

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



TESI DOCTORAL

**Estadiatge ganglionar de pacients amb càncer de
pròstata sotmesos a limfadenectomia pelviana
mitjançant el mètode One-Step Nucleic Acid
Amplification: Estudi POPCORN**

Mercè Cuadras Solé

Directors

Prof. Inés M^a de Torres Ramírez

Dr. Jacques Planas Morín

Prof. Juan Morote Robles

Tutor

Prof. Juan Morote Robles

Programa de Doctorat en Cirurgia i Ciències Morfològiques

Departament de Cirurgia

Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona, 2025

*"Science is not a mechanism but a human progress,
and not a set of findings but the search for them."*

Jacob Bronowski, Science and Human Values, 1956

AGRAÏMENTS

No ha estat un camí fàcil, però sí gratificant. Ha estat llarg i ple d'obstacles, amb moments de desànim, però també ric en aprenentatges personals i professionals, que m'han ajudat a créixer en l'àmbit mèdic i científic. I, sobretot, ple d'empentes de suport que han fet possible arribar fins aquí.

Vull agrair en primer lloc al Prof. Juan Morote, sense qui aquesta tesi no hauria estat possible. Gràcies per la confiança, la dedicació i el seu compromís amb la docència i la recerca, així com per respectar els meus ritmes i manera de treballar.

Al Dr. Planas, gràcies per ser un referent constant. Fa anys que aprenc del teu saber quirúrgic, científic i humà. És un privilegi tenir-te com a mentor.

A la Dra. M. Inés de Torres, gràcies per obrir-me les portes de l'Anatomia Patològica i guiar-me en un món desconegut per mi. I a la Dra. Semidey, sense qui aquest projecte no hauria estat possible, pel treball colze a colze i per la seva passió i entrega incombustible.

També vull agrair a la resta de companys del Servei d'Urologia el suport en aquest projecte i, especialment, a aquells que han estat al meu costat en moments de desesperació, escoltant i ajudant-me a tirar endavant fins a culminar-lo. A Jacques, Ana i Lucas per compartir la passió pel càncer de pròstata. I als pacients, per la seva participació desinteressada, que ens ajuda a fer avançar la ciència dia a dia.

Gràcies també a Sysmex per fer-me part d'aquest projecte i per contribuir al seu desenvolupament. També a tots els centres i professionals que han dedicat temps i esforç en aquesta línia d'investigació.

A la meva família, gràcies pel vostre suport incondicional, no només durant aquests cinc anys, sinó des de sempre. He crescut amb la certesa que us tenia al costat, animant-me i celebrant cada petit pas. Gràcies, Marta i Aina, per ser-hi dia rere dia, per escoltar-me i per sostenir-me quan res encaixava. I als avis... als que han marxat aquest

últim any i han deixat un buit immens. Gràcies per tant. Per ser un far de valors, de constància, de generositat i d'esforç. Em queda el vostre exemple gravat a dins i, d'alguna manera, sé que també heu caminat amb mi fins aquí.

Javi, no tinc prou paraules per agrair-te tot el que has significat en aquest camí. Has estat refugi i motor. Has cregut en mi quan jo dubtava, m'has escoltat i abraçat en silenci quan no trobava les paraules, i m'has empès endavant amb aquella energia serena que et caracteritza. Has estat allà en cada moment, compartint els dies bons i sostenint-me en els dies durs. Aquesta tesi també és teva, perquè hi has posat temps, paciència, amor i confiança. Gràcies per fer-me sentir capaç, per treure'm somriures quan només tenia cansament, i per ser-hi sempre, en tot i amb tot.

I a tu, petita Blau, que has vingut a revolucionar-ho tot: GRÀCIES. Enmig d'un ritme intens de recerca i d'objectius professionals per assolir, em recordes cada dia què és realment important. Em pares, em centres, i em dones una força que no sabia que tenia. Amb tu aprenc a mirar el món amb uns altres ulls, a gaudir de les petites coses, i a relativitzar les grans. Aquesta tesi ha estat un repte enorme, però també una manera de mostrar-te que és possible créixer i avançar sense deixar de ser-hi. Gràcies per ser una font d'energia inesgotable, per recordar-me què és essencial i per donar sentit a cada petit esforç. Has estat l'empenta que necessitava per acabar aquest projecte, i fer-ho com jo volia. I d'això, n'estic molt orgullosa.

ABREVIATURES

ARNm: Àcid Ribonucleic Missatger

CK19: Citoqueratina 19

CP: Càncer de Pròstata

AEU: Associació Europea d'Urologia

GG: Grups de Grau

HE: Hematoxilina-Eosina

ISUP: Societat Internacional de Patologia Urològica

LP: Limfadenectomia Pelviana

OSNA: One-Step Nucleic Acid Amplification

PET: Tomografia per Emissió de Positrons

PICO: Population, Intervention, Comparison and Outcomes

PR: Prostatectomia Radical

PRISMA: Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses

PSA: Antigen Prostàtic Específic

PSMA: Antigen Prostàtic Específic de Membrana

QUADAS-2: Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies-2

RM: Ressonància Magnètica

RT-LAMP: Reverse-Transcriptase Loop Mediated Isothermal Amplification

TAB: Biaix d'Assignació Tumoral / Tissue Allocation Bias

TC: Tomografia Computada

TNM: Tumour-Node-Metastasis

TTL: Càrrega Tumoral Total / Total Tumor Load

VPP: Valor Predictiu Positiu

VPN: Valor Predictiu Negatiu

ÍNDIX

RESUM.....	11
ABSTRACT	17
1. INTRODUCCIÓ	23
1.1. Càncer de pròstata.....	25
1.1.1. Epidemiologia i etiologia	25
1.1.2. Sospita i diagnòstic del CP	27
1.1.3. Estadificació clínica i classificació del CP localitzat i localment avançat segons el risc de recurrència bioquímica després d'un tractament primari	27
1.2. Tractament quirúrgic del càncer de pròstata.....	32
1.2.1. Prostatectomia radical	32
1.2.2. Limfadenectomia pelviana	32
1.3. Estadificació ganglionar en el càncer de pròstata.....	33
1.3.1. Estadificació radiològica	33
1.3.2. Limfadenectomia pelviana extensa: tècnica de referència	35
1.3.3. Gangli sentinella	38
1.3.4. Tractament del pacient amb ganglis limfàtics patològics en la limfadenectomia pelviana extensa	40
1.3.5. Anàlisi anatomopatològica dels ganglis limfàtics	41
1.4. One-step nucleic acid amplification (OSNA)	43
2. HIPÒTESI.....	53
2.1. Justificació del projecte	55
2.2. Hipòtesi	58
3. OBJECTIUS	59
4. COMPENDI DE PUBLICACIONS.....	63
4.1. Primera publicació.....	65

4.2.	Segona publicació	76
5.	RESUM GLOBAL DELS RESULTATS	91
6.	RESUM GLOBAL DE LA DISCUSSIÓ	99
6.1.	Discussió	101
6.2.	Limitacions	111
7.	CONCLUSIONS	113
8.	LÍNIES DE FUTUR	117
9.	REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES	121
10.	ANNEX	143
10.1.	Informe del comitè ètic d'investigació clínica	145

RESUM

INTRODUCCIÓ

L'estadiatge ganglionar és un factor pronòstic clau en pacients amb càncer de pròstata (CP) localitzat de risc intermedi o alt. Donada la baixa sensibilitat de les tècniques d'imatge per detectar afectació ganglionar, especialment en casos de micrometàstasi (<5 mm), la limfadenectomia pelviana (LP) continua essent l'estàndard de referència. L'estudi histopatològic convencional del teixit ganglionar es realitza mitjançant fixació, secció i tinció amb hematoxilina-eosina (HE), i consisteix habitualment en la revisió microscòpica d'una part representativa del teixit inclòs. Aquest procés és lent, costós i operador-dependent, presentant limitacions en la detecció de micrometàstasis quan aquestes no es troben en els talls analitzats. El mètode de diagnòstic molecular One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) sorgeix com una alternativa per superar aquestes limitacions, ja que permet analitzar els ganglis sencers de manera automatitzada, objectiva i reproduïble. Basat en la tècnica Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP), OSNA quantifica l'expressió d'àcid ribonucleic missatger (ARNm) de citoqueratina 19 (CK19), un marcador epitelial absent en teixit limfàtic sa, útil com a marcador subrogat de presència tumoral. A més, permet analitzar postoperatòriament el conjunt de ganglis extirpats mitjançant la modalitat d'agrupament de ganglis o *pooling*., OSNA s'utilitza actualment com a eina diagnòstica de referència en l'estudi intraoperatori del gangli sentinella en càncer de mama i obre un nou escenari diagnòstic per avaluar de manera precisa i predictiva la càrrega metastàtica ganglionar en pacients amb CP.

HIPÒTESI

L'anàlisi molecular postoperatori mitjançant la tècnica OSNA en modalitat *pooling* permet un diagnòstic equivalent a l'estudi histopatològic convencional amb tinció HE per determinar l'estat ganglionar en pacients amb CP sotmesos a LP extensa.

OBJECTIUS

Per tal de contrastar la hipòtesis plantejada vam definir el següent objectiu principal:

Comparar l'eficàcia diagnòstica de la tècnica molecular OSNA en modalitat *pooling* amb la de l'anàlisi histopatològica convencional mitjançant tinció amb HE, aplicades postoperatòriament als ganglis limfàtics extrets durant la LP extensa en pacients amb CP.

Com a objectius secundaris vam proposar:

1. Conèixer l'evidència actual sobre la utilització del mètode OSNA pel diagnòstic de metàstasis ganglionars en diferents entitats tumorals i, en particular, en el CP.
2. Dissenyar i dur a terme un estudi prospectiu multicèntric amb l'objectiu de comparar la capacitat diagnòstica de l'anàlisi molecular OSNA en modalitat *pooling* amb la de l'anàlisi histopatològica convencional amb tinció HE, realitzades postoperatòriament en ganglis extirpats durant la LP extensa en pacients amb CP.

MATERIAL I MÈTODES

La present memòria s'ha estructurat com un compendi de dues publicacions.

La primera publicació és una revisió sistemàtica de la literatura en la qual, seguint els principis de la declaració PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) i l'estratègia de selecció PICO (Population, Intervention, Comparison and Outcomes), s'identificaren 244 referències bibliogràfiques, seleccionant-se finalment 25 articles per a l'elaboració de la síntesi d'evidència. L'eina QUADAS-2 (Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies-2) fou utilitzada per analitzar la qualitat dels estudis inclosos.

La segona publicació presenta l'estudi de validació de la tècnica molecular OSNA per al diagnòstic de l'estat ganglionar en pacients amb CP. La tècnica OSNA es compara amb el procediment histopatològic convencional basat en tinció HE.

Es realitzà un estudi prospectiu i multicèntric amb la participació de vuit centres acadèmics. S'inclogueren 131 pacients amb CP localitzat de risc intermedi o alt, sotmesos a LP extensa o amb necessitat de LP de rescat per recaiguda bioquímica després d'un tractament primari. Fou condició *sine qua non* una immunohistoquímica positiva per CK19 en la biòpsia prostàtica i que s'extreguessin un mínim de 12 ganglis durant la LP. El teixit ganglionar enviat en fresc a cada unitat d'Anatomia Patològica es disseccionà per aïllar els ganglis del teixit adipós circumdant. Dels ganglis amb un diàmetre superior a 5 mm, s'obtenia una secció central de 2 mm per a estudi convencional amb tinció HE, i la resta s'incloïa en un tub Eppendorf per a estudi mitjançant OSNA *pooling* (fins a 650 mg de teixit amb un màxim de sis ganglis per tub). En ganglis menors de 5 mm, es realitzà un tall central per dividir-lo en dues meitats. Tots els ganglis foren analitzats amb els dos mètodes.

Histològicament, es considerà micrometàstasi aquell focus patològic d'entre 0,2 i 2 mm, i macrometastasi aquell de mida superior a 2 mm. Pel que fa als resultats d'OSNA, tant tubs com pacients es definiren com a negatius o positius quan l'expressió

d'ARNm de CK19 era <250 còpies/ μ L o ≥ 250 còpies/ μ L, respectivament. Es definí la càrrega tumoral total (TTL) com la suma de totes les còpies d'ARNm de CK19 dels tubs amb sobreexpressió (≥ 250 còpies/ μ L). Les micro i macrometàstasis es definiren segons els criteris proposats per Tsujimoto et al. per al càncer de mama: micrometàstasi, amb nivells d'ARNm de CK19 entre 250 i 5.000 còpies/ μ L, i macrometàstasi, amb nivells superiors a 5.000 còpies/ μ L.

RESULTATS

La revisió sistemàtica de la literatura confirmà que el mètode molecular OSNA presenta una alta precisió diagnòstica per detectar metàstasis ganglionars en diverses entitats tumorals, amb una excel·lent correlació amb l'estudi histopatològic convencional. Tanmateix, hi ha una evidència limitada de la seva utilitat en el CP.

En el segon article, obtinguérem una sensibilitat i un valor predictiu positiu (VPP) per pacient del 73,3%, una especificitat i un valor predictiu negatiu (VPN) del 96,6%, una concordança del 93,9% i un coeficient de correlació Kappa de 0,70 entre els dos mètodes diagnòstics avaluats. Dels vuit casos discordants, quatre foren diagnosticats únicament per la via convencional i quatre, mitjançant el mètode OSNA. D'aquests, sis es classificaren com a micrometàstasi.

CONCLUSIONS

1. El mètode molecular OSNA ofereix uns resultats equivalents als de les tècniques histopatològiques convencionals basades en tinció HE, amb una alta precisió diagnòstica per a la detecció de metàstasis ganglionars en diferents entitats tumorals.
2. OSNA permet quantificar de manera ràpida, objectiva i postoperatòria l'expressió d'ARNm de CK19 en els ganglis extrets durant la LP extensa en pacients amb CP, obtenint resultats comparables als de l'estudi histopatològic convencional amb tinció HE.
3. La modalitat *pooling* possibilitza l'optimització de recursos i l'obtenció d'un valor de càrrega tumoral total (TTL) per a cada pacient. Tanmateix, aquesta modalitat limita l'anàlisi morfològica dels ganglis i la determinació del nombre exacte de ganglis afectats. Malgrat això, la determinació de la TTL podria aportar informació pronòstica i terapèutica rellevant en el futur, tal com ja s'ha observat en altres neoplàsies.
4. Finalment, i com a resposta a l'objectiu principal d'aquest estudi, es conclou que l'estadiatge convencional basat en la tinció HE podria ser substituït pel mètode de diagnòstic molecular OSNA en aquells pacients en què prèviament s'hagi confirmat l'expressió de CK19 en la biòpsia del teixit tumoral prostàtic.

ABSTRACT

INTRODUCTION

Lymph node staging is a key prognostic factor in patients with intermediate- or high-risk localized prostate cancer (PC). Due to the limited sensitivity of imaging techniques in detecting lymph node involvement - particularly in cases of micrometastasis (<5 mm) - pelvic lymphadenectomy (PL) remains the gold standard method. Conventional histopathological analysis of lymph nodes consist on a significant but partial microscopic exam of the node after fixation, sectioning, and haematoxylin and eosin (HE) staining. This process is time-consuming, costly and pathologist dependent. Moreover, it presents some limitations regarding micrometastasis detection. One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) method has been described as an alternative molecular technique to overcome these limitations in a faster, more objective, and reproducible way, including the possibility of analysing all excised lymph nodes postoperatively using pooling method. Through Reverse-Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP), OSNA quantifies messenger RNA (mRNA) expression of cytokeratin 19 (CK19), a marker of epithelial tumour cells that is not present in healthy lymphatic tissue and is useful as a surrogate marker of tumoral presence. OSNA, already established as a reference method for intraoperative sentinel lymph node evaluation in breast cancer, offers new diagnostic opportunities for accurately and reliably assessing nodal metastatic burden in patients with PC.

HYPOTHESIS

Postoperative molecular analysis using OSNA technique with pooling method demonstrates diagnostic performance equivalent to that of conventional

histopathological analysis with HE staining in assessing nodal status in PC patients undergoing extended PL.

OBJECTIVES

To test the hypothesis, the following primary objective was established:

To evaluate the diagnostic accuracy of OSNA technique using pooling method, in comparison with conventional histopathological analysis (HE staining), both performed postoperatively on lymph nodes excised during extended PL in patients with PC.

The secondary objectives were:

1. To review the current evidence on OSNA for the detection of lymph node metastases across different tumour types, with particular focus on PC.
2. To design and conduct a prospective multicentre study evaluating the diagnostic performance of OSNA compared to conventional histopathological analysis (HE staining), performed postoperatively on lymph nodes excised during extended PL in patients with PC.

METHODOLOGY

This doctoral thesis has been structured as a compendium of two publications.

The first publication consists of a systematic review of the literature, conducted in accordance with PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) guidelines and based on PICO (Population, Intervention, Comparison and Outcomes) framework. A total of 244 bibliographic references were initially identified, from which 25 articles were ultimately selected for evidence synthesis. The quality of the

included studies was assessed using QUADAS-2 (Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies-2) tool.

The second publication presents the validation study of OSNA technique for assessing nodal status in patients with PC, comparing OSNA with conventional histopathological analysis based on HE staining.

This prospective multicentre study was conducted across eight academic centres and included 131 patients with intermediate- or high-risk localized PC who underwent extended PL, or salvage PL due to biochemical recurrence following primary treatment. Key inclusion criteria were positive immunohistochemical staining for CK19 in the diagnostic prostate biopsy and resection of at least 12 lymph nodes during PL. Fresh lymphatic tissue samples sent to each Pathology Department were carefully dissected to separate lymph nodes from surrounding adipose tissue. For nodes larger than 5 mm, a 2-mm-thick central section was processed for conventional HE analysis, while the remaining tissue was placed in Eppendorf tubes for OSNA *pooling* (up to 650 mg per tube, with a maximum of six lymph nodes). Nodes smaller than 5 mm were bisected, and each half was analysed using both techniques.

Histologically, a metastatic focus measuring between 0.2 and 2 mm was classified as a micrometastasis, while a focus larger than 2 mm was considered a macrometastasis. OSNA results classified tubes and patients as either negative or positive, based on CK19 mRNA expression levels with a threshold of <250 copies/ μ L for negative results and $\geq$ 250 copies/ μ L for positive results. Total Tumour Load (TTL) was defined as the cumulative CK19 mRNA copies in tubes exceeding the positivity threshold ($\geq$ 250 copies/ μ L). Micro- and macrometastases were further classified according to Tsujimoto et al.'s criteria for breast cancer, whereby micrometastases corresponded to CK19 mRNA expression levels between 250 and 5.000 copies/ μ L, and macrometastases were defined as >5.000 copies/ μ L.

RESULTS

The systematic review of the literature confirmed that OSNA method exhibits high diagnostic accuracy in detecting lymph node metastases across various tumour types, demonstrating excellent correlation with conventional histopathological analysis. However, evidence supporting its utility in PC remains limited.

In our second publication, OSNA method demonstrated a sensitivity and positive predictive value (PPV) of 73.3%, a specificity and negative predictive value (NPV) of 96.6%, and an overall concordance rate of 93.9%. Kappa coefficient between both diagnostic approaches was 0.70, indicating substantial agreement. Among eight discordant cases, four were exclusively detected by conventional histopathological analysis, while the remaining four were identified solely by OSNA. Notably, six of these discordant cases were classified as micrometastases.

CONCLUSIONS

1. OSNA method yields results comparable to those obtained with conventional histopathological analysis using HE staining, demonstrating high diagnostic accuracy in detecting lymph node metastases across various tumour types.
2. OSNA enables rapid, objective, and postoperative quantification of CK19 mRNA expression in lymph nodes excised during extended PL in patients with PC. Its diagnostic performance is equivalent to that of conventional histopathological analysis with HE staining.
3. The *pooling* method optimizes resources utilization and provides a total tumour load (TTL) value for each patient. However, it limits the assessment of lymph node morphology and precludes precise enumeration of metastatic nodes. Despite this

limitation, TTL determination may offer significant prognostic and therapeutic value in the future, as observed in other malignancies.

