratifier of Prostate Cancer Patients at Time of Initial Diagnosis. *Front Oncol* 8:623. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00623>
71. Perner S, Hofer MD, Kim R, et al (2007) Prostate-specific membrane antigen expression as a predictor of prostate cancer progression. *Hum Pathol* 38:696–701. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2006.11.012>
72. Woythal N, Arsenic R, Kempkensteffen C, et al (2018) Immunohistochemical Validation of PSMA Expression Measured by ^{68}Ga -PSMA PET/CT in Primary Prostate Cancer. *J Nucl Med* 59:238–243. <https://doi.org/10.2967/jnumed.117.195172>
73. Mannweiler S, Amersdorfer P, Trajanoski S, et al (2009) Heterogeneity of Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) Expression in Prostate Carcinoma with Distant Metastasis. *Pathol Oncol Res* 15:167–172. <https://doi.org/10.1007/s12253-008-9104-2>
74. Yaxley JW, Raveenthiran S, Nouhaud F-X, et al (2019) Risk of metastatic disease on ^{68}Ga gallium-prostate-specific membrane antigen positron emission tomography/computed tomography scan for primary staging of 1253 men at the diagnosis of prostate cancer: ^{68}Ga -PPSMA PET primary staging prostate cancer. *BJU Int* 124:401–407. <https://doi.org/10.1111/bju.14828>
75. Laudicella R, La Torre F, Davì V, et al (2022) Prostate Cancer Biochemical Recurrence Resulted Negative on [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 but Positive on [^{18}F]Fluoromethylcholine PET/CT. *Tomography* 8:2471–2474. <https://doi.org/10.3390/tomography8050205>
76. Turkbey B, Rosenkrantz AB, Haider MA, et al (2019) Prostate Imaging Reporting and Data System Version 2.1: 2019 Update of Prostate Imaging Reporting and Data System Version 2. *Eur Urol* 76:340–351. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2019.02.033>

77. Ahmed HU (2009) The Index Lesion and the Origin of Prostate Cancer. *N Engl J Med* 361:1704–1706. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr0905562>
78. Kaemmerer D, Peter L, Lupp A, et al (2011) Molecular imaging with 68Ga-SSTR PET/CT and correlation to immunohistochemistry of somatostatin receptors in neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 38:1659–1668. <https://doi.org/10.1007/s00259-011-1846-5>
79. Gwet KL (2014) *Handbook of inter-rater reliability: the definitive guide to measuring the extent of agreement among raters*, Fourth edition. Advances Analytics, LLC, Gaithersburg, Md
80. Assel M, Sjoberg D, Elders A, et al (2019) Guidelines for Reporting of Statistics for Clinical Research in Urology. *Eur Urol* 75:358–367. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.12.014>
81. Doyle DJ, Hendrix JM, Garmon EH (2023) American Society of Anesthesiologists Classification. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL)
82. Hupe MC, Philippi C, Roth D, et al (2018) Expression of Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) on Biopsies Is an Independent Risk Stratifier of Prostate Cancer Patients at Time of Initial Diagnosis. *Front Oncol* 8:623. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00623>
83. Rüschoff JH, Ferraro DA, Muehlematter UJ, et al (2021) What’s behind 68Ga-PSMA-11 uptake in primary prostate cancer PET? Investigation of histopathological parameters and immunohistochemical PSMA expression patterns. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 48:4042–4053. <https://doi.org/10.1007/s00259-021-05501-1>
84. Minner S, Wittmer C, Graefen M, et al (2011) High level PSMA expression is associated with early psa recurrence in surgically treated prostate cancer. *The Prostate* 71:281–288. <https://doi.org/10.1002/pros.21241>
85. Bravaccini S, Puccetti M, Bocchini M, et al (2018) PSMA expression: a potential ally for the pathologist in prostate cancer diagnosis. *Sci Rep* 8:4254. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22594-1>