

Antigene prostatico specifico: determinazione con un sistema completamente automatizzato (sistema Architect) e suo significato clinico-diagnostico

Vincenzo Macchia, Roberto Pedicini, Angelina Di Carlo, Angela Mariano

Cattedra di Patologia clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Napoli "Federico II", Via S. Pansini 5, 80131 Napoli

ABSTRACT

Prostatic specific antigen: determination with the automatic Architect system and evaluation of its clinic-diagnostic significance

Prostate specific antigen (PSA) is a valuable serum marker for diagnosis and monitoring of prostate cancer. Recently different forms of serum PSA (free and complexed) have been identified and the ratio of free to total PSA has been reported to be significantly lower in prostate cancer than in benign prostatic hypertrophy. Furthermore some reports indicated that PSA is produced also by female breast and that women with breast carcinomas have higher serum PSA level than normal women. The aim of our study is to assess the analytical performances of the new automatic system (Architect) from Abbott for total and free PSA. Therefore serum from normal males, from normal women, from males with prostatic diseases, cytosol from human pathological prostatic tissues and medium of cell line cultures (LNCaP) producing PSA were tested. Our results indicate that: 1) this new system from Abbott is reliable, reproducible and very sensible, 2) in serum of men with pathological prostate total and free PSA levels correspond to the clinical states of subjects and 3) the new system permits to measure PSA also in other biological materials such as the cytosol of prostatic tissues and the medium of cultured cells (LNCaP) producing PSA.

RIASSUNTO

L'antigene prostatico specifico (PSA) è un valido indicatore per la diagnosi ed il monitoraggio del cancro della prostata. Recentemente diverse forme di PSA sono state messe in evidenza nel siero, in particolare tra queste le più importanti sono la forma libera e la forma totale ed è stato notato che il rapporto tra la forma libera e quella totale è più basso nei sieri dei soggetti con cancro della prostata rispetto a quello dei soggetti normali o con iperplasia prostatica benigna. Inoltre in letteratura è stato riportato che il PSA è prodotto anche dalla ghiandola mammaria femminile e che nelle donne con cancro della mammella i livelli sierici di PSA sono più elevati rispetto a quelli riscontrati in donne sane. Lo scopo del presente studio è quello di verificare la validità metodologica e la corrispondenza dei valori sierici di PSA (totale e libero) con lo stato clinico dei soggetti utilizzando il nuovo sistema automatizzato (Architect). I nostri risultati hanno indicato che: 1) questo sistema è affidabile, dà risultati riproducibili ed è molto sensibile, 2) esiste una perfetta corrispondenza fra i livelli sierici della forma libera e della forma totale di PSA in soggetti di sesso maschile con patologie prostatiche ed il rispettivo stato clinico e 3) è possibile misurare con questo sistema automatico il PSA anche in altri materiali biologici quali i cytosol di tessuti prostatici ed i mezzi di coltura di cellule LNCaP coltivate e capaci di produrre PSA.

INTRODUZIONE

Il PSA (antigene prostatico specifico) è una glicoproteina a singola catena di 33 KDa prodotta esclusivamente in soggetti di sesso maschile dalle cellule dell'epitelio colonnare della prostata e dalle ghiandole periuretrali ed è secreto nei dotti prostatici dove liquefa il liquido spermatico dopo la eiaculazione (1-4). L'analisi della sequenza aminoacidica ha indicato che il PSA è strutturalmente omologo ai membri della famiglia delle serino proteasi, enzimi così denominati perché producono il taglio proteolitico a livello di un residuo di serina (5).

Il PSA viene inizialmente sintetizzato come precursore inattivo di 261 aminoacidi, detto preproPSA, che contiene rispetto alla molecola definitiva di PSA 24 residui addizionali

di cui 7 rappresentano il propeptide e 17 il cosiddetto peptide segnale. Il peptide segnale permette alla proteina di entrare nel reticolo endoplasmatico da cui viene rimosso formando il proPSA che è trasportato in vescicole fino alle membrane plasmatiche e successivamente viene secreto nel dotto prostatico. Il proPSA detto anche *zimogeno* è inattivo per la presenza dei 7 residui addizionali la cui perdita determina la formazione della forma extracellulare matura ed enzimicamente attiva (6).