4. In conclusion, and in line with our primary objective, conventional staging based on HE staining could potentially be replaced by OSNA method in patients with previously confirmed CK19 expression in PC specimens.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. CÀNCER DE PRÒSTATA

1.1.1. Epidemiologia i etiologia

El CP és la segona neoplàsia més prevalent en homes a nivell mundial, sols superada pel càncer de pulmó, sent responsable d'un 14,2% del total de càncers diagnosticats l'any 2022 (1). La seva incidència és molt variable entre les diferents regions geogràfiques i, molt probablement, va lligada a la utilització de l'antigen prostàtic específic (PSA) com a mètode de cribratge i a les recomanacions que en fan els organismes internacionals, així com a l'envelliment de la població (2,3). Així doncs, la incidència de CP és major al Nord dels Estats Units, a Austràlia i al Nord i Oest d'Europa; mentre que a Àsia i al Nord d'Àfrica la taxa d'incidència és menor (1). Pel que fa a mortalitat, el CP és la cinquena causa de mort càncer-específica en homes a nivell global. Destaca, però, que és la principal causa de mort per càncer en alguns països de descendència afroamericana com el Carib o com en la majoria de països de l'Àfrica subsahariana (4). En les figures 1 i 2 s'observen la incidència i la mortalitat del CP estandarditzades per edat i país segons dades obtingudes del Global Cancer Observatory (5).

S'han establert tres principals factors de risc pel CP: l'edat avançada, la ètnia/raça i la història familiar o certes mutacions genètiques o síndromes (3,6). Altres factors exògens o ambientals i hàbits de vida podrien contribuir també en la seva aparició i progressió, però no hi ha suficient evidència científica que recolzi mesures o hàbits de caràcter preventiu (7).

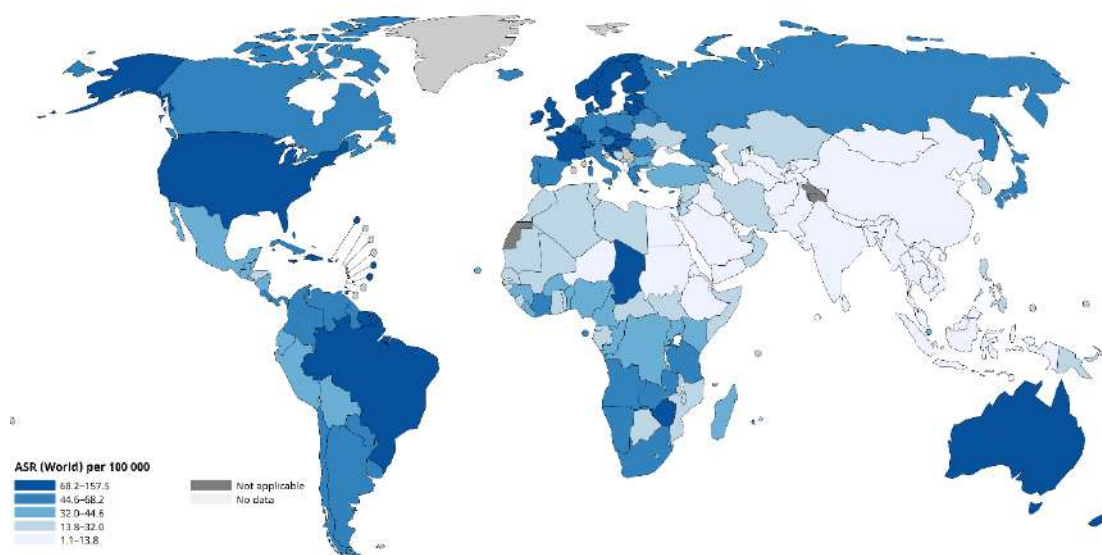


Figura 1. Incidència del CP estandarditzada per edat i país en la població masculina mundial, 2022 (5).

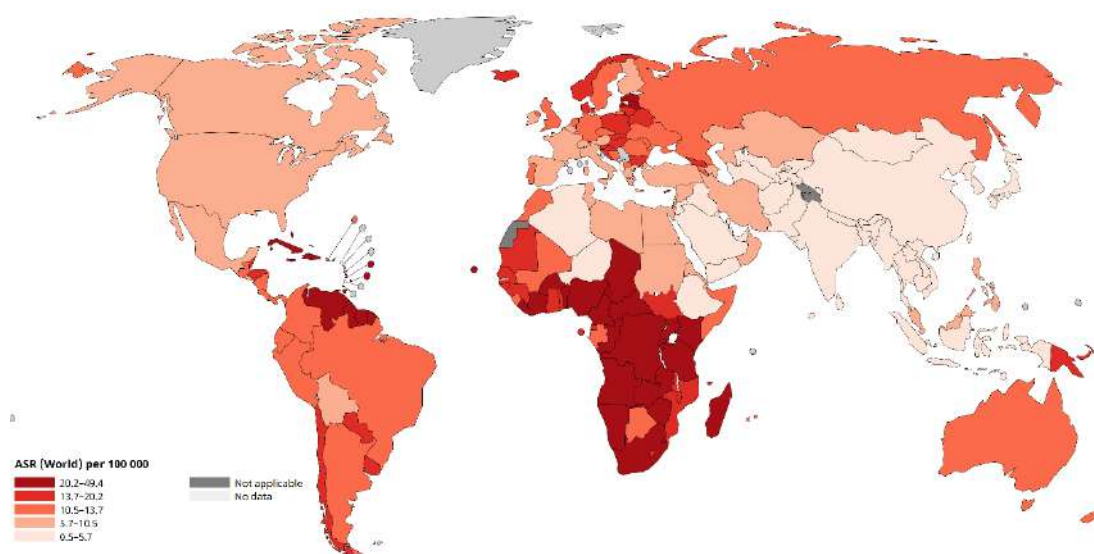


Figura 2. Mortalitat del CP estandarditzada per edat i país en la població masculina mundial, 2022 (5).

1.1.2. Sospita i diagnòstic del CP

La sospita de CP s'estableix habitualment per una elevació de PSA sèric i/o un tacte rectal anòmal. El diagnòstic definitiu quedarà establert mitjançant la realització d'una biòpsia prostàtica i la seva confirmació histopatològica.

La utilització del PSA com a marcador sèric per a sospita de CP, n'ha revolucionat el diagnòstic en les darreres dècades (8), comportant un augment en la seva incidència (9,10). El PSA és una variable contínua i a dia d'avui no es reconeixen valors de tall clarament definits per al diagnòstic de CP (11), establint-se de forma habitual un valor superior o igual a 3 ng/ml com a punt de tall per a prosseguir amb l'estudi diagnòstic (12). Cal tenir en compte, però, que el PSA és un marcador òrgan-específic però no càncer-específic i, per tant, pot elevar-se també per condicions no malignes com hiperplàsia benigna de pròstata o prostatitis i per manipulacions prostàtiques com el tacte rectal (13). És per aquest motiu, que la seva utilització indiscriminada com a instrument de cribratge poblacional encara és motiu de debat (9). Amb l'objectiu de reduir el sobrediagnòstic i, en conseqüència, el sobretractament de CP degut a la utilització del PSA com a únic mètode de cribratge, la ressonància magnètica (RM) prostàtica ha estat validada com a eina complementària per a reduir el nombre de biòpsies de pròstata innecessàries i millorar la precisió diagnòstica del CP clínicament significatiu (14).

1.1.3. Estadificació clínica i classificació del CP localitzat i localment avançat segons el risc de recurrència bioquímica després d'un tractament primari

Realitzar un correcte estadiatge de la malaltia és fonamental donat que impactarà directament tant en la proposta de tractament com en el pronòstic del pacient. A més, altres variables com el valor de PSA i el grau de diferenciació histològica ens aportaran informació pronòstica crucial que complementarà aquest estadiatge.

En el CP, l'estadiatge es basa en el sistema "Tumor-Node-Metastasis" (TNM), que es va implementar per primera vegada el 1978 i té en compte tant l'afectació local, com a distància de la malaltia (15). El sistema d'estadiatge TNM per CP es mostra a la Taula 1.

Taula 1. Classificació clínica del TNM pel CP (Classification of Malignant Tumors, 8th Ed.) (15).

T – Tumor primari (estadiatge basat exclusivament en tacte rectal)	
TX	El tumor primari no es pot avaluar
T0	No hi ha evidència de tumor primari
T1	Tumor clínicament inapreciable, que no és palpable
T1a	Tumor incidental, troballa histològica en ≤ 5% del teixit ressecat
T1b	Tumor incidental, troballa histològica en > 5% del teixit ressecat
T1c	Tumor identificat mitjançant biòpsia prostàtica amb agulla
T2	Tumor que és palpable i es troba confinat dins la pròstata
T2a	Tumor que afecta ≤ 50% d'un lòbul prostàtic
T2b	Tumor que afecta > 50% d'un lòbul prostàtic
T2c	Tumor que afecta ambdós lòbuls
T3	Tumor que s'estén i es palpa més enllà de la càpsula prostàtica
T3a	Extensió fora de la càpsula (uni o bilateral)
T3b	Tumor que envaeix la(les) vesícula(es) seminal(s)
T4	Tumor que es troba fixat o envaeix altres estructures adjacents: esfínter extern, recte, musculatura elevadora i/o paret pelviana
N – Nòduls limfàtics regionals (pelvis)¹	
NX	No es poden avaluar els ganglis limfàtics regionals
N0	Nòduls limfàtics regionals no afectats per disseminació metastàtica
N1	Metàstasi en els ganglis limfàtics regionals
M – Metàstasi a distància²	
M0	No evidència de metàstasi a distància
M1	M1a Gangli(s) limfàtic(s) no regional(s)
M1b	Os(sos)
M1c	Altres localitzacions

¹ Metàstasi amb una mida ≤0,2 cm pot ser designada com a pNmi.

² Quan hi ha més d'una localització de metàstasi, s'utilitza la categoria més avançada. (p)M1c és la categoria més avançada.

Una altra variable essencial per determinar l'agressivitat del tumor, entesa com a capacitat per créixer i estendre's ràpidament, és la histologia. L'adenocarcinoma és el tipus histològic més freqüent. El grau de Gleason és un sistema de classificació desenvolupat el 1974 per D. Gleason i que es basa en el patró arquitectònic de les cèl·lules prostàtiques canceroses (16). Gleason assigna una puntuació de desestructuració cel·lular de l'1 al 5, i reporta els dos patrons predominants trobats en una biòpsia de pròstata, sent l'1 el menys agressiu i el 5 el més agressiu. En cas de coexistir més de dos graus, es recomana incloure el grau més alt, encara que sigui menys del 5% del material de la biòpsia (17). La suma dels dos graus de Gleason va de 2 a 10. Un grau total baix (2 - 6) indica un càncer menys agressiu, mentre que un grau total alt (7 - 10) determina un tumor més agressiu.

El 2014, la Societat Internacional de Patologia Urològica (ISUP) va aprovar un nou sistema de gradació basat en la classificació de Gleason (18). Per una banda eliminava els graus 1 i 2 al no considerar-se cancerosos, permetent així reduir el sobretractament del CP; i per altra, reorganitzava la resta de graus de Gleason en cinc grups de grau (GG) pronòstics que es correlacionen de forma independent amb el risc de progressió de la malaltia. Utilitzant el sistema de la ISUP, els clínics poden avaluar amb més precisió l'agressivitat del CP i proposar el tractament més adequat. El sistema de classificació de la ISUP es representa a la Taula 2.

Taula 2. Relació entre el graus de Gleason i escala de GG dissenyada per la ISUP el 2014 (18).

Sumatori dels graus de Gleason	GG de la ISUP
2-6	1
7 (3+4)	2
7 (4+3)	3
8 (4+4 o 3+5 o 5+3)	4
9-10 (4+5 o 5+4 o 5+5)	5

Darrerament, ha cobrat importància el concepte de CP clínicament significatiu, utilitzat per a diferenciar el CP amb un curs clínic natural indolent, d'aquell que pot

impactar en la morbiditat o supervivència del pacient. Aquesta distinció és important perquè el CP clínicament insignificant és freqüent i ha estat històricament sobrediagnosticat i tractat amb els efectes indesitjats que això pot comportar (3). Tot i que l'agressivitat de la malaltia està condicionada per diferents variables com el PSA, el tacte rectal, l'edat del pacient i/o les seves comorbiditats entre d'altres; el GG de la ISUP és especialment rellevant pel seu impacte pronòstic. Així doncs, el GG 1 es considera generalment com a clínicament insignificant, i en aquells pacients en el que es trobi combinat amb variables de baix risc (veure Taula 3), se'ls recomana realitzar una vigilància activa o observació (17). Existeix però, una falta de consens pel que fa a la definició de CP clínicament significatiu. Si bé és cert que s'ha demostrat que homes amb una puntuació de Gleason de 3 + 4 (GG 2) en la mostra quirúrgica presenten un pronòstic favorable en comparació amb aquells que presenten una puntuació 4 + 3 (GG 3) (19,20) i, que les dades epidemiològiques i d'autòpsies suggereixen que una proporció no menystinguda de CP amb GG 2 romanen indetectables durant la vida d'un home (21); a dia d'avui hi segueix havent una manca d'evidència clara que ens ajudi a identificar els pacients que amb un GG ≥ 2 presentaran un curs clínic desfavorable i es beneficiaran d'un tractament (22); assumint-se doncs per la majoria d'autors un GG 2 o superior com un CP clínicament significatiu.

En la pràctica clínica diària, però, s'utilitza un sistema de classificació que té com a objectiu principal predir l'evolució de la malaltia localitzada o localment avançada, utilitzant l'aparició de recidiva bioquímica en pacients tractats amb intenció curativa com a variable resultat. Aquests sistemes de classificació permeten categoritzar individus amb resultats clínics comparables i, per tant, predir el pronòstic dels pacients, facilitar el disseny d'assaigs clínics i desenvolupar recomanacions de tractament específiques per a cada grup de població.

Un dels primers models descrits fou el de D'Amico el 1998 (23), que combina el valor de PSA amb l'estadiatge clínic local i el grau histològic de Gleason per predir el risc de recidiva bioquímica després d'un tractament amb intenció curativa. Aquest

sistema ha estat àmpliament acceptat com a eina d'avaluació pronòstica en la pràctica clínica i s'ha incorporat en les actuals recomanacions de les guies de l'Associació Europea d'Urologia (AEU). Destacar que, malgrat l'ús ja expansiu de la RM per a l'estadiatge local, el sistema de classificació proposat segueix basant l'estadiatge local en el tacte rectal i incorpora l'avaluació de l'afectació a distància (ganglionar i metastàtica) mitjançant l'ús de la tomografia computada (TC) i la gammagrafia òssia en pacients amb CP de risc intermedi o alt. La classificació de risc de recidiva bioquímica de D'Amico pel CP localitzat o localment avançat adaptada per les guies de l'AEU es presenta en la Taula 3.

Taula 3. Grups de risc de l'AEU per a recidiva bioquímica en CP localitzat i localment avançat (17).

Baix risc	Risc intermedi	Alt risc	
PSA < 10ng/mL i GG < 7 (ISUP 1) i cT1-2a*	PSA 10 – 20ng/mL o GG 7 (ISUP 2/3) o cT2b*	PSA > 20ng/mL o GG > 7 (ISUP 4/5) o cT2c*	Qualsevol PSA o GG (qualsevol ISUP) cT3-4 o cN+**
Localitzat			Localment avançat

*Basat en tacte rectal, ** Basat en TC.

1.2. TRACTAMENT QUIRÚRGIC DEL CÀNCER DE PRÒSTATA

1.2.1. Prostatectomia radical

La prostatectomia radical (PR) és el procediment quirúrgic estàndard per al tractament del CP localitzat en pacients amb una esperança de vida superior a 10 anys. El seu objectiu, independentment del seu abordatge, és erradicar el tumor, preservant sempre que sigui possible la continència urinària i la funció sexual (17). Consisteix en l'exèresi completa de la glàndula prostàtica, amb la seva càpsula i les vesícules seminals, realitzant-se posteriorment una anastomosi uretro-vesical (24).

És cabdal classificar correctament els pacients amb CP per oferir-los la tècnica quirúrgica més adequada, acompanyada o no de LP en funció del seu risc d'afectació nodal. El tractament quirúrgic pot ser entès com a curatiu per sé en CP localitzat de baix risc o risc intermedi o, en context d'un possible tractament multimodal en l'alt risc i el localment avançat.

1.2.2. Limfadenectomia pelviana

Els ganglis de la regió pelviana són els més freqüentment afectats per la disseminació tumoral en pacients amb CP candidats a cirurgia. El risc d'afectació ganglionar en el moment de la PR varia entre un 3 i un 24%, i podria ser major en pacients amb CP d'alt risc (25).

Actualment, però, el paper de la limfadenectomia pelviana en el maneig del CP és controvertit. Per un costat, es considera el mètode d'estadificació ganglionar més exacte i alguns estudis indiquen que com més àmplia (incloent la regió ganglionar presacra i de vasos ilíacs comuns), més precís serà l'estadiatge (26); però per l'altre, el seu benefici oncològic no és clar independentment de la extensió de la mateixa (27). Alguns autors defensen que una millor classificació, mitjançant l'exèresi d'un major nombre de ganglis, comportaria uns millors resultats oncològics al indicar-se de forma

optimitzada tractaments adjuvants com radioteràpia associada, o no, a tractament de supressió androgènica (28).

1.3. ESTADIFICACIÓ GANGLIONAR EN EL CÀNCER DE PRÒSTATA

Determinar l'extensió de la malaltia és fonamental tant per al pronòstic com per a la planificació terapèutica dels pacients amb CP de risc intermedi o d'alt risc. Malgrat una selecció acurada dels pacients candidats a cirurgia o radioteràpia, la recaiguda després d'un tractament amb intenció curativa es dona entre el 27 i el 53% dels casos (17) i, en part, és degut a que les proves d'imatge convencionals utilitzades per a l'estadificació dels pacients (TC i gammagrafia òssia) tenen una sensibilitat i especificitat insuficients (29,30).

1.3.1. Estadificació radiològica

Les proves d'imatge convencionals com la RM pelviana o la TC abdominal, ens proporcionen informació indirecta sobre la invasió ganglionar en funció de la mida i la morfologia dels mateixos. Tot i així, cal tenir en compte que la sensibilitat d'aquestes proves d'imatge és inferior al 40% (31). L'aparició de noves tècniques d'imatge molecular com la tomografia per emissió de positrons/tomografia computaritzada (PET/TC) basada en l'antigen prostàtic específic de membrana (PSMA), han revolucionat l'estadificació a distància dels pacients amb CP. El PSMA és una diana atractiva al tractar-se d'una glicoproteïna de membrana que presenta una sobreexpressió en cèl·lules prostàtiques tumorals, tot i que cal tenir en compte que també s'identifica en teixit prostàtic sa i en d'altres neoplàsies, podent causar falsos positius (32).

Estudis com el proPSMA (33) han demostrat que la PET/TC-PSMA amb Gal·li 68 té una major precisió diagnòstica en la detecció de malaltia a distància, incloent-hi l'afectació ganglionar, en comparació amb les imatges convencionals; comportant un canvi en l'estadiatge del pacient i, en ocasions, en el plantejament inicial de tractament. La revisió sistemàtica i metanàlisi publicada per Wu H. et al. (34) inclogué 13 estudis que compararen la PET/TC-PSMA i la RM demostrant una sensibilitat més alta (65% vs. 41%) i una especificitat similar (94% vs. 92%) pel que fa al diagnòstic de metàstasis ganglionars en pacients amb CP de risc intermedi o alt risc.

Altres estudis han comparat la precisió de la PET/TC-PSMA amb els resultats histològics obtinguts en analitzar la LP extensa, considerada a dia d'avui com l'estàndard de referència. Corfield et al. (35) publicaren una revisió sistemàtica que incloïa una anàlisi d'un subgrup de cinc estudis que correlacionaren els resultats de la PET/TC-PSMA amb Gal·li 68 amb els resultats histològics de la LP extensa, reportant sensibilitats entre el 33 i el 99% i especificitats per sobre del 90%. Un assaig fase III, prospectiu i multicèntric publicat l'any 2020, estudià homes amb CP de risc intermedi i alt que foren sotmesos a PR i LP extensa, mostrant una sensibilitat i una especificitat de la PET/TC-PSMA amb Gal·li 68 del 40 i 95%, respectivament (36). Es coneix que la probabilitat de positivitat de la PET/TC-PSMA va estretament lligada al PSA en avaluar pacients amb recidiva bioquímica (37), no obstant, en l'estadificació primària no s'han trobat clars predictors de positivitat (38).

Així doncs, la PET/TC-PSMA amb Gal·li 68 és més sensible que les proves d'imatge convencionals per a l'estadiatge ganglionar primari; malgrat això, la seva sensibilitat decau quan es compara amb el diagnòstic de referència: l'estudi anatomopatològic dels ganglis extrets en la LP extensa. Això és degut a la limitada resolució espacial de la PET/TC, que comporta certa dificultat per a identificar metàstasis ganglionars inferior a 5 mm (39).