Una volta nel liquido seminale la funzione principale del PSA è quella di tagliare le proteine formanti il gel (seminogelina) e la fibronectina in piccoli peptidi rendendo così più fluido il liquido spermatico ed aumentando la mobilità degli spermatozoi (4). Dalla prostata il PSA è rilasciato in piccole quantità nel torrente circolatorio e nei

soggetti di sesso maschile, senza segni patologici, lo si ritrova in minime quantità (pochi ng/ml) nel siero. Tuttavia, qualunque cambiamento nella struttura anatomica della ghiandola aumenta il passaggio del PSA nel circolo ematico (7,8). Pertanto livelli elevati di PSA in circolo sono indicativi di diverse condizioni patologiche che includono sia forme benigne come l'iperplasia prostatica benigna e le prostatiti che forme maligne come il cancro della prostata. Quando il PSA passa in circolo nella forma attiva, poiché come proteasi potrebbe danneggiare i componenti cellulari, viene immediatamente legato ad alcune proteine che inibiscono tale enzima. Tali proteine comprendono l'alfa1-antichemiotripsina (α_1 -ACT) e l'alfa2-macroglobulina (α_2 -M) (5).

La formazione di un complesso con l' α_1 -ACT comporta l'esposizione di un numero limitato di epitopi antigenici del PSA, mentre la formazione di un complesso con l' α_2 -M incapsula completamente gli antigeni del PSA. Accanto alle forme complessate esiste una frazione non complessata, definita frazione libera (PSAL) che varia dal 5 al 40% del totale. Il PSA totale (PSAT) rappresenta dunque la somma della forma complessata, i cui epitopi sono disponibili all'anticorpo, più la forma libera. Il PSA totale ed il PSA libero rappresentano le forme che oggi sono più frequentemente dosate.

Il PSA complessato con l' α_2 -M, da questa completamente incapsulato, non presenta epitopi disponibili agli anticorpi e non è dosabile (9). Nelle diverse patologie prostatiche (benigne e maligne) vi è un diverso rapporto tra la forma totale e la forma libera di PSA (10, 11), infatti nei soggetti con cancro della prostata le cellule neoplastiche producono sia PSA che α_1 -ACT con livelli conseguentemente elevati in circolo della forma complessata di PSA (PSA-ACT). Viceversa, nelle ipertrofie prostatiche benigne con l'aumentare del volume della ghiandola si osserva un'elevata produzione di PSA ed una minore produzione di α_1 -ACT e ne consegue che nel siero sono più elevati i livelli di PSAL. In definitiva, nei soggetti con carcinoma della prostata, il rapporto PSAL/PSAT è più basso di quello presente nei soggetti con iperplasia prostatica benigna.

La semivita del PSA è di 2-3 giorni, pertanto, dopo radicale prostatectomia, l'aumento in circolo dei livelli di questo marcatore indica presenza di tessuto neoplastico o comparsa di recidiva (12). Inoltre in caso di neoplasia prostatica, all'inizio di una terapia endocrina, generalmente i livelli di PSA diminuiscono e si mantengono bassi finché persiste sensibilità del tumore alla terapia ormonale. Pertanto, la determinazione sierica del PSA è utile oltre che in campo diagnostico anche per monitorare l'evoluzione della malattia neoplastica e l'efficacia del trattamento.

Recentemente, oltre che nella prostata, il PSA è stato trovato anche nel tessuto mammario e nel 30% delle donne affette da cancro della mammella i livelli sierici di tale marcatore sono più elevati di quelli trovati nei sieri delle donne sane (12, 13). Tuttavia i valori sierici in corso di neoplasia della mammella sono sempre molto inferiori a quelli trovati nell'uomo con patologie prostatiche. Infine il PSA è secreto nel mezzo di coltura da una linea di cellule (LNCaP) derivate da metastasi di cancro prostatico umano

(15, 16). Tali cellule sono frequentemente scelte come modelli sperimentali per studiare i meccanismi di controllo di crescita della prostata e di secrezione dei suoi marcatori biologici.