1.3.2. Limfadenectomia pelviana extensa: tècnica de referència

La LP extensa comprèn l'exèresi de tot el teixit ganglionar localitzat al voltant dels vasos ilíacs externs (ascendint fins a encreuament amb l'urèter), així com els ganglis localitzats en la fossa obturadora resseguint el nervi obturador i, aquells que es troben medial i lateral a la artèria hipogàstrica (17).

En l'actualitat, la recomanació sobre els límits de la LP en les guies de l'AEU és clara: sempre que aquesta sigui necessària, s'haurà de realitzar de manera extensa incloent els territoris ganglionars descrits anteriorment (17). Aquest ha estat històricament un motiu de debat en les reunions científiques, existint diferents criteris quant a la correcta extensió d'una LP (40). El drenatge limfàtic de la pròstata és completament erràtic i heterogeni entre pacients (41), dificultant una estandardització de la tècnica quirúrgica. Diversos estudis han definit les àrees ganglionars on més freqüentment podem trobar ganglis patològics, sent les englobades en la definició de LP extensa les més habituals (42,43). L'estudi de Mattei et al. (44), demostrà que dins els límits de la LP extensa es trobava el 75% del drenatge primari de la pròstata enfront al 38% identificat en el camp de dissecció tradicional d'una LP limitada (teixit ganglionar comprès en la fossa obturadora i rodejant la vena ilíaca externa). Analitzant els territoris ganglionars inclosos en la definició de LP extensa, es considera que el 94% dels pacients seran correctament estudiats (45), essent la tècnica que a dia d'avui ens proporciona una estadificació més acurada de la malaltia i, per tant, una informació pronòstica rellevant (26). S'han establert altres límits de major extensió incloent el teixit ganglionar que envolta vasos ilíacs comuns fins a bifurcació aòrtica i també ganglis pre-sacres. Alguns autors, consideren que aquests últims, s'haurien d'incloure en la definició de LP extensa al demostrar que fins a uns 5% dels ganglis extrets en aquesta regió seran metastàtics; percentatge similar al obtingut en la fossa obturadora (45). D'altra banda, més enllà de la delimitació anatòmica, també s'ha suggerit que l'extracció de

més de 10 - 12 ganglis pot considerar-se un criteri pràctic per garantir la qualitat de la dissecció (42,46).

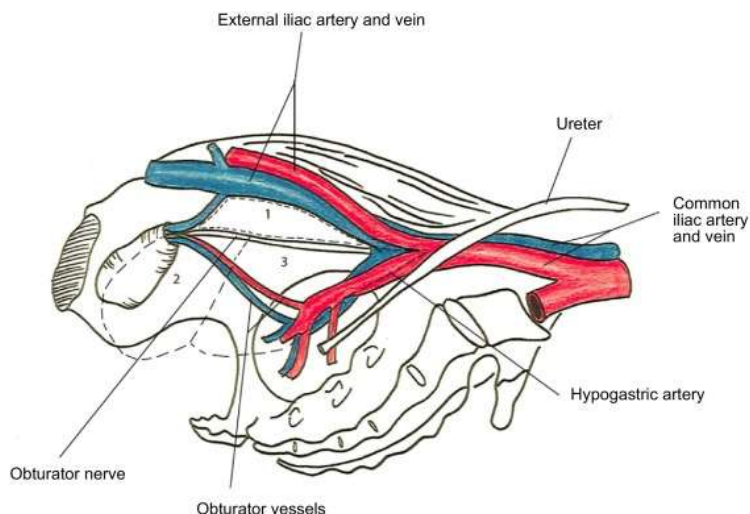


Figura 3. Esquema de les regions limfàtiques de la pelvis. La dissecció limitada dels ganglis inclou la regió 1 (ganglis ilíacs externs), i la dissecció extensa inclou les regions 1, 2 (ganglis de la fossa obturadora) i 3 (ganglis hipogàstrics) (47).

Indicacions

La LP extensa associada a PR està indicada en aquells pacients diagnosticats d'un CP d'alt risc o localment avançat sense evidència de ganglis sospitosos per tècniques d'imatge i que siguin candidats òptims per a rebre un tractament quirúrgic. En el cas de pacients amb CP de risc intermedi, cal una avaluació individualitzada del pacient estimant la probabilitat de ganglis patològics mitjançant la utilització de nomogrames validats (17).

Donat que la TC i la RM són eines diagnòstiques que presenten una baixa sensibilitat per a la detecció de ganglis limfàtics patològics (31), s'han descrit i utilitzat diversos nomogrames que combinen resultats clínics, analítics i histològics per estimar la probabilitat de risc de que un pacient amb CP de risc intermedi presenti realment una disseminació ganglionar pelviana (48,49).

Amb l'aparició de la RM i el diagnòstic mitjançant biòpsia per fusió dirigida a la lesió diana combinada amb biòpsies sistemàtiques, han aparegut propostes que

incorporen aquestes noves variables (50,51). Aquests nous models predictius han estat validats externament en diferents poblacions amb diferent prevalença d'afectació ganglionar per estimar un llindar de risc real d'afectació metastàtica. En el cas del model de Briganti 2019 (50), utilitzant un llindar de possible afectació ganglionar del 7% en una cohort multicèntrica de 487 pacients i una prevalença de metàstasi ganglionar del 8%, s'haurien pogut evitar un 56% de les LP extenses assumint una pèrdua del 2,6% de pacients positius per a metàstasi ganglionar (52). En una altra cohort amb una prevalença del 26% d'afectació ganglionar, el model de Briganti 2019 va mostrar una sensibilitat del 0,96 i una especificitat del 0,18 (53).

Meijer et al. (54), incorporaren els resultats de la PET/TC-PSMA en els models existents en una població de 757 homes sotmesos a PR amb LP extensa millorant substancialment la capacitat discriminativa dels models de Briganti 2017, Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC) i Briganti 2019.

Complicacions

Tot i que la morbiditat de la cirurgia augmenta en els casos que requereixen d'una LP extensa (26), l'aparició de tècniques quirúrgiques mínimament invasives ha contribuït a la disminució de la taxa de complicacions. Mentre en la PR retropúbica oberta amb LP extensa trobàvem fins a un 19,8% de complicacions (enfront 8,2% en la limitada) (55); la taxa de les mateixes en la cirurgia robòtica ha disminuït notablement i es descriu per sota del 8% en la majoria de sèries (56).

El limfocel és la complicació més freqüent independentment de la tècnica quirúrgica; no obstant, la majoria són subclínics. En una revisió sistemàtica de la literatura realitzada per Ploussard et al. (56), les taxes de limfocel simptomàtic secundàries a LP extensa amb tècniques mínimament invasives oscil·laven entre el 0 i el 8%. Autors com Davis et al. descrigueren resultats a favor d'un abordatge transperitoneal per evitar limfocels simptomàtics o necessitat d'un clipatge exhaustiu i/o

fenestració peritoneal al finalitzar el procediment extraperitoneal (57). Les complicacions de grau III - IV en l'escala de Clavien-Dindo relacionades únicament amb la LP extensa oscil·laven entre el 0 i el 5%, sense descriure's cap lesió vascular ni conversió a cirurgia oberta (56). Els esdeveniments tromboembòlics es produeixen en menys d'1% dels casos en general, però el risc relatiu de trombosis venosa profunda o tromboembolisme pulmonar associat a la LP és de 7,8 i 6,3% respectivament, sent aquest risc major en cirurgia oberta i en pacients que presenten història prèvia de trombus, un estadi T4 o una suma de graus de Gleason ≥ 8 (58).

1.3.3. Gangli sentinella

Histològicament, es defineix com a gangli sentinella aquell que rebrà en primera instància les cèl·lules tumorals migratòries d'una determinada lesió neoplàsica. Així doncs, la biòpsia d'aquest(s) gangli(s) resulta útil per determinar quins pacients es beneficiarien d'una limfadenectomia més extensa i, en quins la podríem obviar, evitant així també la morbiditat que aquesta comporta. La biòpsia del gangli sentinella s'empra de forma rutinària en diverses entitats cancerígenes com la mama, el penis o el melanoma; determinant tant l'estadiatge com l'abordatge terapèutic (59–61).

En el CP, el concepte de gangli sentinella fou introduït per primera vegada l'any 1999 per Wawroschek F et al. (62) i, des d'aleshores, múltiples procediments s'han estudiat per tal d'identificar-lo i analitzar-lo. Malgrat l'afany per arribar a un consens (63), la literatura existent avui en dia és metodològicament molt heterogènia i, no existeix doncs, una clara definició de gangli sentinella ni recomanacions sobre candidats idonis, abordatge quirúrgic, tipus de traçador i mètode de detecció; així com tampoc indicacions de com reportar-ne el resultat i fer-ne un seguiment i/o tractament en funció de les troballes.

Rossin et al. (64) publicaren recentment una revisió de 28 estudis ressaltant aspectes procedimentals, de seguretat i viabilitat de la tècnica emprada. La majoria

d'estudis inclosos utilitzaren el nanocolloid de Tecneci 99m i el verd d'indocianina com a traçadors injectats en diferents punts de la glàndula prostàtica o peri/intralesionals per tal d'identificar els ganglis sentinella. Altres traçadors descrits foren els híbrids, resultants per exemple, de la combinació de les dues partícules esmentades anteriorment; així com les nanopartícules superparamagnètiques d'òxid de ferro utilitzades per Engels et al. (65) en el seu estudi d'anàlisi de gangli sentinella mitjançant OSNA. Pel que fa als resultats diagnòstics, destaca una mediana de sensibilitat del 92,5% i un alt VPN del 97,9%, sent aquest últim resultat especialment rellevant al recolzar la noció general de que un gangli sentinella negatiu indica una probabilitat significativament baixa de trobar ganglis no sentinella patològics. En termes oncològics, alguns d'aquests estudis aporten resultats prometedors quant a supervivència lliure de recidiva bioquímica en pacients sotmesos a biòpsia de gangli sentinella combinada amb una LP extensa convencional. La combinació de les dues tècniques es planteja com una bona estratègia per detectar ganglis sentinella situats fora del mapeig de la LP extensa, al demostrar-se un drenatge limfàtic aberrant en un nombre significatiu de pacients amb CP (66). Així doncs, Mazzone et al. (67) van informar que la biòpsia de gangli sentinella amb traçador híbrid es va associar a una millora en la taxa de recidiva bioquímica a 60 mesos per a pacients sotmesos a PR amb LP extensa. Així ho demostraren també Claps et al. (68) al extirpar de forma addicional els ganglis limfàtics guiats per verd d'indocianina en pacients sotmesos a LP extensa en comparació amb aquells a qui se'ls realitzà la LP extensa estàndard. No obstant això, es necessiten més estudis amb seguiment a llarg termini i dissenys aleatoritzats per establir de manera definitiva el seu impacte en la supervivència i el maneig global del CP.

Pel que fa a la seguretat, els procediments relacionats amb la biòpsia del gangli sentinella es consideraren segurs al presentar un nombre limitat d'esdeveniments adversos associats (69). Tot i així, cal tenir present que la dissecció del gangli sentinella fora del patró habitual de LP extensa, pot resultar tècnicament complex i comportar un risc més gran de complicacions poc comunes com lesió ureteral (70).

En els darrers anys ha anat guanyant protagonisme la cirurgia radioguiada amb radiotraçadors PSMA, al ser aquest un marcador àmpliament utilitzat tant en el diagnòstic inicial del CP com en el monitoratge post tractament primari. Maurer et al. (71) descrigueren per primer cop aquest procediment administrant de forma endovenosa un compost radioactiu marcat amb PSMA i, posteriorment, duent a terme una PR amb LP extensa identificant amb sonda gamma intraoperatòria els teixits amb afinitat pel PSMA. Aquesta tècnica, ha estat utilitzada tant en cirurgies de rescat on s'han reportat resultats prometedors de supervivència lliure de recaiguda bioquímica (72), com en cirurgies de tractament primari on es descriu com una tècnica viable i segura. S'esperen en un futur noves experiències amb cohorts més àmplies per demostrar-ne una superioritat respecte les tècniques descrites anteriorment (73).

1.3.4. Tractament del pacient amb ganglis limfàtics patològics en la limfadenectomia pelviana extensa

El nombre de ganglis extirpats durant la LP, el volum tumoral en cadascun d'ells i la presència d'afectació extracapsular ganglionar en pacients amb ganglis patològics per histologia (pN1), són factors predictors de recurrència precoç (74). Diversos estudis han conclòs que aquells pacients pN1 que presenten dos o menys ganglis afectats tindran millors resultats oncològics a llarg termini (75,76). Per altra banda, la densitat ganglionar, entesa com a percentatge de ganglis patològics en relació al total d'extirpats, s'ha associat a un mal pronòstic quan és superior al 20% (77).

Tot i que existeixen estudis prospectius que demostren que el tractament adjuvant amb teràpia de supressió androgènica en pacients pN1 comporta un benefici significatiu de supervivència càncer específica i supervivència global, els seus resultats no es poden generalitzar. Se sap que, malgrat tots els pacients amb afectació ganglionar es classifiquen com a pN1 independentment, per exemple, del nombre de ganglis afectes i/o extrets o de les seves característiques morfològiques, el pronòstic a llarg

termini d'aquest grup de pacients és molt heterogeni i varia segons les característiques de la malaltia (78).

En l'actualitat, les guies de l'AEU de CP es basen en el valor de dos ganglis patològics per determinar, entre d'altres variables, la necessitat d'un tractament adjuvant (17). Així doncs, podem oferir observació (amb un grau dèbil de recomanació) en aquells pacients que presentin una afectació nodal limitada – inferior o igual a dos ganglis patològics – i ens hem de plantejar tractament adjuvant amb radioteràpia i amb, o sense, supressió androgènica en aquells que presentin més ganglis afectats.

1.3.5. Anàlisi anatomopatològica dels ganglis limfàtics

La importància de l'anàlisi anatomopatològica dels ganglis limfàtics en CP rau en determinar quants d'aquests ganglis extrets durant la LP presenten dipòstis de cèl·lules tumorals en el seu interior. D'aquesta manera, podrem realitzar un estadiatge acurat del nostre pacient i determinar-ne la necessitat de tractament adjuvant.

Un cop realitzada la LP, el teixit limfàtic fresc extret durant l'acte quirúrgic es remet al Servei d'Anatomia Patològica. Avui dia, no existeixen unes clares indicacions de com examinar els ganglis limfàtics i el procediment pot variar considerablement segons el patòleg i/o institució (79). Habitualment, es realitza una dissecció manual inicial del teixit adipós per identificar macroscòpicament els ganglis i separar-los de la grassa que els envolta, observant i/o palpant si presenten signes de dipòsit tumoral. Posteriorment, se'n realitza una secció central transversal de 3 - 4 mm de gruix, que s'inclou en un bloc de parafina. En ganglis de gran mida, es poden realitzar seccions paral·leles seriades del mateix gruix, de les quals se'n escullen una o dues representatIVES per ser parafinades. A partir de cada bloc s'obtenen una o dues làmines histològiques de 3 - 5 µm, que es tenyeixen amb HE i es revisen al microscopi. Es recomana avaluar almenys una làmina per cada gangli identificat per garantir un diagnòstic acurat (80). Així doncs, cal tenir present que només s'estudia una fracció

reduïda del volum ganglionar, amb el consegüent risc de no detectar micrometàstasis situades en zones no seccionades. En casos dubtosos, es pot recórrer a tècniques d'immunohistoquímica utilitzant marcadors com PSA, NKX3.1 o la racemasa (AMACR), per incrementar la sensibilitat diagnòstica en la detecció de metàstasi d'origen prostàtic. El teixit restant – principalment limfàtic-adipós – també s'analitza en conjunt parafinant-se i seccionant-se de forma seriada per tal d'identificar ganglis petits que hagin pogut passar desapercebuts en la dissecció inicial (79).

Diversos estudis conclouen que una inclusió completa del teixit limfàtic ressecat augmentaria la probabilitat d'identificar un major nombre de ganglis limfàtics, sent-ne un exemple l'estudi de Perry-Keene J et al. (81) en el qual demostraren com la inclusió en parafina del teixit limfàtic-adipós restant d'una primera dissecció macroscòpica, augmentava el nombre de ganglis identificats de 3,8 a 10,8. Un augment del nombre de ganglis limfàtics va estretament relacionat amb una major probabilitat d'identificar metàstasis ganglionars. En una llarga sèrie de pacients sotmesos a PR amb LP extensa, Touijer et al. (82) descrigueren que la probabilitat de detectar metàstasis ganglionars era entorn a 0 quan s'extreien menys de 10 ganglis i, per sobre del 90%, quan el recompte era de més de 28 ganglis. De la mà, trobem l'estudi basat en una població de 20.789 casos identificats mitjançant la base de dades *Surveillance, Epidemiology, and End Results* i que concloué que l'examen de 20 ganglis limfàtics permet una estadificació precisa en més del 90% dels casos (83).

El sistema d'estadiatge TNM (15) recollit en les guies de l'AEU de CP, classifica tots els pacients amb ganglis positius en la mateixa categoria pN1. Diversos estudis, però, han demostrat que la presència d'una afectació nodal única o limitada confereix un millor pronòstic que una afectació més extensa i, com hem vist anteriorment, aquest és el paràmetre utilitzat avui dia per consensuar decisions sobre tractament adjuvant (84,85). Per altra banda, el volum metastàtic o diàmetre del major dipòsit metastàtic, també ha demostrat un impacte pronòstic significatiu (86). Fleischmann et al. (87) reportaren que un diàmetre metastàtic superior a 10 mm era el factor predictor

independent més rellevant pel que fa a supervivència lliure de recurrència, supervivència càncer-específica i global. Així doncs, ja en el consens de la ISUP al 2009 (88) i amb el suport de la literatura científica, es va determinar que el diàmetre del dipòsit metastàtic de major mida havia de ser reportat de forma rutinària. En aquesta línia, els conceptes de micro i macrometàstasi que es troben recollits en la 8a edició de la Union for International Cancer Control (UICC) descriuen com a micrometàstasi aquell focus tumoral d'entre 0.2 i 2 mm i, macrometàstasi, aquell amb una mida superior a 2 mm. Recentment, s'ha incorporat el concepte de pNmi ("mi" de micrometàstasi) que representa aquell focus metastàtic inferior a 0,2 mm (15). Aquestes classificacions microscòpiques, però, no s'empren a dia d'avui per a prendre decisions en quant a estadiatge i tractament en CP, ja que tot i que alguns estudis evidencien una rellevància clínica, no hi ha una evidència prou sòlida que ho recolzi. Per altra banda, l'extensió extracapsular del tumor en el gangli limfàtic i el GG en el dipòsit metastàtic, no han demostrat ser variables pronòstiques suficientment robustes i no hi ha consens sobre la seva valoració (89).

1.4. ONE-STEP NUCLEIC ACID AMPLIFICATION (OSNA)

La tècnica One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA), desenvolupada per Sysmex Corporation (Kobe, Japó), és un mètode de diagnòstic molecular automatitzat dissenyat per a la detecció ràpida de metàstasi ganglionar, aplicable tant en un escenari intra com postoperatori. El sistema s'executa mitjançant l'equip RD-100i i es basa en la amplificació nucleica en un únic pas, emprant l'enzim transcriptasa inversa i la tècnica *Loop Mediated Isothermal Amplification* (LAMP), que permet la detecció d'ARNm de la CK19.

Les citoqueratines són proteïnes filamentoses intermèdies que constitueixen una part essencial del citoesquelet de les cèl·lules epitelials. Entre les seves funcions principals destaquen el suport estructural i la regulació de processos cel·lulars com la

proliferació, la migració i l'apoptosi (90). De les 20 citoqueratines humanes conegudes, la CK19 és àmpliament expressada en epitelis simples —inclosos els teixits ductals i glandulars—, i és absent en teixit limfàtic normal, fet que la converteix en un excel·lent biomarcador per a la detecció de cèl·lules tumorals epitelials en els ganglis limfàtics (91).

Durant el desenvolupament del mètode OSNA, la companyia Sysmex va avaluar inicialment 45 gens candidats com a marcadors moleculars a partir d'una base de dades pública d'expressió gènica humana. Aquests gens es van seleccionar en base a dues característiques essencials: una elevada expressió en teixit de glàndula mamària i una mínima o nul·la expressió en gangli limfàtic sa. Per validar-ne la seva aplicabilitat, es van comparar els nivells d'expressió d'aquests marcadors en ganglis limfàtics amb metastasi confirmada i en ganglis histològicament negatius. Els set candidats més prometedors es van validar posteriorment en una cohort més àmplia, i la CK19 va destacar per la seva alta sensibilitat i capacitat discriminatòria entre ganglis sans i metastàtics, amb una excel·lent detecció de micrometàstasis.

La fiabilitat de l'amplificació molecular OSNA es basa en el disseny específic dels *primers*, petits fragments d'oligonucleòtids que reconeixen seqüències concretes de l'ARNm d'interès. En el cas d'OSNA, s'utilitzen sis primers optimitzats per a la tècnica LAMP, la qual opera a temperatura constant (65 °C) mitjançant una ADN polimerasa amb activitat de desplaçament de cadena. Aquesta metodologia isotèrmica no només garanteix una amplificació ràpida i específica, sinó que, a diferència de la PCR, evita l'amplificació d'ADN genòmic. Aquest fet es veu reforçat per la naturalesa del medi de reacció: el pH lleugerament àcid del lisat inhibeix l'activitat de la transcriptasa sobre ADN, assegurant que el senyal detectat provingui exclusivament d'ARNm tumoral (92).

Una de les grans avantatges del sistema OSNA respecte a les tècniques histopatològiques convencionals és la possibilitat d'analitzar íntegrament el gangli limfàtic, evitant així el biaix per mostreig inherent a l'anàlisi amb HE i permetent una detecció més acurada de metàstasis, especialment d'aquelles de petit volum. El procediment es realitza sobre teixit ganglionar en fresc, mitjançant la homogeneïtzació

completa del gangli limfàtic en 4ml de tampó de lisat Lynorhag, que estabilitza les molècules d'ARNm, inhibeix ribonucleases i precipita l'ADN genòmic. Posteriorment, la homogeneïtzació se centrifuga i de la fase intermèdia del lisat s'extrau una alíquota de 500 µL: 20 µL es dilueixen 1:10 i s'analitzen amb el reactiu Lyonoamp constituint la mostra d'anàlisi, mentre que els 480 µL restants es congelen com a mostra de *back-up* a -80 °C. Durant l'amplificació isotèrmica es produeix pirofosfat com a subproducte, que precipita formant pirofosfat de magnesi i genera una terbolesa detectable òpticament pel sistema RD-100i. Fins a 14 mostres es poden analitzar simultàniament en l'amplificador, fet que permet una alta eficiència diagnòstica en contextos quirúrgics. El sistema tradueix aquesta senyal en una quantificació semiquantitativa expressada en còpies d'ARNm de CK19 per µL, i es classifica segons els següents intervals (93):

- Negatiu: <250 còpies/µL.
- Micrometàstasi: 250 – 5.000 còpies/µL (equivalent a dipòsit tumoral de 0,2 a 2 mm per HE).
- Macrometàstasi: >5.000 còpies/µL (equivalent a dipòsit tumoral ≥ 2 mm per HE).

En alguns protocols i estudis, s'inclou una categoria addicional per a cèl·lules tumorals aïllades, entre 160 i 250 còpies/µL, tot i que sovint es considera dins el rang negatiu o limítrof.

El rang de pes acceptable per a l'anàlisi amb OSNA és entre 25 i 600 mg. Els ganglis s'han de recollir i processar en fresc, tot i que poden ser congelats a -80 °C si s'ha de posposar l'anàlisi. Els ganglis per sota d'aquest llindar han de ser processats amb tècniques histològiques convencionals, mentre que els que superen els 600 mg han de ser seccionats i analitzats en fraccions separades. En aquests casos, el valor final s'obté sumant les còpies de cada fracció per determinar la càrrega tumoral total, que representa el total de còpies d'ARNm detectades per gangli.

El sistema incorpora mecanismes de detecció i compensació d'inhibidors endògens (proteïnes, hemoglobina), mitjançant controls interns i dilucions automàtiques, assegurant així la fiabilitat del resultat. El temps de processament és d'aproximadament 30 minuts per un gangli i uns 40 minuts per a quatre ganglis, cosa que el fa compatible amb l'escenari intraoperatori.

A més, la tècnica permet l'anàlisi postoperatoria del conjunt de ganglis extirpats mitjançant la modalitat d'agrupament o *pooling*, que possibilita processar fins a 14 mostres simultàniament amb diversos ganglis per tub, sempre que es respecti el rang de pes establert (94,95). Aquesta estratègia no només simplifica el flux de treball, sinó que també optimitza recursos i redueix significativament els costos associats a l'anàlisi molecular (96).

OSNA en càncer de mama

La tècnica OSNA es va aplicar per primera vegada en l'anàlisi intraoperatori del gangli sentinella en càncer de mama l'any 2007, en un estudi de Tsujimoto et al. (93) que en va establir les bases metodològiques i la validesa clínica. Aquest treball definia per primer cop uns punts de tall diagnòstics per distingir entre absència de metàstasi (< 250 còpies/ μL), micrometàstasi ($250 - 5.000$ còpies/ μL) i macrometàstasi (> 5.000 còpies/ μL), establerts a partir de la correlació entre el nombre de còpies d'ARNm de CK19 i el volum del dipòsit tumoral observat a l'estudi histològic.

L'estudi, estructurat en dues fases, incloïa una etapa de desenvolupament i una de validació multicèntrica. Per tal de permetre una comparació acurada entre mètodes, cada gangli limfàtic es dividia, i una part era processada amb OSNA mentre que l'altra era sotmesa a anàlisi histològica mitjançant HE i immunohistoquímica per CK19. En total, s'hi van analitzar 325 ganglis de 101 pacients, i els resultats mostraren una concordança global del 98,2% amb la histologia, i del 96,4% específicament per als ganglis sentinella, amb una sensibilitat del 95% i una especificitat del 100%.

L'ús d'OSNA permet l'anàlisi completa del teixit ganglionar mitjançant homogeneïtzació i lisi, superant el biaix per mostreig inherent a la histologia convencional, que només examina seccions parcials del gangli. Aquesta característica afavoreix la detecció de metàstasis de petit volum i permet obtenir resultats objectius i estandarditzats en temps real. En l'estudi original de validació, es van observar alguns casos discordants entre OSNA i histologia: en quatre ganglis OSNA positius i HE negatius, l'anàlisi immunohistoquímica posterior va confirmar la presència de micrometàstasis en tres d'ells, posant de manifest falsos negatius histològics. En canvi, en dos casos OSNA negatius i HE positius, les metàstasis es localitzaven exclusivament a la fracció no processada molecularment. Aquests resultats posen en relleu que la principal causa de discrepància entre mètodes no és la limitació tècnica d'OSNA, sinó el biaix d'assignació tumoral (TAB), derivat de la necessitat de dividir el gangli per aplicar tècniques diferents.

Després de la seva validació inicial, OSNA es va incorporar progressivament en la pràctica clínica com a tècnica d'anàlisi intraoperatòria del gangli sentinella, especialment en estadis inicials de càncer de mama. La seva capacitat de proporcionar una valoració ràpida i fiable de l'estat ganglionar durant la intervenció permet evitar segones cirurgies i la morbiditat associada a procediments quirúrgics posteriors. El seu bon rendiment diagnòstic ha estat corroborat per metanàlisis com el de Shi et al. (97), amb 2.833 pacients, amb biòpsia de gangli sentinella analitzada per OSNA. En aquest treball, la sensibilitat global fou del 87%, l'especificitat del 92% i l'àrea sota la corba de 0,94, demostrant una excel·lent capacitat discriminatòria. L'estudi també posa en relleu el paper del TAB com a font de falsos resultats histològics, i recomana confirmar l'expressió de CK19 en subtipus on aquesta pot ser més baixa, com els tumors metaplàstics o triple negatius.

Un dels valors afegits més rellevants d'OSNA és la seva capacitat de quantificar la càrrega tumoral total (TTL), especialment quan s'utilitza l'estratègia *pooling*, que consisteix en analitzar conjuntament diversos ganglis. Aquesta quantificació,

expressada en còpies d'ARNm de CK19 per microlitre, permet no només establir un diagnòstic qualitatiu, sinó també estimar la càrrega global de malaltia d'un pacient. El concepte de TTL fou introduït per Peg et al. (98) l'any 2013 com la suma total de còpies de CK19 detectades en tots els ganglis sentinella positius d'un mateix individu. En el context del càncer de mama, la TTL ha demostrat utilitat per predir l'afectació de ganglis axil·lars no sentinella (TTL de $1,5 \times 10^4$ còpies/mL), facilitant així la presa de decisions intraoperatòries i personalitzant l'abordatge quirúrgic en temps real; així com un valor pronòstic de supervivència lliure de malaltia i supervivència global (definir clarament un grup de baix risc (TTL $<2,5 \times 10^4$ còpies/mL d'ARNm de CK19) i un de alt risc (TTL $>2,5 \times 10^4$ còpies/mL) (99).

Recentment, s'ha avaluat l'ús de la tècnica OSNA per detectar metàstasi ganglionar en pacients amb càncer de mama tractades amb teràpia sistèmica neoadjuvant. Una TTL >15.000 còpies/ μ L al gangli sentinella s'ha associat a metàstasi en ganglis no sentinella, amb un valor predictiu negatiu (VPN) del 90,5%, i una TTL >25.000 còpies/ μ L a una pitjor supervivència lliure de malaltia als cinc anys (70,0% vs. 89,9%). L'expressió de CK19 es manté després del tractament, fet que assegura la fiabilitat de la tècnica en aquest context (100).

OSNA en altres tumors

L'aplicació de la tècnica OSNA per a la detecció intraoperatòria de metàstasi ganglionar ha estat àmpliament estudiada en diversos tipus de neoplàsies més enllà del càncer de mama. Un metanàlisi publicat l'any 2021 per Tranoulis et al. (101), que inclou 24 estudis i més de 3.800 pacients, va avaluar la precisió diagnòstica d'OSNA en tumors sòlids com el càncer gastrointestinal, de cap i coll i de tiroides, ginecològic i pulmonar. Els resultats van mostrar una sensibilitat global del 87% i una especificitat del 92%, reforçant el potencial de la tècnica com a eina fiable per a l'estadiatge limfàtic intraoperatori en múltiples entorns oncològics.

OSNA en càncer de pròstata

L'estadificació ganglionar representa encara un repte diagnòstic en el CP. Tot i que la limfadenectomia pelviana es considera el mètode de referència, és una tècnica invasiva amb una morbiditat considerable i un rendiment limitat, ja que només una minoria de pacients amb intermedi-alt risc presenta afectació ganglionar confirmada per histologia. En aquest context, la tècnica OSNA s'ha començat a investigar com a possible alternativa per millorar la detecció de metàstasi ganglionar d'una manera més ràpida, estandarditzada i menys dependent del mostreig i l'observador.

Un dels primers estudis que va avaluar la viabilitat d'OSNA en CP fou el de Winter et al. (102) l'any 2018, que aplicà la tècnica a teixit tumoral obtingut de peces de prostatectomia radical amb l'objectiu de determinar si l'ARNm de CK19 era detectable de manera consistent. Els resultats van mostrar una expressió positiva universal de CK19 en tots els tumors analitzats, independentment del GG, suggerint que aquest marcador podria ser suficientment robust per justificar l'aplicació d'OSNA en pròstata. Aquestes troballes contrasten, però, amb altres estudis que han reportat una expressió més variable de CK19, especialment en tumors de fenotip basal, neuroendocrí o altament desdiferenciat (103,104).

Arran de la confirmació de l'expressió de CK19 en teixit tumoral prostàtic, diversos grups han explorat el potencial de la tècnica OSNA per a l'anàlisi molecular de ganglis limfàtics en el CP. L'estudi de Engels et al. (105) representa el primer treball prospectiu que avalua aquesta tècnica en una cohort de 64 pacients amb CP d'intermedi o alt risc. Per a la detecció del gangli sentinella, es va utilitzar una tècnica basada en injecció intraprostàtica de nanopartícules de ferro i localització amb dispositiu de magnetometria, seguida de LP extensa i PR. Es van analitzar 534 ganglis sentinella, dividits en seccions de 2 mm assignades alternativament a OSNA i histopatologia (HE i immunohistoquímica per CK19). OSNA va mostrar una sensibilitat del 84,2%, una especificitat del 96,1% i una concordança del 94,4% amb la histologia ($\kappa = 0,78$),

millorant encara més en l'anàlisi ajustada per micrometàstasis susceptibles de TAB (sensibilitat del 91.4% i especificitat del 100%). OSNA va permetre identificar metàstasi en set pacients que haurien estat considerats falsos negatius per HE. Tot i aquests resultats prometedors, aquest estudi presenta diverses limitacions. La divisió dels ganglis per a anàlisi paral·lela (OSNA i histopatologia) pot introduir un biaix d'assignació tumoral, especialment rellevant en micrometàstasis que poden quedar confinades a una sola meitat del gangli. A més, el nombre de pacients, tot i ser superior a estudis previs, continua sent relativament limitat ($n = 64$), i se centra només en tumors d'intermedi i alt risc. Tampoc s'inclou un seguiment clínic que permeti valorar el valor pronòstic de la TTL o correlacionar-la amb recidiva o supervivència. Finalment, la dependència exclusiva del marcador CK19, que pot presentar expressió absent o molt dèbil en tumors desdiferenciats, pot afectar la sensibilitat diagnòstica.

En paral·lel, l'estudi de Argun et al. (106) presenta una sèrie pilot de set pacients sotmesos a PR robòtica amb LP extensa, en què es van analitzar 25 ganglis limfàtics mitjançant empremta citològica, HE de secció congelada i OSNA de forma intraoperatòria. Cadascun dels ganglis va ser parcialment examinat mitjançant tècniques convencionals, i la resta del teixit destinat a l'anàlisi molecular. L'estudi va identificar cinc casos amb resultats discordants: en tres d'ells, la histologia va detectar macrometàstasi però OSNA no va identificar, i en dos casos OSNA va detectar micrometàstasi (400 i 1100 còpies/ μ L), que van passar desapercebudes per histologia. Malgrat la rellevància clínica potencial d'aquestes discordances, els autors no en discuteixen les causes ni aporten interpretació clínica dels resultats. Aquest estudi, a més, presenta limitacions importants. La mostra és molt reduïda (7 pacients, 25 ganglis) i la metodologia no inclou protocols estandarditzats ni una anàlisi completa amb immunohistoquímica en tots els casos. No es realitza cap quantificació de TTL, fet que n'impedeix l'aplicació pronòstica, i no s'estudia tampoc l'impacte clínic dels resultats OSNA en el maneig postoperatori. Tampoc s'hi inclou cap anàlisi estadística del rendiment diagnòstic, fet que en limita la capacitat per extreure conclusions clíniques amb validesa. Els autors conclouen que, en

aquest context, l'ús d'OSNA amb CK19 pot no ser fiable per a la detecció de metàtesis ganglionar en el CP.

Pel que fa a les aportacions conceptuals, cal destacar que Engels et al. (105) proposen diverses estratègies per millorar l'aplicació clínica d'OSNA en pròstata. Entre elles, destaquen la necessitat de confirmar prèviament l'expressió de CK19 al tumor primari mitjançant immunohistoquímica, la possibilitat d'agrupar diversos ganglis (metodologia *pooling*) per reduir costos, i la valoració de nous biomarcadors més específics per a pròstata. També suggereixen, per analogia amb el càncer de mama, que la quantificació del TTL podria tenir valor pronòstic i ajudar a personalitzar el tractament adjuvant. Tot i que Argun et al. no plantegen propostes de forma explícita, els seus resultats poc favorables posen en qüestió la fiabilitat del mètode i apunten la necessitat de revisar els criteris d'indicació i interpretació d'OSNA en aquest context.

Finalment, tots dos treballs coincideixen en subratllar la necessitat de nous estudis amb cohorts més àmplies i ben dissenyades, que permetin validar l'ús clínic de la tècnica amb una metodologia estandarditzada. Serà fonamental avaluar no només la sensibilitat i especificitat, sinó també el valor afegit de la quantificació del TTL com a marcador pronòstic, així com els possibles avantatges econòmics i organitzatius derivats d'una aplicació intraoperatòria eficient i fiable.

2. HIPÒTESI

2.1. JUSTIFICACIÓ DEL PROJECTE

El CP representa un dels principals reptes en salut masculina a escala mundial, essent la segona neoplàsia maligna més freqüent i la cinquena causa de mortalitat oncològica entre els homes (1).

En pacients amb CP clínicament localitzat, la presència d'afectació ganglionar regional és un dels factors pronòstics més rellevants, amb una incidència que oscil·la entre el 3% i el 24% (25). Aquesta afectació impacta de manera significativa en la supervivència específica per càncer (27), motiu pel qual una valoració acurada de l'estat ganglionar és essencial per a una planificació terapèutica adequada.

En els darrers anys, l'avenç en tècniques d'imatge molecular, com la PET/TC amb radiofàrmacs dirigits al PSMA, ha millorat notablement la capacitat diagnòstica en comparació amb les modalitats convencionals (TC i RM). Diversos estudis han reportat una especificitat superior al 90% i una sensibilitat variable entre el 33 i el 99% (31). No obstant, la seva capacitat per detectar micrometàstasis (<5 mm) continua sent limitada (39), fet que pot comprometre una correcta estadificació ganglionar. Com a conseqüència, la LP extensa continua essent la tècnica de referència per a l'avaluació ganglionar (17), malgrat estar associada a una taxa de complicacions no menyspreable que oscil·la entre el 8% i el 20%, segons la via quirúrgica emprada (55,56).

Actualment, l'estudi histopatològic amb tinció HE de les mostres obtingues mitjançant LP extensa es considera l'estàndard per a la detecció de metàstasis ganglionars (80). Tanmateix, aquest procediment presenta limitacions importants. D'una banda, habitualment només s'analitza una o poques làmines del gangli de forma aleatòria, deixant part substancial del teixit fora del camp d'observació microscòpica. Aquest biaix, conegut com a biaix per mostreig, pot generar falsos negatius, especialment en casos de metàstasis de petit volum o de distribució focal. D'altra banda, la interpretació microscòpica pot estar subjecta a variabilitat interobservador, fet que

n'afecta la reproductibilitat. A més, es tracta d'un procediment lent i costós, que implica una càrrega assistencial significativa per als serveis d'Anatomia Patològica.

Davant d'aquestes limitacions, és fonamental explorar i validar tècniques alternatives o complementàries que permetin una avaluació més objectiva, sensible i exhaustiva del teixit ganglionar, com és el cas de l'anàlisi molecular mitjançant la tècnica OSNA.

La tècnica OSNA es basa en la detecció quantitativa d'ARNm de CK19, una proteïna d'origen epitelial absent en teixit limfàtic, però àmpliament expressada en tumors epitelials (91,93). Aquesta metodologia permet un processament automatitzat, ràpid i integral de tot el teixit ganglionar, evitant el biaix derivat de l'anàlisi per seccions. OSNA ha estat validada extensament en tumors com el càncer de mama, i també analitzada en el càncer colorectal, gàstric i d'endometri (97,107–109), entre d'altres, mostrant una elevada sensibilitat, especificitat i concordança amb l'estudi histopatològic convencional. Això n'ha propiciat la inclusió en diverses guies clíniques internacionals com a mètode alternatiu a la tinció HE per a l'estudi intra o postoperatori de gangli sentinella en càncer de mama (110,111).

Pel que fa al CP, estudis previs han confirmat l'expressió de CK19 en el teixit prostàtic maligne (102), i investigacions recents han demostrat la capacitat d'OSNA per detectar metàstasis ganglionars amb una elevada concordança respecte a la histopatologia convencional, obrint la porta a la seva aplicació en l'estadiatge ganglionar del CP (105).

En aquest escenari, marcat per la necessitat d'optimitzar l'estadificació ganglionar i minimitzar la morbiditat associada a la LP, la incorporació d'OSNA com a eina complementària o alternativa a la tinció HE esdevé una proposta altament prometedora. A més, el fet que OSNA permeti quantificar la càrrega tumoral total (TTL) pot tenir implicacions pronòstiques i terapèutiques rellevants, com ja s'ha evidenciat en altres tumors (111,112). La modalitat de processament per agrupació o *pooling*, descrita en tumors sense un gangli sentinella clarament identificable o en context de

limfadenectomies extensives (94,95), pot constituir una alternativa eficient per reduir tant el cost com el temps de processament, mantenint o incrementant el rendiment diagnòstic. En aquest context, resulta rellevant aprofundir en la seva validació en el CP, especialment en l'àmbit postoperatori, amb la finalitat de consolidar-ne la utilitat clínica i afavorir-ne la integració en la pràctica assistencial habitual.