MATERIALI E METODI

Il sistema Architect della Ditta Abbott è uno strumento completamente automatizzato per dosaggi immunologici in chemiluminescenza. Su tale strumento è possibile eseguire dosaggi in fase solida con caricamento continuo di tipo sandwich e di tipo competitivo utilizzando come sistema di segnale un coniugato dell'acridinio sulfonamide.

Per la valutazione dell'antigene prostatico specifico nella forma totale (PSAT) e libera (PSAL) sul sistema Architect sono stati analizzati 100 sieri di soggetti di sesso maschile di cui: 68 uomini con patologie non prostatiche, 17 con iperplasia prostatica benigna e 15 con carcinoma prostatico di cui 6 non avevano assunto terapia e non erano stati trattati chirurgicamente mentre 9 erano stati trattati terapeuticamente prima dell'intervento chirurgico di prostatectomia. Sono stati inoltre analizzati anche 10 sieri di donne apparentemente normali. Infine è stato determinato il PSA su 18 cytosol provenienti da tessuti prostatici iperplastici, su 9 tessuti neoplastici e su 35 mezzi di coltura in cui erano state coltivate le cellule LNCaP. Tali cellule sono state ottenute dall'American Culture Collection (Rockville Md, USA) e coltivate nel nostro laboratorio con mezzo di coltura Dulbecco modificato da Eagle con rosso fenolo (DMEM) con aggiunta di siero fetale bovino (FBS) al 5% e di antibiotici in piastre da 100 e da 60 mm, conservate a 37°C in un incubatore al 95% di aria umidificata con il 5% di CO₂.

Per la preparazione dei soprannatanti (cytosol) dei tessuti patologici si è seguito il seguente schema analitico: i tessuti, ottenuti in sala operatoria da pazienti sottoposti ad intervento chirurgico, erano immediatamente portati in laboratorio e congelati a -80°C. Successivamente i tessuti venivano omogenizzati in un potter teflon-vetro in un tampone isotonic a pH 7,4 e centrifugati per 10 minuti a 1.500 x g. Il soprannatante veniva ulteriormente centrifugato per 30 minuti a 105.000 x g. Eliminato il sedimento, il soprannatante (cytosol) veniva congelato a -20°C per essere successivamente utilizzato per il dosaggio del PSA e per il dosaggio delle proteine con la metodica di Bradford (17). La determinazione del PSA è stata eseguita con il sistema Architect e con i kits commerciali della Ditta Medical System.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Caratteristiche del Sistema Architect per la determinazione del PSA

La sensibilità analitica, intesa come la più bassa concentrazione di analita che il metodo è in grado di rivelare, è stata calcolata processando ogni giorno per 4 giorni consecutivi dieci repliche del calibratore a concentrazione 0 e 4 repliche del calibratore a concentrazione più bassa

dell'analisi. Adottando una formula specifica si è calcolata la sensibilità sia per il PSAT che per il PSAL che è risultata di 0,001 ng/ml.

La riproducibilità del dosaggio è stata determinata su tre pools di sieri a bassa, media ed alta concentrazione (L, M, H) di PSAT e di PSAL. Il numero di determinazioni intra-serie ed inter-serie con le relative medie \pm D.S. ed i coefficienti di variazione (C.V.), espressi in percentuale, sono riportati in Tabella 1 e in Tabella 2 rispettivamente. Come si osserva dall'analisi dei dati del PSAT, il C.V. intra-serie è risultato inferiore al 3% ed il C.V. inter-serie inferiore al 4%. Per il PSAL il C.V. intra-serie è risultato inferiore al 5,4% e il C.V. inter-serie inferiore al 5%. La riproducibilità del dosaggio è stata valutata anche determinando un campione ad elevati livelli di PSAT, che è stato processato in ogni seduta di lavoro, per tutta la durata della sperimentazione, inserendolo sia all'inizio che alla fine del procedimento analitico. Come riportato in Tabella 3 è possibile osservare che il C.V. è risultato molto basso (4,7%).