2.2. HIPÒTESI

L'anàlisi molecular postoperatori mitjançant la tècnica OSNA en modalitat *pooling* permet un diagnòstic equivalent a l'estudi histopatològic convencional amb tinció HE per determinar l'estat ganglionar en pacients amb CP sotmesos a LP extensa.

3. OBJECTIUS

Objectiu principal:

Comparar l'eficàcia diagnòstica de la tècnica molecular OSNA en modalitat *pooling* amb la de l'anàlisi histopatològica convencional mitjançant tinció amb HE, aplicades postoperatòriament als ganglis limfàtics extrets durant la LP extensa en pacients amb CP.

Objectius secundaris:

1. Conèixer l'evidència actual sobre la utilització del mètode OSNA pel diagnòstic de metàstasis ganglionars en diferents entitats tumorals i, en particular, en el CP.
2. Dissenyar i dur a terme un estudi prospectiu multicèntric amb l'objectiu de comparar la capacitat diagnòstica de l'anàlisi molecular OSNA en modalitat *pooling* amb la de l'anàlisi histopatològica convencional amb tinció HE, realitzades postoperatòriament en ganglis extirpats durant la LP extensa en pacients amb CP.

4. COMPENDI DE PUBLICACIONES

La present memòria de tesi doctoral es compon d'un compendi de dues publicacions.

4.1. PRIMERA PUBLICACIÓ

Títol: Application of One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) in different cancer entities and usefulness in prostate cancer: a systematic review.

Autors: Mercè Cuadras, Jacques Planas, Ana Celma, Lucas Regis, Inés M de Torres, M Eugenia Semidey, Enrique Trilla, Juan Morote.

Revista: BMC Cancer. 2022 Apr 2;22(1):357

DOI: 10.1186/s12885-022-09355-0

Factor d'impacte: 3,8 (2022)

Quartil: 2 en l'àrea d'Oncologia

RESEARCH

Open Access



Application of One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) in different cancer entities and usefulness in prostate cancer: a systematic review

Mercè Cuadras¹, Jacques Planas^{1*} , Ana Celma¹, Lucas Regis¹, Inés M. de Torres², M. Eugenia Semidey², Enrique Trilla^{1†} and Juan Morote^{1,3†}

Abstract

Background: Lymph node (LN) status is a key prognostic factor in the decision-making process of different cancer entities, including prostate cancer (PCa). Sectioning and haematoxylin and eosin (H&E) staining technique remain the gold standard for the evaluation of LN metastases despite some limitations, especially low sensitivity in detecting an accurate tumour burden within the LN, as well as a subjective and time-consuming result. One-step nucleic acid amplification (OSNA) quantifies mRNA copies of cytokeratin 19 (CK19) in a fast, objective, automated, and reproducible way, raising a general interest to explore its utility for lymphatic metastasis identification in different malignancies.

Methods: To present the latest evidence related to the detection of LN metastases in several tumours by using OSNA compared with the conventional H&E method, a systematic review of articles published since March 2021 was conducted using PubMed, Cochrane Library, and Web of Science databases. References from primary papers and review articles were checked to obtain further potential studies. Our procedure for evaluating records identified during the literature search followed the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses criteria. With the aim to design and justify future clinical routine use of OSNA in PCa, novel PCa evidence has been included in this review for the first time.

Results: Twenty five studies were included. LN from six different groups of tumours: breast, gastrointestinal, gynecological, lung, head and neck and prostate cancers has been assessed. OSNA was compared with post-operative formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections with H&E staining as the reference standard. Contingency tables were created, and concordance rate, sensitivity, specificity and predictive values were reported. Seventeen studies analysed the discordant cases using different techniques.

Conclusion: OSNA method has a high diagnostic accuracy for the detection of LN metastases in several CK19 expressing tumours. Available evidence might encourage future investigations about its usage in PCa patients to improve LN staging and prognosis.

*Correspondence: jplanas@vhebron.net

†Enrique Trilla and Juan Morote contributed equally to this work.

This work has been realized in the Surgery and Morphological Sciences Doctorate framework of Universitat Autònoma de Barcelona.

¹ Urology Department, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Keywords: One-step nucleic acid amplification, OSNA, Cytokeratin 19, CK19, Prostate cancer, Lymph node metastases

Background

Prostate cancer (PCa) is the second most incident neoplasm and the fifth cancer specific cause of male mortality worldwide [1]. Upon diagnosis, PCa is classified into major risk categories based on TNM clinical stage, biopsy Gleason score, and serum prostate specific antigen (PSA) levels. High-risk patients associate more biochemical recurrence, metastatic progression, and PCa related death [2].

Pelvic lymph nodes (LN) represent the most common site of metastases in PCa patients considered for surgical treatment. According to the series reviewed, the risk of LN invasion at radical prostatectomy ranges between 3 and 24%, and could be even higher in high-risk PCa patients [3].

Conventional imaging techniques, such as computed tomography and magnetic resonance imaging, have low sensitivity for the detection of LN metastases [4]. The introduction of positron emission tomography with different radiotracers such as ¹¹C-Choline and especially ⁶⁸Ga-PSMA has increased the sensitivity to detect LN metastases. The ⁶⁸Ga-PSMA has demonstrated >90% specificity with sensitivity rates of 33–99% depending on serum PSA [5]. As ≤5 mm metastases are mostly missed by these techniques [6], extended pelvic lymph node dissection (ePLND) remains the most accurate staging procedure despite the fact that up to 20% of patients will present some kind of complication after its performance [7].

Due to the limited sensitivity of imaging techniques in the detection of small metastases, different nomograms based on preoperative characteristics have been described in order to define which PCa patient will truly benefit from an ePLND [8, 9].

Lymphadenectomy extent and histological nodal evaluation have an impact on the staging and consequent prognosis of the disease. The gold-standard procedure consists of a macroscopic identification of the LN, followed by its sectioning into 3–4 mm slices, and then analysis through haematoxylin and eosin (H&E) staining of at least one slice per LN [10]. Main limitations of this approach are metastatic tissue allocation and interobserver bias, as well as being costly and time-consuming.

New methods, such as serial section analysis (slices with a thickness of 1–2 mm), immunohistochemistry (IHC), and molecular tissue analysis using Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) for PSA have demonstrated a higher sensitivity to identifying

low tumour burden in the nodes [11]. High costs, the time required for the analysis, and some limitations to standardization have hindered their routine application, though they remain relevant in clinical research.

In 2008, an innovative biomolecular technique called One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) was introduced in Europe to assess LN metastases. OSNA is an automated system based on reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method, able to quantify copies of cytokeratin 19 (CK19) mRNA. CK19 is a marker expressed by several solid tumours of epithelial origin, but not by healthy lymphatic tissue [12]. OSNA allows a quick and accurate analysis of the tumour burden of entire LN tissue in an objective, automated, and reproducible way [13–15]. It has been proven useful in different cancer entities, such as breast, colorectal, gastric, endometrial, cervical, lung, and head and neck cancer, achieving a high sensitivity and specificity in the detection of LN involvement, as well as a high concordance compared to comprehensive histopathological examination, in some cases even comparable to ultra-staging [16].

OSNA was first applied in the intraoperative analysis of sentinel lymph node (SLN) in breast cancer, introducing an objective evaluation of the nodal tissue, as well as reducing the required time and effort by the laboratory personnel. More than 10 years ago, Tsujimoto et al. [15] demonstrated the correlation between OSNA and conventional histopathological analysis of the SLN in breast cancer and defined the cut-off values for the distinction between macrometastases, micrometastases, and unaffected tissue. Since then, more than 200 studies have been published and the application range of OSNA was extended to other cancer entities [17].

The available scientific and clinical evidence, together with the mentioned characteristics, has introduced OSNA in current national and European clinical guidelines as an alternative technique for the determination of lymphatic involvement in breast cancer through SLN analysis [18]. Moreover, data available from studies in colorectal cancer demonstrated that OSNA is a valid technique for the detection of lymphatic involvement also in this cancer entity [19]. Hence, OSNA is now included in the recommendations for the determination of biomarkers in colorectal carcinoma [20].

Interestingly, the quantitative outcome of the OSNA assay was identified as useful tool to predict, during surgery, non-SLN involvement in breast and gynecological

cancer, thus supporting tailoring of surgical procedure [21]. In breast and colorectal cancer, OSNA was shown to provide also prognostic information [22].

Main advantages and disadvantages of OSNA assay are summarized in Table 1.

Regarding urological tumours, based on previous studies that demonstrated the expression of CK19 in PCa tissue, Winter et al. showed that OSNA method can detect CK19 mRNA in 100% of primary PCa tumours regardless of Gleason score and even more effectively than CK19 IHC expression, suggesting the valid application of this technique in LN evaluation [23]. In a very recent study, Engels et al. [24] demonstrated that OSNA can identify nodal metastases at an equivalent or, in cases of micrometastases, better rate than enhanced histological examination in PCa patients, confirming its promising use in intraoperative decision-making in personalized LN surgery.

To set up future clinical use of OSNA in PCa, the aim of this review is to analyse the available evidence of this technique in different tumours and propose short-term course of actions to transfer the validated concepts and successes from the other malignancies to PCa.

Methods

Search strategy

To retrieve all relevant papers published before the end of March 2021, three databases including PubMed, Cochrane Library, and Web of Science were searched by two independent reviewers combining the following Medical Subject Headings: one-step nucleic acid amplification, OSNA, lymph nodes, lymph node metastases, cytokeratin 19, CK19. References from primary papers and review articles were checked to obtain further potential studies. Our procedure for evaluating records identified during the literature search followed the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses (PRISMA) criteria [25]. Disagreements were resolved through discussion.

Eligible criteria

We defined study eligibility using the PICO strategy (patient population, intervention, comparison, and outcomes) [26]. A study was considered relevant to this review according to the following criteria: 1) Adult patients with confirmed cancer, eligible for surgical treatment and undergoing SLN biopsy (SLNB) or regional lymphadenectomy; 2) patients did not undergo any neo-adjuvant treatment; 3) the main objective was to compare OSNA using fresh LN with postoperative standard formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE)-H&E analysis; 4) LN were dissected and analysed using both OSNA and the standard technique at the same time; 5) the pathological examination method was fully described; 6) results were reported per node (minimum 100 nodes); 7) sufficient data was available to calculate true-positive, false-positive, false-negative and true-negative values. We limited these criteria to English original studies. Review articles, meta-analysis, conference abstracts, and letters were excluded.

Study selection

The flow diagram of study selection process was outlined in Fig. 1. A total of 244 potentially relevant studies were identified using the searching terms described. Eighty-nine duplicated studies were initially excluded. After screening titles and abstracts, 102 papers were removed. From the remaining 52 studies, 28 were excluded after full text review because the comparison was made with intraoperative frozen section or touch imprint cytology as a reference method, less than 100 nodes were included, analysis was performed per patient, or insufficient data was available to form 2 × 2 tables.

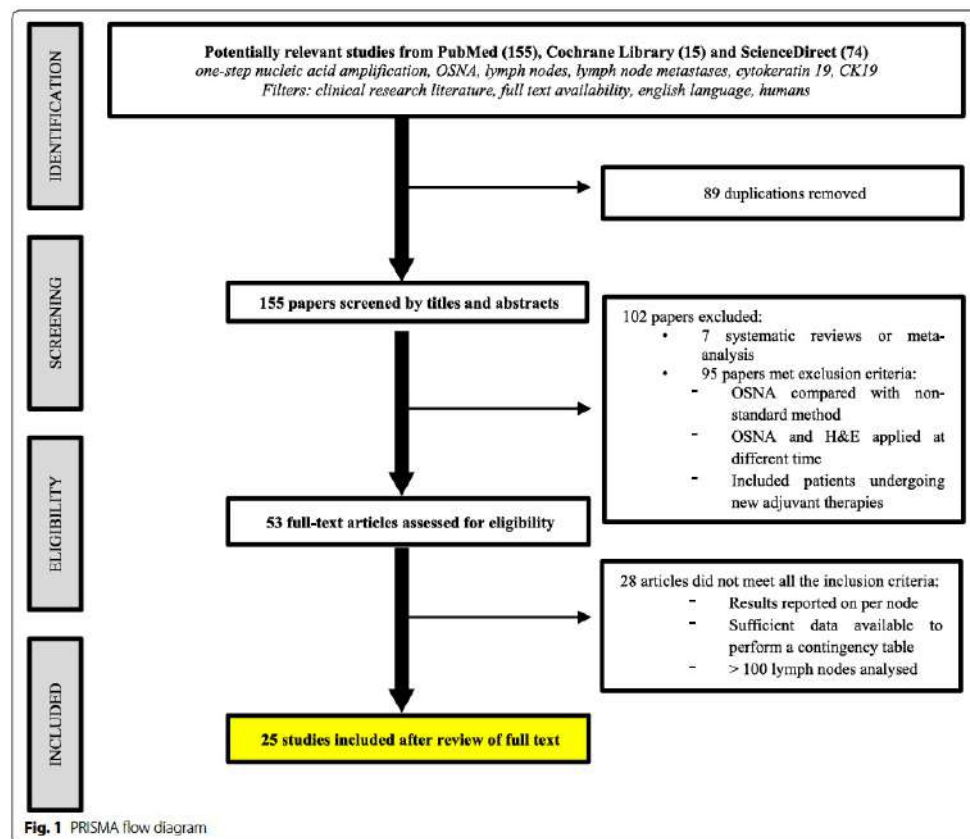
Finally, 25 studies met all the requirements to be considered in the systematic review.

Quality assessment

Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies 2 (QUADAS-2) was used as an evidence-based quality assessment tool [27]. QUADAS-2 comprised four domains: patient selection, index test, reference standard,

Table 1 Advantages and disadvantages of OSNA

Advantages	Disadvantages
Fast, objective, automated, and reproducible technique	Not valid for non-CK19 expressing tumours
Intraoperative analysis	Trained pathologist needed (thorough dissection)
Analysis of the whole LN	Potential contamination of the sample
Quantitative analysis: • Cut-off points for macro and micrometastases • TTL: potential predictive and prognostic factor	Not applicable in case of coexisting neoplasms with the same LN drainage
Ability to a more accurate identification of micrometastases	No tissue left to re-analysis (except RNA-based molecular tests)



and flow and timing. The risk of bias of each study was evaluated by two independent reviewers as low "+", high "-" or unclear "?" risk.

The QUADAS-2 results summarized in Table 2 suggest a low risk of bias and a moderate to high overall quality of all 25 included studies.

Results

The 25 eligible studies have been published between January 2007 and March 2021. Our review included SLN and non-SLN from six different groups of tumours: 1) breast [15, 28–34], 2) gastrointestinal — colorectal [35–38] and gastric cancers [39–41]—, 3) gynecological —cervical [42] and endometrial cancers [43–45]—, 4) lung [46–48], 5) head and neck — head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC)

[49] and thyroid cancers [50]— and 6) PCa [24]. All studies were prospectively designed. OSNA was considered as index test and a threshold of 250 copies of CK19 mRNA per μL was fixed to differentiate between negative (< 250 copies/ μL) and positive (≥ 250 copies/ μL) results. OSNA was compared with post-operative FFPE tissue sections with H&E staining as the reference standard. Eleven studies also included also CK19 IHC analysis in addition to H&E staining and OSNA. A LN was cut into at least two parts (depending on LN size) and divided between OSNA assay and pathology. Contingency tables were created, and concordance rate was reported. Seventeen studies analysed the discordant cases (OSNA + / H&E -; OSNA - / H&E+) using different techniques.

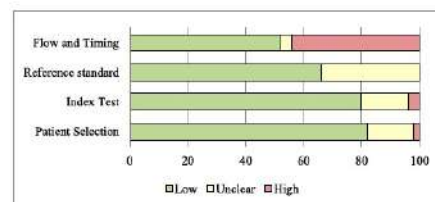
Detailed characteristics are shown in Table 3.

Table 2 Risk of bias of included studies

2a)

Group	Author	Risk of bias						
		Patient selection		Index test		Reference Standard		Flow and timing
		Selection criteria clearly described?	Clinical data available?	Threshold pre-specified?	Uninterpretable results analysed?	Pathology method description?	Blinded pathologist?	Were all samples included?
1)	Tsujiimoto et al. [15]	+	+	+	+	+	?	+
	Feldman et al. [28]	+	+	+	+	+	+	+
	Le Frère-Beida et al. [29]	+	+	+	?	+	+	-
	Vegué et al. [30]	+	+	+	-	+	?	-
	Wang et al. [31]	+	+	+	-	+	+	+
	Pathmanathan et al. [32]	+	+	+	+	+	?	+
	Banerjee et al. [33]	+	+	+	+	+	?	+
	Li et al. [34]	+	+	+	+	+	+	-
	Croner et al. [35]	+	+	+	+	+	?	-
2)	Yamamoto et al. [36]	+	+	+	+	+	+	-
	Guller et al. [37]	+	+	+	+	+	?	+
	Yamamoto et al. [38]	+	+	+	+	+	?	-
	Yaguchi et al. [39]	?	+	+	+	?	+	+
	Kurnagai et al. [40/26]	+	+	+	+	+	+	-
	Shimada et al. [41]	?	+	+	?	+	?	-
	Okamoto et al. [42/29]	+	+	+	+	+	?	+
	Nagui et al. [43]	-	?	+	+	+	?	?
3)	Fanfani et al. [44]	+	+	+	?	+	?	+
	Kost'un et al. [45/30]	+	+	+	?	+	?	+
	Inoue et al. [46]	?	+	+	?	+	?	+
	Nakagawa et al. [47]	+	+	+	+	+	+	-
4)	Escalante-Pérez et al. [48]	+	+	+	+	+	+	+
	Godá et al. [49]	?	?	+	?	+	?	+
5)	Sefin del Carmen et al. [50]	+	?	+	?	+	?	-
6)	Engels et al. [24]	+	?	+	?	+	?	-

2b)



a) Assessment of risk of bias. Summary of risk of bias for each study; +: low risk of bias; -: high risk of bias;?: unclear risk of bias

b) Risk of bias graph about each risk of bias item presented as percentages across all included studies

Table 3 Characteristics of included studies

Group	Author	Year	Country	Tumour type	No. Patients	No. Nodes	Reference method	CK19 IHC	Analysis of discordant cases
1)	Tsujimoto et al. [15]	2007	Japan	Breast	101	325	H&E and IHC	yes	yes
	Feldman et al. [28]	2011	USA	Breast	496	1044	H&E and IHC	yes	yes
	Le Frère-Belda et al. [29]	2012	France	Breast	233	503	H&E and IHC	yes	yes
	Vegué et al. [30]	2012	Spain	Breast	57	567	H&E	yes	no
	Wang et al. [31]	2012	China	Breast	552	1188	H&E	no	yes
	Pathmanathan et al. [32]	2014	Australia	Breast	98	170	H&E and IHC	no	no
	Banerjee et al. [33]	2014	UK	Breast	170	268	H&E	no	no
	Li et al. [34]	2015	China	Breast	115	311	H&E	no	yes
	Croner et al. [35]	2010	Germany	Colorectal	184	184	H&E and IHC	yes	yes
	Yamamoto et al. [36]	2011	Japan	Colorectal	85	385	H&E	no	yes
2)	Guller et al. [37]	2012	Switzerland	Colorectal	22	313	H&E and IHC	yes	yes
	Yamamoto et al. [38]	2016	Japan	Colorectal	204	1925	H&E	no	no
	Yaguchi et al. [39]	2011	Japan	Gastric	32	162	H&E	no	yes
	Kumagai et al. [40]	2014	Japan	Gastric	61	394	H&E	no	yes
	Shimada et al. [41]	2019	Japan	Gastric	43	439	H&E	no	yes
	Okamoto et al. [42](29)	2013	Japan	Cervical	32	130	H&E	no	yes
	Nagai et al. [43]	2015	Japan	Endometrial	35	137	H&E	no	yes
	Fanfarini et al. [44]	2018	Italy	Endometrial	40	110	H&E and IHC	yes	no
	Kost'un et al. [45](30)	2019	Czech Republic	Endometrial	58	135	H&E and IHC	yes	no
	Inoue et al. [46]	2012	Japan	Lung	49	165	H&E and IHC	no	no
4)	Nakagawa et al. [47]	2016	Japan	Lung	111	410	H&E	no	yes
	Escalante-Pérez et al. [48]	2019	Spain	Lung	160	705	H&E and IHC	yes	no
	Goda et al. [49]	2012	Japan	HNSCC	65	312	H&E	no	yes
5)	Sofia del Carmen et al. [50]	2016	Spain	Thyroid	37	267	H&E and IHC	yes	yes
	Engels et al. [24]	2021	Germany	Prostate	64	534	H&E and IHC	yes	yes

CK19 Cytokeratin 19, FN False negative, FP False positive, HNSCC Head and neck squamous cell carcinoma, H&E Hematoxylin and eosin, IHC Immunohistochemistry, No Number of, TN True negative, TP True positive

Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), and concordance are listed in Table 4. Discordant cases are included in the reported results.

Discussion

LN status is a key prognostic factor in the decision-making process of cancer management. For a long time, sectioning and H&E staining technique has been the gold standard for the evaluation of LN metastases. Even though it remains an adequate tool, some limitations have been described, especially low sensitivity in detecting the accurate tumour burden, mainly as a consequence of sampling bias [10], as well as a subjective and time-consuming result. To overcome these limitations, OSNA assay has been developed as a fast, objective, automated, and reproducible way to examine the whole LN, raising a

general interest to explore its utility for lymphatic metastases identification in different tumours.

OSNA gives a quantitative result of CK19 mRNA copies, which is present in several simple epithelia but is not expressed in healthy lymphatic tissue [12]. CK19 was initially proposed as a marker for the detection of LN metastases in breast cancer, where it is found in up to 98% of cases [51]. In 2007, Tsujimoto et al. [15] determined 250 copies/μl as the optimum cut-off point to define a positive axillary LN in breast cancer population. Nonetheless, it is known that the number of positive LN and the size of metastases are significant prognostic factors in most tumours. Therefore, it was also established a second cut-off point of 5000 copies/μl to distinguish between micro and macrometastases [15]. Subsequent studies have confirmed these values and all the results reflected in this review are based on them.

Table 4 OSNA accuracy compared with histopathological examination in included tumours

Group	Author	H&E positive		H&E negative		Sensitivity	Specificity	Concordance
		OSNA negative	OSNA positive	OSNA negative	OSNA positive			
1)	Tsujimoto et al. [15]	0.6 (2)	13.2 (43)	85 (276)	1.2 (4)	95.6	98.6	98.2 (319/325)
	Feldman et al. [28]	3 (31)	10.2 (107)	83.1 (868)	3.6 (38)	77.5	95.8	93.4 (975/1044)
	Le Frère-Belda et al. [29]	2.4 (12)	10.1 (51)	82.1 (413)	5.4 (27)	80.9	93.9	92.2 (464/503)
	Vegué et al. [30]	0 (0)	1.1 (6)	92.1 (522)	6.9 (39)	100	93	93.1 (528/567)
	Wang et al. [31]	2.6 (31)	13.4 (159)	78 (927)	6 (71)	83.7	92.9	91.4 (1086/1188)
	Pathmanathan et al. [32]	1.8 (3)	14.7 (25)	80.6 (137)	3 (5)	89.3	96.5	95.3 (162/170)
	Banerjee et al. [33]	0.7 (2)	14.6 (39)	81 (217)	3.7 (10)	95.1	95.6	95.5 (256/268)
	Li et al. [34]	2 (6)	9.6 (30)	85.5 (266)	2.9 (9)	83.3	96.7	95.2 (296/311)
2)	Cronier et al. [35]	1.6 (3)	20.1 (37)	75.5 (139)	2.7 (5)	92.5	96.5	95.7 (176/184)
	Yamamoto et al. [36]	1 (4)	20.5 (79)	76.6 (295)	1.8 (7)	95.2	97.7	97.1 (374/385)
	Guller et al. [37]	0.6 (2)	16.3 (51)	79.6 (249)	3.5 (11)	96.2	95.7	95.8 (300/313)
	Yamamoto et al. [38]	1 (20)	6.5 (125)	89.2 (1717)	3.3 (63)	86.2	96.5	95.7 (1842/1925)
	Yaguchi et al. [39]	3.1 (5)	24.7 (40)	69.8 (113)	2.5 (4)	88.9	96.6	94.4 (153/162)
	Kumagai et al. [40]	2.3 (9)	11.4 (45)	82.7 (326)	3.6 (14)	83.3	95.9	94.2 (371/394)
	Shimada et al. [41]	1.8 (8)	3.2 (14)	93.9 (412)	1.1 (5)	63.6	98.8	97 (426/439)
	Okamoto et al. [42]	2.3 (3)	2.3 (3)	93.8 (122)	1.5 (2)	50	98.4	96.2 (125/130)
3)	Nagai et al. [43]	2.2(3)	10.2 (14)	86.9 (119)	0.7 (1)	82.4	99.2	97.1 (133/137)
	Fanfani et al. [44]	0.9 (1)	7.2 (8)	86.4 (95)	5.4 (6)	88.9	94.1	93.6 (103/110)
	Kost'un et al. [45]	0.7 (1)	7.4 (10)	78.5 (106)	13.3 (18)	90.9	85.5	85.9 (116/135)
	Inoue et al. [46]	0.6 (1)	11.5 (19)	87.3 (144)	0.6 (1)	95	99.3	98.8 (163/165)
4)	Nakagawa et al. [47]	2.9 (12)	11.5 (47)	81.2 (333)	4.4 (18)	79.7	94.5	92.7 (380/410)
	Escalante-Pérez et al. [48]	0.1 (1)	4.8 (34)	91.3 (644)	3.7 (26)	97.1	96.1	96.2 (678/705)
	Goda et al. [49]	2.6 (8)	17 (53)	77.2 (241)	3.2 (10)	86.9	96	94.2 (294/312)
5)	Sofia del Carmen et al. [50]	5.2 (14)	28.1 (75)	60 (160)	6.7 (18)	84.2	89.9	88 (235/267)
	Engels et al. [24]	2.2 (12)	14.2 (76)	80.5 (452)	3.4 (18)	91.4	100	98.8 (528/534)

Figures are expressed as percentages and (number of cases) in parentheses

H&E Hematoxylin and eosin, No Number of, OSNA One-step nucleic acid amplification

In 2013 V. Peg et al. [21] defined the concept of total tumour load (TTL) as the total CK19 mRNA copies of all positive SLNs. TTL serves as a predictive and prognosis value, providing more accurate staging than pathological findings. Accordingly, different OSNA studies in breast SLN have set cut-off values in order to predict the axillary LN status; some of which (10,000–15,000 copies) are already included in clinical guidelines [52, 53]. In 2017, Rakislova et al. [54] explored its utility to predict recurrences in colorectal carcinoma, and a recent study confirmed that a $TTL \geq 6000$ copies/ μ l was associated with worse disease free survival in those patients [55].

The analysis of SLN in breast cancer patients is still its main clinical application, but over the years OSNA has raised interest in the pathology community for a more accurate LN staging in other cancer entities. In the last decade, several reports comparing OSNA with histopathological examination have been published, but after

a systematic review of the available literature, to date only two studies related to PCa have been found [23, 24].

All the articles included in this review compare OSNA assay with postoperative H&E staining in the same LN. There is a general concordance between OSNA and standard H&E of over 85%. No full information about discordant cases is available, but we have found not only different explanations for them but also heterogeneity in its analysis. Main justifications for the discordant cases are low or no tumour CK19 expression, tumour allocation bias (TAB) and contamination by other epithelial cells [46].

As CK19 is the single molecular marker used in OSNA assay, low tumour CK19 expression may result in a false-negative OSNA case. Different CK19 expression levels have been described for other malignancies such as colorectal (94.1%) [36], gastric (98.6%) [39], gynecological (98%) [43], lung (96%) [48], HNSCC (91.1%) [49] or PCa (100%) [23]. Moreover, certain

tumour subtypes are more likely to the lack of CK19 expression, as observed in metaplastic and lobular breast carcinomas [56]. Interestingly, Goda et al. [49] performed a CK19 IHC in primary HNSCC as a first step when analyzing discordant results, detecting no expression of CK19 in 75% of those cases. Aiming to reduce false-negative cases in breast, thyroid and lung carcinomas, Vegué et al. [30], del Carmen et al. [50], and Escalante Pérez et al. [48] verified the presence of CK19 in primary tumour by IHC before LN analysis. For a more accurate interpretation of the results, we encourage future researchers to include CK19 expression in primary tumours as patient inclusion criteria.

When compared to histopathological examination, OSNA offers the advantage to obtain objective and quantitative data about tumour load of the whole LN in a fast and effortless way, avoiding interobserver variability. However, to properly compare both techniques on the same node, it is mandatory to split it, leading to a possible misdetection of metastasis by one of the methods, which is called TAB. Trying to justify the discrepancies by the need for sectioning, 17 studies have reported different strategies: second-round OSNA analysis, CK19 IHC, exhaustion of the paraffin-embedded SLN slices, CK19 Western blot, or CK19 qRT-PCR. Most of the metastases from the discrepancies were confirmed thanks to these strategies.

In contrast, a potential disadvantage of examining the whole LN with OSNA is that there is no tissue left for subsequent histopathological examination following complete homogenization. Nonetheless, RNA-based molecular tests are possible using OSNA lysate, thus allowing any follow-up molecular testing. Moreover, fresh lymphatic tissue requires a thorough dissection to avoid missing nodes, which must be completely separated from fat tissue by a trained pathologist. It is also important to note that in the case of a coexisting neoplasm, OSNA cannot define which primary tumour the metastases come from and is unable to distinguish LN tumour cells from other benign epithelial inclusions. Therefore, it is imperative to exclude other cancers with the same lymphatic drainage and avoid contaminations.

Despite these concerns, the results reported show a high specificity, concordance rate, and NPV of OSNA assay when compared with the H&E method. Specifically, in breast cancer patients, that high NPV provides enough evidence to become the gold standard for SLN evaluation. As slicing is required for the analysis per node, a concordance of 100% cannot be achieved due to Tab. A high concordance rate of over 85% suggests that OSNA could be an alternative technique to histopathological examination in terms of its ability to detect LN metastases.

Regarding PCa, CK19 has been found not only in neoplastic tissue but also in basal and luminal cells of normal,

dysplastic and benign hyperplastic tissues, although complete data concerning CK19-RNA levels is still missing [57]. In 2018, Winter et al. [23] published the first OSNA assay in PCa. A total of 20 primary PCa tumours from intermediate-high risk PCa patients (Gleason ≥ 7) were analysed. A central slice was analysed by OSNA, while surrounding slices were sent for both conventional H&E staining and CK19 IHC. PCa was confirmed by H&E in all 20 samples; OSNA was able to detect CK19 mRNA in 100% of cases, ranging from 320 to 250,000copies/ μ l while IHC did not detect CK19 in one specimen. Given the small sample size and the high tumour burden of the selected patients, we cannot fully extrapolate these findings for all PCa patients. Recently, Engels et al. [24] published an assay that verifies the reliability of OSNA for the first time in PCa. A total of 574 SLNs from 64 PCa patients undergoing prostatectomy and sentinel lymphadenectomy were included. SLNs were assessed by conventional H&E staining and OSNA assay. The comparison between both techniques showed a sensitivity, specificity and concordance rates of 84.2, 96.1 and 94.4%, respectively, concluding that OSNA assay provides an accurate diagnosis that might improve LN staging in PCa.

To date, the ePLND remains the most accurate staging procedure [58], but individual assessment of all dissected LNs is laborious and time consuming. Using OSNA, LNs can be pooled together and analysed in a few samples as already done in colorectal cancer [54]. In fact, Engels et al. [24] suggested that such approach could be feasible to analyse PCa LNs as a faster and economic alternative.

Based on available evidence, current European PCa Guidelines [58] state a weak recommendation of offering adjuvant therapy to pN1 PCa patients with ≥ 2 positive LN after radical prostatectomy with ePLND, especially in cases with higher pathologic grade, as they have an increased risk of biochemical recurrence. To that point, post-operative OSNA analysis and the possibility to define a TTL value might be helpful in the identification of this subgroup of patients suitable for adjuvant therapy. Moreover, intraoperative use of OSNA may be a great opportunity to set up sentinel-guided LN dissection in PCa. Future investigations may bring light to the clinical impact of OSNA in PCa as well as to its potential predictive and prognostic roles.

Conclusion

OSNA is a suitable tool to standardize LN evaluation in most CK19 expressing tumours due to the possibility to analyse the whole LN in a fast, objective, automated, and reproducible way. According to limited data available, OSNA assay has also demonstrated a high diagnostic accuracy for the detection of LN tumour burden in PCa, but more studies are needed to confirm its validation.

Abbreviations

CK19: Cytokeratin 19; ePLND: Extended pelvic lymph node dissection; FFPE: Formalin-fixed paraffin-embedded; HNSCC: Head and neck squamous cell carcinomas; H&E: Haematoxylin and eosin; IHC: Immunohistochemistry; LN: Lymph node; OSNA: One-step nucleic acid amplification; PCA: Prostate cancer; PSA: Prostate specific antigen; PRISMA: Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses; QUADAS 2: Quality assessment of diagnostic accuracy studies 2; RT-PCR: Reverse transcription-polymerase chain reaction; SLN: Sentinel lymph node; TAB: Tumour allocation bias; TTL: Total tumour load.

Acknowledgements

Not applicable.

Authors' contributions

JM participated in the evidence acquisition. JM, ET, and JP contributed to writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

The authors would like to thank SYSMEX for their insightful suggestions and careful reading of the manuscript. Furthermore authors want to thank the funding support for the English adaptation and the Open Access fee.

Availability of data and materials

All the data and materials analysed are included in the main paper. Further data are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Urology Department, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain.

²Pathology Department, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain.

³Surgery Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

Received: 23 August 2021 Accepted: 28 January 2022

Published: 2 April 2022

References

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424.
- Bianchi L, Gandaglia G, Fossati N, Suardi N, Moschini M, Cucchiaro V, et al. Pelvic lymph node dissection in prostate Cancer: Indications, extent and tailored approaches. *Urol J*. 2017;84(1):9–19.
- Joniou S, Briganti A, Gontero P, Gandaglia G, Tosco L, Rieuws S, et al. Stratification of high-risk prostate Cancer into prognostic categories: a European multi-institutional study. *Eur Urol*. 2015;67(1):157–64.
- Hövels AM, Heesakkers RAM, Adang EM, Jager GJ, Strum S, Hoogeveen YL, et al. The diagnostic accuracy of CT and MRI in the staging of pelvic lymph nodes in patients with prostate cancer: a meta-analysis. *Clin Radiol*. 2008;63(4):387–95.
- Corfield J, Perera M, Bolton D, Lawrentschuk N. 68Ga-prostate specific membrane antigen (PSMA) positron emission tomography (PET) for primary staging of high-risk prostate cancer: a systematic review. *World J Urol*. 2018;36(4):519–27.
- van Leeuwen PJ, Emmett L, Ho B, Delprado W, Ting F, Nguyen Q, et al. Prospective evaluation of 68Ga-prostate-specific membrane antigen positron emission tomography/computed tomography for preoperative lymph node staging in prostate cancer. *BJU Int*. 2017;119(2):209–15.
- Briganti A, Chun FK-H, Salonia A, Suardi N, Gallina A, Da Pozzo LF, et al. Complications and other surgical outcomes associated with extended pelvic lymphadenectomy in men with localized prostate Cancer. *Eur Urol*. 2006;50(5):1005–13.
- Briganti A, Larcher A, Abdollah F, Capitanio U, Gallina A, Suardi N, et al. 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*. 2012;61(3):480–7.
- Gandaglia G, Ploussard G, Valerio M, Mattel A, Flori C, Fossati N, et al. A novel nomogram to identify candidates for extended pelvic lymph node dissection among patients with clinically localized prostate Cancer diagnosed with magnetic resonance imaging-targeted and systematic biopsies. *Eur Urol*. 2019;75(3):505–14.
- Lawrence WD. Association of Directors of anatomic and surgical pathology. ADASP recommendations for processing and reporting of lymph node specimens submitted for evaluation of metastatic disease. *Virchows Arch*. 2001;439(5):601–3.
- Schostak M, Krause H, Miller K, Schrader M, Kempkensteffen C, Koller-mann J. Does the molecular staging in pelvic lymph nodes improve the detection of relevant prostate cancer metastases? An assessment after 6 years. *BJU Int*. 2007;99(6):1409–14.
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytochromes: patterns of expression in normal epithelia, tumours and cultured cells. *Cell*. 1982;31(1):11–24.
- Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes*. 2002;16(3):223–9.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(12):E63.
- Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, Kaneko T, Iwase T, Akiyama F, et al. One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast Cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2007;13(16):4807–16.
- Fanani F, Monterossi G, Di Meo ML, La Fera E, Dell'orto F, Giò A, et al. Standard ultra-staging compared to one-step nucleic acid amplification for the detection of sentinel lymph node metastasis in endometrial cancer patients: a retrospective cohort comparison. *Int J Gynecol Cancer*. 2020;30(3):372–7.
- Tranoulis A, Georgiou D, Yap J, Attard-Montalto S, Twigg J, Elattar A, et al. The evolving role of one-step nucleic acid amplification (OSNA) for the intra-operative detection of lymph node metastases: a diagnostic accuracy meta-analysis. *Eur J Surg Oncol*. 2021;47(6):1233–1243.
- Perry N, Broeders M, de Wolf C, Törnberg S, Holland R, von Karsa L. European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis. Fourth edition - summary document. *Ann Oncol*. 2008;19:614–22.
- Hiyoshi Y, Akiyoshi T, Fukunaga Y. The advantage of one-step nucleic acid amplification for the diagnosis of lymph node metastasis in colorectal cancer patients. *Ann Gastroenterol Surg*. 2021;5:60–6 Blackwell Publishing Ltd.
- García-Alfonso P, García-Carbonero R, García-Foncillas J, Pérez-Segura P, Salazar R, Vera R, et al. Update of the recommendations for the determination of biomarkers in colorectal carcinoma: National Consensus of the Spanish Society of Medical Oncology and the Spanish Society of Pathology. *Clin Transl Oncol*. 2020;22(1):1976–91.
- Peg V, Espinosa-Bravo M, Veltos B, Vilardell F, Antúnez JR, De Salas MS, et al. Intraoperative molecular analysis of total tumour load in sentinel lymph node: a new predictor of axillary status in early breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;139(1):87–93.
- Peg V, Saneano I, Veltos B, Bernet L, Cano R, Córdoba A, et al. Role of total tumour load of sentinel lymph node on survival in early breast cancer patients. *Breast*. 2017;33:8–13.
- Winter A, Engels S, Goos P, Süykers M-C, Henke R-P, Gerullis H, et al. Detection of CK19 mRNA using one-step nucleic acid amplification (OSNA) in prostate Cancer: preliminary results. *J Cancer*. 2018;9(24):4611–7.
- Engels S, Brautmeier L, Reinhardt L, Wasylow C, Hasselmann F, Henke RP, et al. Evaluation of fast molecular detection of lymph node metastases in prostate cancer patients using one-step nucleic acid amplification (OSna). *Cancers (Basel)*. 2021;13(5):1–12.