L'affidabilità del metodo è stata valutata diluendo un mezzo di coltura in cui erano state coltivate le cellule LNCaP. Dall'analisi dei dati in Figura 1 si osserva un'ottima linearità di risposta.

Convalida clinica e metodologica del Sistema Architect per la determinazione del PSA

Il PSA è un buon indicatore sierico per la diagnosi e

per il monitoraggio del tumore della prostata. Negli uomini, con i kits commerciali attualmente in uso, i valori normali presentano un range intorno ad 1-2 ng/ml mentre valori leggermente superiori (3-4 ng/ml) possono suggerire la presenza di una patologia.

Studi recenti hanno suggerito l'impiego del PSA come un nuovo indice prognostico nelle donne affette da cancro della mammella. I livelli sierici di PSA in donne normali sono molto bassi e cioè intorno a 0,002 ng/ml (18), in presenza di neoplasia della mammella intorno a 0,9 ng/ml e in donne con iperandrogenismo intorno a 0,6 ng/ml. Pertanto allo scopo di verificare la validità del sistema Architect per il PSA abbiamo scelto un gruppo di 68 campioni provenienti da individui di sesso maschile senza alcuna alterazione della prostata ed un gruppo di 10 soggetti di sesso femminile apparentemente normali. Su tutti i sieri è stata determinata sia la forma libera che la forma totale di PSA. Dall'analisi dei dati ottenuti, riportati in Tabella 4 si osserva che i valori di PSAT e di PSAL sono più elevati nel gruppo di soggetti maschi di età compresa fra i 46 e 81 anni (media $62 \pm 0,7$) rispetto a quello dei soggetti di età compresa fra i 20 e i 44 anni (media $35,8 \pm 1,1$), mentre il rapporto fra forma libera e forma totale si abbassa con l'età. Sul gruppo dei campioni sierici delle donne, data l'ottima sensibilità del sistema per il PSA, è stato possibile determinare livelli medi di questo indicatore di 0,013 ng/ml e di 0,003 ng/ml per il PSAT e per il PSAL

Tabella 1

Riproducibilità analitica del PSA totale eseguita su 3 sieri di controllo

Campione	PSA totale		PSA totale	
	media \pm D.S. (ng/ml)	CV intra-serie (%)	media \pm D.S. (ng/ml)	CV inter-serie (%)
L	0,50 \pm 0,01	2,0	0,48 \pm 0,01	2,0
M	3,97 \pm 0,12	3,0	3,85 \pm 0,11	2,8
H	25,6 \pm 0,61	2,3	24,4 \pm 1,00	4,0

Tabella 2

Riproducibilità analitica del PSA libero eseguita su 3 sieri di controllo

Campione	PSA libero		PSA libero	
	media \pm D.S. (ng/ml)	CV intra-serie (%)	media \pm D.S. (ng/ml)	CV inter-serie (%)
L	0,37 \pm 0,02	5,4	0,37 \pm 0,01	2,7
M	0,91 \pm 0,03	3,2	0,93 \pm 0,02	2,1
H	6,83 \pm 0,32	4,6	6,98 \pm 0,35	5,0

Tabella 3

Riproducibilità del PSA totale su un campione a concentrazione elevata

Determinazione n.	PSA totale	
	media \pm D.S. (ng/ml)	CV inter-serie (%)
10	21,1 \pm 1,0	4,7

rispettivamente. Ciò permette di utilizzare questo sistema per valutare eventuali aumenti di PSA in donne con neoplasie della mammella e con iperandrogenismo. Nel terzo gruppo da noi analizzato abbiamo preso in esame soggetti affetti da patologie della prostata. La maggior parte di questi proveniva da pazienti sottoposti ad intervento chirurgico per l'asportazione della prostata ed il campione di sangue era raccolto immediatamente prima dell'interven-