25. Shamseer L, Moher D, Clarke M, Ghersi D, Liberati A, Petticrew M, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015: elaboration and explanation. *BMJ*. 2015 Jan;350:g7647.
26. Huang X, Lin J, Demner-Fushman D. Evaluation of PICO as a knowledge representation for clinical questions. *AMIA Annu Symp Proc*. 2006;2006:359–63.
27. Whiting PF, Rutjes AWS, Westwood ME, Mallett S, Deeks JJ, Reitsma JB, et al. QUADAS-2: a revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. *Ann Intern Med*. 2011;155(8):529.
28. Feldman S, Krishnamurthy S, Gillanders W, Gittleman M, Beltsch PD, Young PR, et al. A novel automated assay for the rapid identification of metastatic breast carcinoma in sentinel lymph nodes. *Cancer*. 2011;117(12):2599–607.
29. Le Frère-Belda M-A, Bats A-S, Gillatzeau F, Poulet B, Clough KB, Nos C, et al. Diagnostic performance of one-step nucleic acid amplification for intra-operative sentinel node metastasis detection in breast cancer patients. *Int J Cancer*. 2012;130(10):2377–86.
30. Veuqé LB, Rojo F, Hardisson D, Iturrigagoitia AC, Panadés MJ, Velasco A, et al. Comparison of molecular analysis and histopathology for axillary lymph node staging in primary breast cancer: results of the B-CLOSER-I study. *Diagn Mol Pathol*. 2012;21(2):69–76.
31. Wang Y, Ou-yang T, Wu J, Liu Y, Cao X, Sun X, et al. Comparative study of one-step nucleic acid amplification assay, frozen section, and touch imprint cytology for intraoperative assessment of breast sentinel lymph node in Chinese patients. *Cancer Sci*. 2012;103(11):1989–93.
32. Pathmanathan N, Renthawa J, French JR, Edstrom-Elder E, Hall G, Mahajan H, et al. Intraoperative sentinel lymph node assessment in breast cancer: a comparison of rapid diagnostic method based on CK19 mRNA expression and imprint cytology. *ANZ J Surg*. 2014;84(10):730–4.
33. Banerjee SM, Michalopoulos NV, Williams NR, Davidson T, El Sheikh S, McDermott N, et al. Detailed evaluation of one-step nucleic acid (OSNA) molecular assay for intra-operative diagnosis of sentinel lymph node metastasis and prediction of non-sentinel nodal involvement: experience from a London teaching hospital. *Breast*. 2014;23(4):378–84.
34. Li D, Xu X, Chen J, Chen J, Yang B, Yang W, et al. Utility of one-step nucleic acid amplification (OSNA) assay in detecting breast cancer metastases of sentinel lymph nodes in a Chinese population. *Breast Cancer*. 2015;22(2):135–40.
35. Croner RS, Schellera V, Demund H, Schildberg C, Papadopoulos T, Naschberger E, et al. One-step nucleic acid amplification (OSNA) – a new method for lymph node staging in colorectal carcinomas. *J Transl Med*. 2010;8:83.
36. Yamamoto H, Sekimoto M, Oya M, Yamamoto N, Konishi F, Sasaki J, et al. OSNA-based novel molecular testing for lymph node metastases in colorectal Cancer patients: results from a multicenter clinical performance study in Japan. *Ann Surg Oncol*. 2011;18(7):1891–8.
37. Güller U, Zetti A, Wormi M, Langer I, Cabalzar-Wondberg D, Viehl CT, et al. Molecular investigation of lymph nodes in colon cancer patients using one-step nucleic acid amplification (OSNA): a new road to better staging? *Cancer*. 2012;118(24):6039–45.
38. Yamamoto H, Tomita N, Inomata M, Furuhashi T, Miyake Y, Noura S, et al. OSNA-assisted molecular staging in colorectal Cancer: a prospective multicenter trial in Japan. *Ann Surg Oncol*. 2016;23(2):391–6.
39. Yaguchi Y, Sugawara H, Tsujimoto H, Takata H, Nakabayashi K, Ichikura T, et al. One-step nucleic acid amplification (OSNA) for the application of sentinel node concept in gastric Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2011;18(8):2289–96.
40. Kumagai K, Yamamoto N, Miyashiro I, Tomita Y, Katai H, Kushima R, et al. Multicenter study evaluating the clinical performance of the OSNA assay for the molecular detection of lymph node metastases in gastric cancer patients. *Gastric Cancer*. 2014;17(2):273–80.
41. Shimada A, Takeuchi H, Nishi T, Mayanagi S, Fukuda K, Suda K, et al. Utility of the one-step nucleic acid amplification assay in sentinel node mapping for early gastric cancer patients. *Gastric Cancer*. 2020;23(3):418–425.
42. Okamoto S, Niikura H, Nakabayashi K, Hiyama K, Matoda M, Takeshima N, et al. Detection of sentinel lymph node metastases in cervical cancer: assessment of KRT19 mRNA in the one-step nucleic acid amplification (OSNA) method. *Gynecol Oncol*. 2013;130(3):530–6.
43. Nagai T, Niikura H, Okamoto S, Nakabayashi K, Matoda M, Utsunomiya H, et al. A new diagnostic method for rapid detection of lymph node metastases using a one-step nucleic acid amplification (OSNA) assay in endometrial Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2015;22(3):980–6.
44. Fanfani F, Monterossi G, Ghizzoni V, Rossi ED, Dinoli G, Inzani F, et al. One-step nucleic acid amplification (OSNA): a fast molecular test based on CK19 mRNA concentration for assessment of lymph-nodes metastases in early stage endometrial cancer. *PLoS One*. 2018;13(4):e0195877.
45. Kostun J, Pesta M, Slama J, Slunecko R, Vlasak P, Bouda J, et al. One-step nucleic acid amplification vs. ultrastaging in the detection of sentinel lymph node metastasis in endometrial cancer patients. *J Surg Oncol*. 2019;119(3):361–9.
46. Inoue M, Hiyama K, Nakabayashi K, Morii E, Minami M, Sawabata N, et al. An accurate and rapid detection of lymph node metastasis in non-small cell lung cancer patients based on one-step nucleic acid amplification assay. *Lung Cancer*. 2012;78(3):212–8.
47. Nakagawa K, Asamura H, Tsuta K, Nagai K, Yamada E, Ishii G, et al. The novel one-step nucleic acid amplification (OSNA) assay for the diagnosis of lymph node metastasis in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC): results of a multicenter prospective study. *Lung Cancer*. 2016;97:1–7.
48. Escalante Pérez M, Herrmida Romero MT, Otero Alén B, Álvarez Martínez M, Fernández Prado R, de la Torre BM, et al. Detection of lymph node metastasis in lung cancer patients using a one-step nucleic acid amplification assay: a single-Centre prospective study. *J Transl Med*. 2019;17(1):233.
49. Goda H, Nakashiro K, Oka R, Tanaka H, Wakisaka H, Hato N, et al. One-step nucleic acid amplification for detecting lymph node metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2012;48(10):958–63.
50. del Carmen S, Gattius S, Franch-Arcas G, Baena JA, González O, Zafon C, et al. Concordance study between one-step nucleic acid amplification and morphologic techniques to detect lymph node metastasis in papillary carcinoma of the thyroid. *Hum Pathol*. 2016;48:132–41.
51. Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology*. 2002;40(5):403–39.
52. Berner L, Piñero A, Vidal-Sicart S, Peg V, Giménez J, Algara M, et al. Consenso sobre la biopsia selectiva del ganglio centinela en el cáncer de mama. Revisión 2013 de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria. *Rev Esp Patol*. 2014;27(1):43–53.
53. Oncogüla SEGO. Cáncer infiltrante de mama. Guías de práctica clínica en cáncer ginecológico y mamario. Publicaciones SEGO, Junio, 2017.
54. Rakisiova N, Montironi C, Aldecoa I, Fernandez E, Bombi JA, Jimeno M, et al. Lymph node pooling: a feasible and efficient method of lymph node molecular staging in colorectal carcinoma. *J Transl Med*. 2017;15(1):14.
55. Archilla I, Diaz-Mercedes S, Aguirre JJ, Tarragona J, Machado I, Rodrigo MT, et al. Lymph node tumour burden correlates with tumour budding and poorly differentiated clusters: a new prognostic factor in colorectal carcinoma? *Clin Transl Gastroenterol*. 2021;12(3):e00303.
56. Bettington M, Lakhani SR, Ung OA. Is the one-step nucleic acid amplification assay better for intra-operative assessment of breast sentinel nodes? *ANZ J Surg*. 2014;84(10):725–9.
57. Peehl DM, Sellers RG, McNeal JE. Keratin 19 in the adult human prostate: tissue and cell culture studies. *Cell Tissue Res*. 1996;285(1):171–6.
58. Mottet N, Van Den Bergh RCN, Briers E, Van Den Broeck T, Cumberbatch MG, De Santis M, et al. EAU-EANM-ESTRO-ESUR-SIOG guidelines on prostate cancer-2020 update. Part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent. 2020.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

4.2. SEGONA PUBLICACIÓ

Títol: Molecular Detection of Lymph Node Metastases with One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) *Pooling* in Prostate Cancer: The POPCORN Study.

Autors: Mercè Cuadras, Maria E. Semidey , Jacques Planas, Inés M. de Torres, Lucas Regis, Ana Celma, Enrique Trilla, Santiago Ramón y Cajal, Rafael A. Medina, Belén Congregado, David Marcilla, Miguel A. Japón, Miguel Ramirez, Ana Calatrava-Fons, Asier Leivar, María B. Alonso, Eugenia García, Pilar González-Peramato, Dario Vazquez-Martul, Ángel Concha-López, Venancio Chantada, Francisco J. Queipo, José L. Gago, Cristina Carrato, Rafael J. Luque, Juan Moreno-Jimenez, Inmaculada Catalina-Fernández, Cristina León, Juan Morote.

Revista: Int J Mol Sci. 2024 Dec 17;25(24):13489

DOI: 10.3390/ijms252413489

Factor d'impacte: 4,9 (2023)

Quartil: 1 en l'àrea de Bioquímica y Biología Molecular.

Article

Molecular Detection of Lymph Node Metastases with One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) Pooling in Prostate Cancer: The POPCORN Study [†]

Mercè Cuadras ^{1,2,*}, Maria E. Semidey ³, Jacques Planas ^{1,2}, Inés M. de Torres ^{3,4}, Lucas Regis ^{1,2}, Ana Celma ^{1,2}, Enrique Trilla ^{1,2}, Santiago Ramón y Cajal ^{3,4}, Rafael A. Medina ⁵, Belén Congregado ⁵, David Marcilla ⁶, Miguel A. Japón ⁶, Miguel Ramirez ⁷, Ana Calatrava-Fons ⁸, Asier Leivar ⁹, María B. Alonso ⁹, Eugenia García ¹⁰, Pilar González-Peramato ¹⁰, Dario Vazquez-Martul ¹¹, Ángel Concha-López ¹², Venancio Chantada ¹¹, Francisco J. Queipo ¹², José L. Gago ¹³, Cristina Carrato ¹⁴, Rafael J. Luque ¹⁵, Juan Moreno-Jimenez ¹⁶, Inmaculada Catalina-Fernández ¹⁷, Cristina León ¹⁸ and Juan Morote ^{1,2}



Citation: Cuadras, M.; Semidey, M.E.; Planas, J.; de Torres, I.M.; Regis, L.; Celma, A.; Trilla, E.; Ramón y Cajal, S.; Medina, R.A.; Congregado, B.; et al. Molecular Detection of Lymph Node Metastases with One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) Pooling in Prostate Cancer: The POPCORN Study. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 13489. <https://doi.org/10.3390/ijms252413489>

Academic Editor: Yaser Gamallat

Received: 31 October 2024

Revised: 3 December 2024

Accepted: 11 December 2024

Published: 17 December 2024



Copyright © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Urology Department, Vall d'Hebron University Hospital, 08035 Barcelona, Spain; jacques.planas@vallhebron.cat (J.P.); lucas.regis@vallhebron.cat (L.R.); ana.celma@vallhebron.cat (A.C.); enrique.trilla@vallhebron.cat (E.T.); juan.morote@uab.cat (J.M.)
- ² Department of Surgery, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain
- ³ Pathology Department, Vall d'Hebron University Hospital, 08035 Barcelona, Spain; maru.semidey@vallhebron.cat (M.E.S.); ines.detorres@vallhebron.cat (I.M.d.T.); santiago.ramonycajal@vallhebron.cat (S.R.y.C.)
- ⁴ Department of Morphological Sciences, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain
- ⁵ Urology Department, Hospital Universitario Virgen del Rocío, 41013 Sevilla, Spain; rantonio.medina.sspa@juntadeandalucia.es (R.A.M.); belencongregadoruiz@gmail.com (B.C.)
- ⁶ Pathology Department, Hospital Universitario Virgen del Rocío, 41013 Sevilla, Spain; david.marcilla.sspa@juntadeandalucia.es (D.M.); mangel.japon.sspa@juntadeandalucia.es (M.A.J.)
- ⁷ Clínica Uroslud, 46021 Valencia, Spain; mramirez@clinica-uroslud.es
- ⁸ Pathology Department, Institut Valencià d'Oncologia, 46009 Valencia, Spain; acalatrava@fivo.org
- ⁹ Urology Department, Hospital Universitario La Paz, 28046 Madrid, Spain; asier.leivar@salud.madrid.org (A.L.); mb.alonsobartolome@gmail.com (M.B.A.)
- ¹⁰ Pathology Department, Hospital Universitario La Paz, 28046 Madrid, Spain; egfernandez@salud.madrid.org (E.G.); mpilar.gonzalezperamato@salud.madrid.org (P.G.-P.)
- ¹¹ Urology Department, Hospital Universitario A Coruña, 15006 A Coruña, Spain; dario.martul@gmail.com (D.V.-M.); venancio.chantada.abal@sergas.es (V.C.)
- ¹² Pathology Department, Hospital Universitario A Coruña, 15006 A Coruña, Spain; angel.concha.lopez@sergas.es (A.C.-L.); pabdiqipo@gmail.com (F.J.Q.)
- ¹³ Urology Department, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, 08916 Badalona, Spain; jlgago.germanstrias@gencat.cat
- ¹⁴ Pathology Department, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, 08916 Badalona, Spain; ccarrato.germanstrias@gencat.cat
- ¹⁵ Pathology Department, Hospital Universitario de Jaén, 23007 Jaén, Spain; rafaelj.luque.sspa@juntadeandalucia.es
- ¹⁶ Urology Department, Hospital Universitario de Jaén, 23007 Jaén, Spain; juanmoreno35@hotmail.com
- ¹⁷ Pathology Department, Hospital Universitario de Puerto Real, 11510 Cádiz, Spain; mycafe@telefonica.net
- ¹⁸ Urology Department, Hospital Universitario Puerta del Mar, 11510 Cádiz, Spain; cristinaleondelgado@hotmail.com

* Correspondence: merce.cuadras@vallhebron.cat; Tel.: +34-662100340

[†] This article is a revised and expanded version of a paper entitled Insights into [POPCORN Study: Application of the "One-Step Nucleic Acid Amplification" (OSNA) Method for the Detection of Nodal Metastasis in Patients with Prostate Cancer], which was presented at [39th Congress of the European Association of Urology (EAU24), Paris, France, 5–8 April 2024].

Abstract: Pelvic lymph node dissection (PLND) is the most accurate procedure for lymph node (LN) staging in prostate cancer (PCa) patients. LN sectioning and hematoxylin and eosin (H&E) staining of at least one slice remains the gold standard for LN evaluation, potentially leading to misdetection of small metastatic focus. Entire LN analysis is possible with One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) by detecting cytokeratin 19 (CK19) mRNA as a surrogate for LN invasion. This study aimed to compare postoperative performance of OSNA pooling with conventional H&E

staining for pathological LN detection in PCa patients. POPCORN was an observational, prospective, and multicenter study of patients with PCa who underwent PLND. Dissected LNs were analyzed by both methods. This study included 2503 LNs from 131 patients, showing no statistically significant differences in pathological LN detection. Concordance between methods was high (93.9%), as were specificity (96.6%) and negative predictive value (96.6%) of OSNA pooling. The measure of agreement (Cohen's Kappa [κ]) was 0.70. Only eight (6.1%) discordances were observed, including four misdetections from each method. Results showed a high concordance between OSNA pooling and H&E staining, suggesting that OSNA pooling may be a good alternative to H&E staining to detect LN metastases in PCa patients.

Keywords: prostate cancer; pelvic lymph node dissection; lymph node metastases; OSNA; cytokeratin 19; pooling; hematoxylin and eosin staining

1. Introduction

Pelvic lymph nodes (LNs) are the most frequent site of metastases in prostate cancer (PCa), with 13.8% to 18.8% of patients with PCa who underwent radical prostatectomy with pelvic LN dissection (PLND) showing LN invasion [1,2]. In addition, pelvic LN metastases have been related to worse prognoses [3–5]. Therefore, identifying pelvic LN metastases is crucial to guide therapeutic decisions in these patients.

To date, no presurgical test has shown enough sensitivity to detect LN metastases [6]. In recent years, new imaging techniques have been developed for diagnosing LN invasion in patients with PCa, such as Ga-68 prostate-specific membrane antigen (PSMA) positron emission tomography combined with computed tomography (PET/CT) scan, which has shown improved sensitivity and accuracy compared with conventional imaging techniques [7]. However, Ga-68 PSMA-PET/CT scan does not detect most of the smallest metastatic LNs (i.e., <5 mm) compared with histopathological examination [8]. Additionally, according to recent findings, PSMA-PET/CT scan does not preclude the need for an extended PLND in PCa patients at high risk or in those with ductal adenocarcinoma [9]. Thus, extended PLND remains the most accurate method for LN staging of patients with localized and locally advanced PCa. European Association of Urology (EAU) risk groups for biochemical recurrence [10] and nomograms are used to assess the risk of having LN metastases and consequently identify candidates for extended PLND [11].

After performing a PLND, LNs are sectioned into 3–4 mm slices, and at least one of them is prepared for microscopic examination after hematoxylin and eosin (H&E) staining [12]. This technique is currently the gold-standard method for LN assessment, but also presents several limitations, including low sensitivity in detecting micrometastases—generally due to tissue allocation bias (TAB), which hinders the detection of metastases located outside the analyzed slice—interobserver bias, and its time-consuming nature. To overcome these limitations, new molecular methods have been developed, such as One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA).

OSNA is a molecular technique that allows the detection of mRNA of cytokeratin 19 (CK19), an epithelial membrane protein found in some tumors and used as a biomarker of LN metastases in different types of cancer [13,14]. It allows a quick analysis of the entire LN, either intraoperatively or in a postoperative scenario, by using the reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) method to amplify CK19 mRNA. This technique was initially applied for the intraoperative evaluation of sentinel LNs in breast [15], but it also allows a pooled analysis of a high number of LNs with few molecular tests, as demonstrated for patients with colorectal carcinoma or non-small cell lung cancer [16,17].

Regarding PCa, Winter et al. detected the overexpression of CK19 mRNA with OSNA in primary PCa tumors of all patients included in the study [18]. Later, Engels et al. used OSNA to stage 64 patients with PCa, finding a good sensitivity, specificity, and concordance

versus H&E staining [19]. However, more studies are needed to confirm the usefulness of OSNA in staging PCa patients. Given the lack of consensus on defining and identifying sentinel LNs in PCa, the current guidelines' recommendations on conducting an extended PLND when LN staging is required, and the high yield of LNs retrieved following an extended PLND, we considered it essential to evaluate the performance of the OSNA technique for identifying LN metastases by using a LN pooling approach. Additionally, we hypothesized that LN staging via OSNA pooling may be at least comparable to LN staging performed with H&E staining. Therefore, this study aimed to assess the performance of OSNA (specifically, OSNA pooling) in detecting LN metastases in patients with PCa who had undergone PLND using conventional H&E staining as the reference method.

2. Results

2.1. Characteristics of Study Patients

This study included 131 patients, of whom only 1 (0.8%) had undergone a salvage PLND. As shown in Table 1, at the time of diagnosis, most patients were classified as having PCa at clinical stages T1c/2a and N0, and the most common International Society of Urological Pathology (ISUP) grade groups of biopsies were 2 and 3. Similarly, after surgery, most patients were diagnosed with pathological stages T2/3a and N0, and the most common ISUP grade groups of the surgically removed prostates were 2 and 3.

Table 1. Characteristics of study patients at diagnosis. $n = 131$, unless otherwise specified.

Age (years), median (IQR)	65.0 (59.5–69.0)
Serum PSA (ng/mL), median (IQR)	8.5 (5.7–12.7)
Clinical T stage, n (%), $n = 130$	
cT1c	76 (58.5)
cT2a	28 (21.5)
cT2b	12 (9.2)
cT2c	5 (3.8)
cT3	9 (6.9)
Clinical N stage, n (%)	
0	126 (96.2)
1	5 (3.8)
Prostate biopsy grade group, n (%), $n = 130$	
1	10 (7.7)
2	37 (28.5)
3	61 (46.9)
4	22 (16.9)
5	0 (0.0)
Criteria for lymphadenectomy, n (%), $n = 130$	
Intermediate risk (nomogram)	92 (70.8)
High risk	38 (29.2)
Pathological T stage, n (%), $n = 129$	
pT2	48 (37.2)
pT3a	54 (41.9)
pT3b	27 (20.9)
Pathological N stage, n (%)	
0	116 (88.6)
1	15 (11.5)

Table 1. Cont.

Surgical specimen grade group, n (%), n = 129	
1	1 (0.8)
2	42 (32.6)
3	67 (51.9)
4	12 (9.3)
5	7 (5.4)

PSA, prostate-specific antigen.

A total of 2503 LNs were removed, corresponding to a median (IQR) of 18.0 (14.0–23.0) LNs per patient. According to H&E staining, 116 (88.6%) patients did not have any pathological LN, 11 (8.5%) showed 1 or 2 metastatic LNs, and 4 (3.0%) had >2 LNs affected.