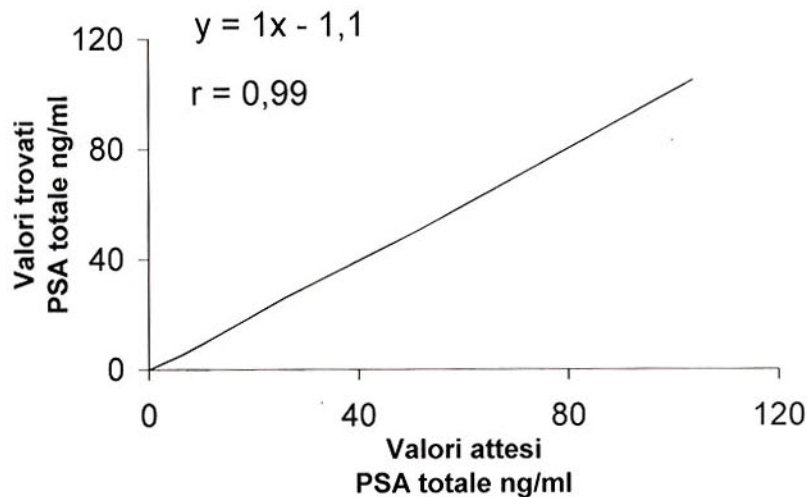


Figura 1
Prova di diluizione su mezzo di coltura di cellule LNCaP

Tabella 4
Livelli sierici di PSA in soggetti normali e patologici (media \pm D.S.)

Soggetti (n.)	Patologia prostatica	Età (anni)	PSA totale ng/ml	PSA libero ng/ml	Rapporto libero/totale
Uomini (17)	Nessuna	35,8 \pm 1,1	0,59 \pm 0,13	0,23 \pm 0,15	0,37 \pm 0,04
Uomini (51)	Nessuna	62,0 \pm 0,7	1,30 \pm 0,13	0,35 \pm 0,30	0,29 \pm 0,01
Uomini (17)	Iperplasia benigna	65,0 \pm 1,4	3,95 \pm 0,63	1,00 \pm 0,12	0,31 \pm 0,30
Uomini (6)	Neoplasia senza terapia	71,0 \pm 3,1	13,10 \pm 3,0	1,30 \pm 0,30	0,09 \pm 0,06
Uomini (9)	Neoplasia con terapia	64,0 \pm 1,4	2,77 \pm 0,33	1,00 \pm 0,19	0,40 \pm 0,09
Donne (10)	Nessuna	55,0 \pm 4,5	0,013 \pm 0,005	0,003 \pm 0,001	—

to. I pazienti con neoplasia che erano poi sottoposti ad intervento chirurgico venivano trattati con terapia antiandrogena prima dell'asportazione della prostata. Viceversa, un altro gruppo di pazienti con neoplasie prostatiche non erano operati e non erano stati sottoposti ad alcun tipo di terapia.

Dall'analisi dei dati riportati in Tabella 4 si osserva che, analogamente a quanto già noto, i valori più elevati di PSA sono stati trovati nei soggetti con carcinoma della prostata non trattati terapeuticamente ed il rapporto fra forma libera e forma totale è risultato più basso di quello osservato nei soggetti normali ed in quelli con iperplasia. Mentre nei soggetti con neoplasie prostatiche, trattati terapeuticamente prima dell'intervento, i valori di PSAL e PSAT ed il rapporto PSAL/PSAT si avvicinavano molto a quelli dei soggetti normali. Nei tessuti prostatici vi è un elevato contenuto di antigene prostatico specifico (19) evidenziato sia con immunoblotting utilizzando anticorpo anti-PSA marcato con I¹²⁵ che con kits commerciali radioimmunologici. Pertanto, abbiamo ritenuto molto interessante studiare se, anche con il sistema Architect, fosse possibile determinare sui cytosol dei tessuti patologici, ottenuti al tavolo operatorio, la forma libera e quella totale di PSA. I

dati ottenuti riportati in Tabella 5 sono espressi in μ g/mg di proteine.

La media dei valori di PSAT nei cytosol dei tessuti iperplastici è risultata 11 \pm 0,96 μ g/mg di proteine mentre è risultata, circa 20 volte più bassa (0,68 \pm 0,19 μ g/mg di proteine) nei tessuti neoplastici dei soggetti con carcinoma prostatico trattati per 6 mesi, prima dell'intervento chirurgico, con terapia antiandrogena. I livelli di PSAL in entrambi i due tipi di cytosol sono risultati molto simili a quelli del PSAT: tessuti iperplastici 11,2 \pm 2,7 μ g/mg di proteine e

Tabella 5
Determinazione del PSA totale e del PSA libero sui cytosol di tessuti prostatici con patologie benigne e maligne (media \pm D.S.)

Patologia prostatica (n.)	PSA totale μ g/mg proteine	PSA libero μ g/mg proteine	Rapporto libero/totale
Iperplasia benigna (9)	11,0 \pm 0,96	11,2 \pm 2,7	0,97 \pm 0,08
Neoplasia (9)	0,68 \pm 0,19	0,83 \pm 0,24	1,16 \pm 0,028

tessuti neoplastici $0,83 \pm 0,24 \mu\text{g}/\text{mg}$ di proteine.

Il rapporto libero/totale in entrambi i cytosol (tessuto iperplastico e tessuto neoplastico) è risultato molto vicino all'unità e tale risultato è dovuto al fatto che nei tessuti, indipendentemente dalla presenza o meno di patologie, vi è solo la forma non complessata di PSA. Infine le due forme di PSA sono state dosate con il Sistema Architect sui mezzi di coltura delle cellule LNCaP. Entrambe le forme di PSA sono risultate in concentrazione simile in quanto anche nelle cellule esiste la forma non complessata. Le concentrazioni di PSA dipendevano dal tempo di coltura (Tabella 6) e dalla quantità di siero presente nel mezzo di coltura (Tabella 7). Infine i valori sierici di PSA totale ottenuti con il sistema Architect sono stati correlati con quelli da noi precedentemente ottenuti con il sistema Immulite (Medical System) ed il sistema Axsym (Abbott). Con entrambi i due sistemi la correlazione è risultata molto buona (coefficiente di correlazione $r = 0,99$ e $r = 0,98$ rispettivamente) (Tabella 8).

In conclusione, sulla base dei nostri dati è possibile affermare che l'utilizzo del sistema Architect per la determinazione del PSA nelle sue due forme permette di otte-

nere risultati validi da un punto di vista tecnico che corrispondono perfettamente alle attese cliniche. Inoltre tale sistema permette la determinazione del PSA non solo sul siero ma anche su altri materiali biologici quali i cytosol dei tessuti ed i mezzi di coltura di cellule. Infine anche dai nostri dati emerge che lo studio del rapporto tra forma libera e forma totale di PSA può differenziare le forme benigne da quelle maligne a carico della prostata e che l'elevata sensibilità della metodica può aprire nuovi orizzonti per individuare la presenza nel sesso femminile di neoplasie della ghiandola mammaria.

BIBLIOGRAFIA

1. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol* 1979;17:159-163.
2. Watt KW, Lee PJ, Timkulu T, Chan WP, Loo R. Human prostate specific antigen: structural and functional similarity with serine proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:3166-3172.
3. Lilja H. Kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. *J Clin Invest* 1985;76:1899-1903.

Tabella 6

Produzione di PSA totale e PSA libero da parte delle cellule LNCaP in funzione del tempo di coltura

Giorni di coltura	Cellule per piastra n. x 10 ³	PSA totale $\mu\text{g}/\text{piastra}$	PSA libero $\mu\text{g}/\text{piastra}$
0	250	0,06	0,07
3	610	0,32	0,31
6	1600	0,86	0,88
9	4100	2,40	2,50
12	4000	3,50	3,70

Tabella 7

Effetti del siero (FBS) sulla crescita e sulla produzione di PSA

FBS %	Cellule per piastra n. x 10 ³		PSA totale $\mu\text{g}/\text{piastra}$		PSA libero $\mu\text{g}/\text{piastra}$	
	3 giorni	6 giorni	3 giorni	6 giorni	3 giorni	6 giorni
0,1	340	450	0,08	0,09	0,08	0,09
0,5	546	700	0,15	0,17	0,14	0,17
1,0	865	1150	0,24	0,30	0,25	0,31
5,0	1140	2600	0,49	1,49	0,50	1,50
10,0	1100	2500	0,41	1,36	0,43	1,40

Tabella 8

Correlazione tra i valori sierici di PSA totale con Sistema Architect, Immulite ed Axsym

Campioni	n	Retta regressione	r
Normali o patologici*	60	$0,88x + 0,92$	0,99
Normali o patologici**	40	$0,89x - 0,02$	0,98

4. Lilja H, Oldbrink J, Rannevik G, Laurell CB. Seminal vesicle secreted proteins and their reactions during gelation and liquefaction of human semen. *J Clin Invest* 1993;80:281-285.
5. Christensson A, Bjork T, Nilsson O, Dahlen U et al. Serum prostate specific antigen complexed to α 1-antichymotrysin as an indicator of prostate cancer. *J Urol* 1993;150:100-105.
6. Lundwall A, Lilja H. Molecular cloning of human prostate specific antigen cDNA. *FEBS Lett* 1987;214:317-322.
7. Kurijama M, Wang MC, Papsidero LD, Killiam CS. et al. Quantitation of prostate-specific antigen in serum by a sen-

- sitive enzyme immunoassay. *Cancer Res* 1980;40:4658-4662.
8. Papsidero LD, Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. A prostate antigen in sera of prostatic cancer patients. *Cancer Res* 1980;40:2428-2432.
 9. McCormack RT, Wang TJ, Rittenhouse HG, Wolfert RL, et al. Molecular forms of prostate-specific antigen and the human kallikrein gene family: a new era. *Urology* 1995;45:729-744.
 10. Oesterling JE, Jacobsen SJ, Klee GG, Petterson K, et al. Free, complexed and total serum prostate-specific antigen: the establishment of appropriate reference ranges for their concentrations and ratios. *J Urol* 1995;154:1090-1095.
 11. Van Cangh P, De Nayer P, Sauvage P, Tombel B, et al. Free to total prostate specific antigen (PSA) ratio is superior to total PSA in differentiating benign prostate hypertrophy from prostate cancer. *The prostate supplement* 1996;7:30-34.
 12. Yu H, Giai M, Diamandis EP, Katsaros D, et al. Prostate-specific antigen is a new favorable prognostic indicator for women with breast cancer. *Cancer Res* 1995;55:2104-2110.
 13. Yu H, Diamandis EP, Sutherland DJA. Immunoreactive prostate specific antigen levels in female and male breast tumors and its association with steroid hormone receptors and patient age. *Clin Biochem* 1994;27:75-79.
 14. Diamandis EP, Yu H, Sutherland DJA. Detection of prostate-specific antigen immunoreactivity in breast tumors. *Breast cancer research and treatment* 1994;32:301-310.
 15. Horoszewicz JS, Leong SS, kawinski E, Karr JP, et al. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* 1983;43:1809-1818.
 16. Macchia V, Di Carlo A, De Luca C, Mariano A. Effect of cyclic adenosine-monophosphate on growth and PSA secretion of human prostate cancer cell line. *Int J Oncol* 2000;18: in stampa.
 17. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
 18. Borchet GH, Giai M, Diamandis EP. Elevated levels of prostate-specific antigen in serum of women with fibroadenomas and breast cystis. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:587-588.
 19. Mariano A, Di Carlo A, Santoanastaso C, Oliva A, et al. Expression of Lewis carbohydrate antigens and chromogranin A in human prostatic cancer. *Int J Oncol* 2000;17:167-171.