2.2. Detection of Lymph Node Metastases per Patient with OSNA Pooling

After LN sample pooling, 972 sample tubes were obtained to be analyzed by OSNA pooling, containing a median (IQR) of 2.0 (1.0–3.0) LNs each. The discrimination capacity of this method to identify LN metastases already detected with H&E staining is shown in Figure 1.

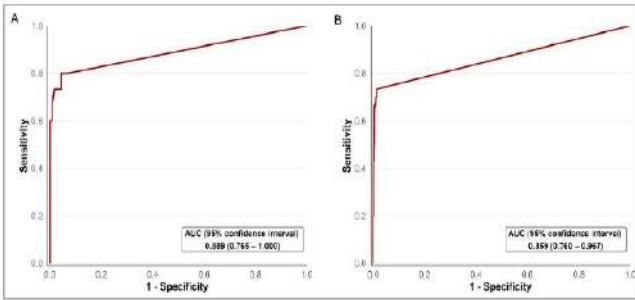


Figure 1. Receiver operating characteristic curves showing the discrimination ability of OSNA to identify lymph node metastases already diagnosed with H&E staining. Results are presented by patient (A) and sample tube (B). A threshold of 250 copies/ μ L of CK19 mRNA is used as a surrogate marker for LN metastasis in PCa, as outlined in the manufacturer's manual.

As seen in Table 2, no statistically significant differences were observed between OSNA pooling and conventional H&E staining for LN metastasis detection, and only eight (6.1%) patients showed discordant results with H&E staining and OSNA pooling: four (3.1%) patients tested positive according to OSNA pooling but negative as per H&E staining, and four (3.1%) patients tested negative according to OSNA pooling but positive as per H&E staining. The Venn diagram represented in Figure 2 visually delineates the overlap and differences in results between H&E staining and OSNA pooling.

Table 2. Crosstabs of OSNA pooling results per patient, using H&E staining as reference method, n (%).

		H&E Results		All	p
		Negative	Positive		
OSNA results	<250 copies	112 (85.5)	4 (3.1)	116 (88.5)	1.00
	$\geq$ 250 copies	4 (3.1)	11 (8.4)	15 (11.5)	
	All	116 (88.5)	15 (11.5)	131 (100.0)	

H&E, hematoxylin and eosin; OSNA, One-Step Nucleic Acid Amplification.

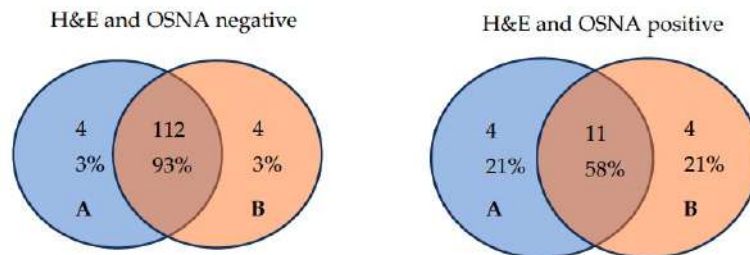


Figure 2. Comparison of examination results for the presence of tumor cells using the H&E staining and OSNA pooling methods. A: H&E, hematoxylin and eosin; B: OSNA, One-Step Nucleic Acid Amplification.

Additionally, Table 3 shows a strong concordance between OSNA pooling and conventional H&E staining, a high level of agreement, and robust specificity and NPV for OSNA.

Table 3. Concordance and performance parameters of OSNA pooling results to identify lymph node metastases per patient using H&E staining as reference method, % (95% confidence intervals).

Concordance	93.9 (88.4–96.9)
Sensitivity	73.3 (48.1–89.1)
Specificity	96.6 (91.5–98.7)
PPV	73.3 (48.1–89.1)
NPV	96.6 (91.5–98.7)
Kappa coefficient	0.70 (0.62–0.78)

H&E, hematoxylin and eosin; OSNA, One-Step Nucleic Acid Amplification; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.

2.3. Discordances Between H&E Staining and OSNA Pooling

Figure 3 shows an overview of the concordance between OSNA and histopathology considering the copies of CK19 mRNA detected by OSNA.

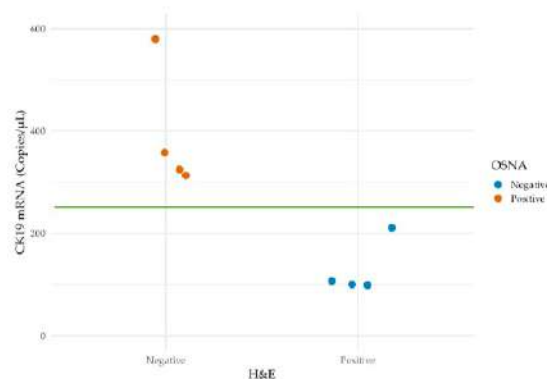


Figure 3. Scatter plot representing CK19 mRNA levels in discordant cases. The green line marks the cut off of 250 copies/μL of CK19 mRNA, above which the case is considered positive or pathological. Note that the three discordant cases located below 160 copies/μL are represented in the minimum established detection value of OSNA. CK19, cytokeratin 19; H&E, hematoxylin and eosin; OSNA, One-Step Nucleic Acid Amplification.

Table 4 provides details of the eight discordant cases. In all of these, the same results were obtained after applying the respective confirmation techniques. In the four cases where OSNA pooling tested positive (but H&E staining tested negative), micrometastases were identified. Conversely, among the four patients where H&E staining was positive (but negative according to OSNA pooling), two were micrometastases and the other two, macrometastases. Notably, one of the micrometastases identified exclusively by H&E staining showed a CK19 mRNA total tumor load (TTL) of 210 copies/ μ L in the OSNA pooling analysis. Table 5 shows additional information regarding the discordant cases.

Table 4. Detailed analysis of cases with discordant results with H&E staining and OSNA pooling techniques.

Patient ID	H&E Results (Number of Positive LNs)	OSNA Results (CK19 mRNA Copies/ μ L)	Type of Metastasis * from Positive Results	Supplementary Tests and Results
2	Negative (NA)	Positive (360)	Micrometastasis	CK19 IHC: negative
13	Negative (NA)	Positive (580)	Micrometastasis	CK19 IHC: negative
99	Negative (NA)	Positive (330)	Micrometastasis	CK19 IHC: negative
100	Negative (NA)	Positive (310)	Micrometastasis	CK19 IHC: negative
7	Positive (2)	Negative (210)	Micrometastasis	OSNA repetition: negative (210 copies/ μ L)
74	Positive (2)	Negative (<160)	Macrometastasis	OSNA repetition: negative (<160 copies/ μ L)
101	Positive (2)	Negative (<160)	Macrometastasis	OSNA repetition: negative (<160 copies/ μ L)
121	Positive (1)	Negative (<160)	Micrometastasis	OSNA repetition: negative (<160 copies/ μ L)

* Micro- and macrometastases were defined according to LN metastatic focus size (0.2–2 mm, micrometastasis; >2 mm, macrometastasis [20]) (H&E staining) or CK19 mRNA levels (250–4999 copies/ μ L, micrometastasis; $\geq$ 5000 copies/ μ L, macrometastasis as proposed by Tsujimoto et al. for breast cancer [15]) (OSNA pooling). CK19, cytokeratin 19; H&E, hematoxylin and eosin; IHC, immunohistochemistry; NA, not applicable; OSNA, One-Step Nucleic Acid Amplification.

Table 5. Characteristics of the primary tumors of discordant cases.

Patient ID	Pathological T Stage	Tumor Volume	ISUP Grade	% of Gleason Patterns $\geq$ 3
2	2	Low	3	60% (pattern 4)
13	3a	Low	2	40% (pattern 4)
99	3a	Low	3	60% (pattern 4)
100	3a	High	3	70% (pattern 4) + 3% (pattern 5)
7	3b	High	3	90% (pattern 4)
74	3a	High	5	50% (pattern 4) + 40% (pattern 5)
101	3a	Low	2	10% (pattern 4)
121	3a	High	3	70% (pattern 4)

H&E, hematoxylin and eosin; ISUP, International Society of Urological Pathology; OSNA, One-Step Nucleic Acid Amplification.

3. Discussion

In this study of patients with PCa and indication of PLND, LN invasion was found to be present in 15 (11.5%) patients according to H&E staining, and in 15 (11.5%) patients according to OSNA pooling, although eight (6.1%) discordant cases were observed. No statistically significant differences were observed in the results between OSNA pooling and conventional H&E staining for LN metastasis detection. In addition, the concordance

between both methods was very high (93.9%), as well as the specificity (96.6%) and NPV (96.6%) of OSNA pooling.

To our knowledge, only two studies have compared H&E staining and OSNA for the detection of pelvic LN metastases in PCa patients [19,21]. Among them, the study by Engels et al. also evaluated the performance of OSNA on a per-LN basis, reporting concordance, sensitivity, and specificity values of 94.4%, 84.2%, and 96.6%, respectively [19]. These results are consistent with our patient-based findings, which showed concordance, sensitivity, and specificity of 93.9%, 73.3%, and 96.6%, respectively.

However, the study of Engels et al. [19] and ours show some differences. Engels et al. included 64 PCa patients who underwent extended and magnetometer-guided sentinel PLND, examining only sentinel LNs ($n = 534$), whereas, in our study, all dissected LNs ($n = 2503$) obtained from PLND of 131 PCa patients were analyzed. While an OSNA pooling approach was conducted in our study, Engels et al. performed an OSNA analysis for each individual sentinel LN. CK19 expression in primary tumors was stated as an inclusion criterion in our study. In contrast, Engels et al. assessed CK19 expression in primary tumors in the discordant cases, identifying a low or no expression of CK19 in five of six OSNA-negative macrometastases cases, and suggesting the importance of CK19 determination at diagnosis. These differences may explain the variation in sensitivity among the two studies. Moreover, based on recent literature, a lower rate of positive LNs after PLND than expected was found, which may result from a higher proportion of intermediate versus high-risk population in our study. A higher number of patients with LN metastases may have improved our OSNA pooling sensitivity value.

Regarding sentinel LNs in PCa, the recent prospective SENTINELLE study showed good performance of intraoperative gamma probe-guided sentinel LN biopsy compared to extended PLND as reference standard for LN staging in patients with intermediate or high risk localized PCa patients [22]. However, there is still a lack of consensus on the definition and identification of sentinel LN in PCa, and current guidelines strongly recommend an extended PLND when LN staging is mandatory [10]. Thus, as conducted in other types of tumors when lacking a clear sentinel LN definition [16,17], LNs were analyzed by OSNA pooling, which, to our knowledge, has not been reported yet in PCa patients. Nevertheless, if sentinel LNs become well defined for PCa in the future, we believe that OSNA may be used intraoperatively to identify sentinel LN invasion, as in patients with breast cancer [23]. This approach may help avoid extended PLND and its associated morbidity, and the lower number of LNs removed would decrease surgical time and pathologists' burden.

As opposed to the OSNA procedure conducted by Engels et al. [19] and H&E staining, the OSNA pooling method applied in this study prevented us from determining the number of affected LNs per patient, which should be considered to decide subsequent treatments, such as adjuvant therapy. Further, it allowed us to assess the TTL of patients while entailing lower costs than performing OSNA for each individual LN. Moreover, OSNA represents a standardized, fast, reproducible and objective method that can analyze the whole LNs. In addition, using molecular techniques instead of histopathological assessments seems to enhance the detection of LN micrometastases in PCa patients [24].

In our study, eight discordant cases were identified, six of which were micrometastases. These discrepancies may be attributed to TAB, where metastases were present in LN samples assessed by H&E staining but absent in those analyzed using OSNA assay, or vice versa. Furthermore, the use of different LN sections for different procedures has been described as the main reason for discrepancies between molecular and histological analyses [19,25]. The remaining two cases, which involved macrometastasis detected solely by H&E staining, may also be explained by TAB. However, an alternative explanation for these two discordances could be the heterogeneous expression of cytokeratin 19 (CK19), as previously reported, which varies according to the degree of cancer dedifferentiation [26]. In this regard, we tried to avoid cases with a weak CK19 mRNA expression by using positive CK19 immunohistochemistry in the biopsy of the primary tumor as one of the inclusion criteria of our study. Nevertheless, when revising the results of the pathology department,

we found that almost all metastases only detected by H&E staining corresponded to cases with prognostically poor criteria according to Engels et al. (i.e., pathological stage T3, high tumor volume, ISUP grade ≥ 3 , poor Gleason grading) [19]. Therefore, it is possible that cases with advanced and dedifferentiated tumors are not detectable by OSNA due to a lack of CK19 mRNA expression [26], although Winter et al. demonstrated CK19 mRNA expression in 100% of the PCa specimens analyzed by OSNA, regardless of the degree of tissue dedifferentiation. More studies are needed to address the variability in CK19 mRNA expression in PCa, as well as to consider the possibility of analyzing other PCa-specific biomarkers, such as PSMA [27], either alone or in combination with CK19. Additionally, one micrometastasis detected exclusively by H&E staining produced a CK19 mRNA TTL of 210 copies/ μ L by OSNA pooling, which is close to the positivity threshold of ≥ 250 copies/ μ L for OSNA. This finding raises the question of whether this borderline value holds clinical significance in PCa, although further studies are required to set a specific cut-off point for PCa.

This study presents some limitations. As mentioned, the OSNA pooling approach prevented us from assessing LN morphological aspects and the number of affected LNs per patient, which may be considered for assessing the need for adjuvant therapy according to current PCa guidelines [10]. Nonetheless, it did allow us to determine the TTL per patient, which may have prognostic and therapeutic significance in the future, as described in studies with breast cancer patients [28–30]. Methodologically, the need to split the LN entailed risk of TAB, which might have affected the comparison between both techniques. However, the large number of LNs in the study may have helped to overcome this drawback. Despite these limitations, to our knowledge, this is the first study comparing H&E staining and OSNA pooling method for identifying LN metastases in PCa patients.

Next steps to consolidate the clinical application of OSNA in PCa might come from further well-designed prospective and randomized studies, so that LN is not divided, and TAB can be avoided. Specific cut-off points or even the prognostic impact of TTL value for the management of these patients might be explored. Additionally, the cost-effectiveness of the OSNA pooling method should be addressed in future studies to confirm if introducing this approach can both economically and clinically benefit healthcare providers and patients, respectively, as previously reported for patients with colorectal carcinoma [31].

4. Materials and Methods

4.1. Study Design and Patients

POPCORN was an observational, prospective, and multicenter study of patients with PCa and indication of PLND. This study was performed in eight tertiary centers from Spain between September 2019 and June 2023.

Patients were included in this study if they had been diagnosed with primary, histologically confirmed PCa, showed positive CK19 immunohistochemistry (i.e., $\geq 50\%$ of membrane or cytoplasmic staining) in a biopsy specimen core, and had an indication of radical prostatectomy with extended PLND. Only patients with a minimum of 12 LNs removed were included, as previously established for standard (10–12 LNs) and extended (>12 LNs) PLND [32,33].

Alternatively, they could have undergone salvage PLND due to biochemical recurrence and present LN uptake by choline PET scan. Patients with metastatic PCa or other CK19-positive tumors with the same lymphatic drainage and patients receiving or having received neoadjuvant therapies were excluded from this study.

All patients had their LNs analyzed by OSNA pooling and H&E staining. However, all therapeutic decisions were based only on the results obtained by the conventional method (i.e., H&E staining), as normally performed in all the participant centers.

All data were processed according to General Data Protection Regulation 2016/679 on data protection and privacy for all individuals within the European Union and the local data protection regulatory framework [34]. This study was approved by ethics committee

at the coordinating center, Ethics Committee of Hospital Vall d'Hebron (PR(AG)316/2019), and all the local ethics committees.

4.2. Study Variables

Age, serum prostate-specific antigen (PSA), clinical T stage by rectal digital examination and clinical N stage by computed tomography scan [20], prostate biopsy grade group according to the ISUP grading system [35], and the criteria used to determine the indication for lymphadenectomy were collected at the time of diagnosis. In addition, the number of LNs surgically removed, the pathological T and N stages [20], and the surgical specimen grade group [35] were recorded postoperatively. Other variables registered included the tumor volume and Gleason patterns.

4.3. Collection and Processing of Lymph Nodes

Samples were collected from 130 patients who underwent radical prostatectomy with an extended PLND, which included all LNs overlying the external iliac artery and vein, those within the obturator fossa located cranially and caudally to the obturator nerve, and those medial and lateral to the internal iliac artery, as described in the PCa European Guidelines [10]. One patient with indication of salvage PLND was submitted to a more extended surgery, including common iliac artery and presacral LNs.

Once removed, LNs were immediately sent to the pathology department, where they were dissected from the adipose tissue on an ice-cooled surface. Then, to reproduce the conventional diagnosis by H&E staining, in which a central slice of 3–4 mm of the LN is usually analyzed, each LN was cut along its long axis. All LNs were analyzed by H&E staining and OSNA pooling. For this purpose, LNs ≤ 5 mm were cut into two halves, and each half was analyzed using the above methods. One half was put into a cassette for standard H&E, and the other half was introduced into a microcentrifuge tube for delayed OSNA analysis. For LNs > 5 mm, a central slice of approximately 2 mm was cut. The central slice was examined using standard H&E staining, and both lateral slices were submitted for OSNA analysis (Figure 4).

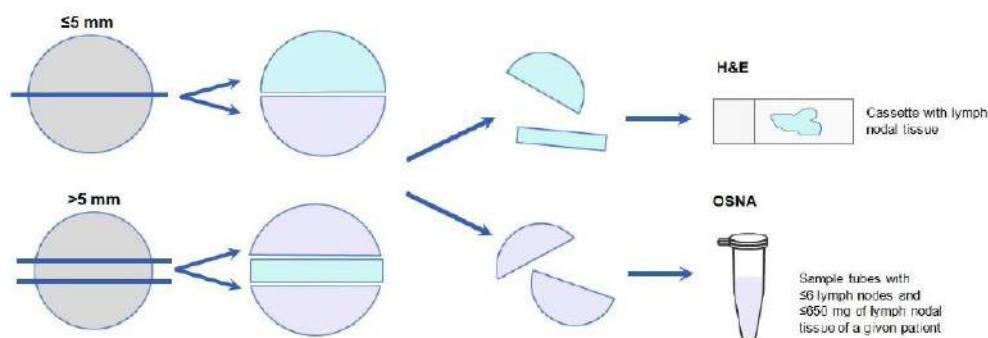


Figure 4. Processing of lymph nodes for hematoxylin and eosin (H&E) staining and One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) pooling analyses.

When discordant results were obtained, additional assessments were conducted. In case an LN did not show metastasis as per H&E staining, but it did as per OSNA, the remaining LN tissue embedded in paraffin was divided into three levels, and two samples were collected in each level; one sample was used for another assessment with H&E staining, whereas the other one was used for an evaluation by CK19 immunohistochemistry. In case a LN showed metastasis as per H&E staining but not as per OSNA, the OSNA procedure was repeated for the sample tube where discordant results were found.

4.4. H&E Staining

The formalin-fixed LN tissue was embedded in paraffin and cut into 5 μm -thick sections. After deparaffinization and rehydration, these sections were automatically stained with H&E. According to UICC TNM 8th edition [20], micrometastasis was defined as LN metastatic focus between 0.2 and 2 mm, whereas a metastatic focus of more than 2 mm was considered a macrometastasis.

4.5. OSNA Pooling Analysis

The analysis of LNs by OSNA was performed with pooled samples of a given patient. For this purpose, LNs were put together into microcentrifuge tubes, each containing a maximum of six LNs, which added up to 650 mg. Each tube had a paraffin block embedding multiple LNs. LNs weighing >650 mg were cut into fragments ≤ 650 mg and placed in different microcentrifuge tubes. The tubes were then stored at -80°C for ulterior OSNA analysis, which was conducted using the RD-210 platform (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) following the manufacturer's instructions.

After OSNA analysis and according to the threshold reported by Tsujimoto et al. [15] for detecting LN metastases in breast cancer, sample tubes and patients were defined as negative or positive when CK19 mRNA levels were <250 copies/ μL or ≥ 250 copies/ μL , respectively. Additionally, the TTL for a given patient was defined as the sum of all CK19 mRNA copies corresponding to all sample tubes with CK19 mRNA overexpression (i.e., ≥ 250 copies/ μL). Micro- and macrometastases were defined as proposed by Tsujimoto et al. for breast cancer (i.e., micrometastases when CK19 mRNA levels ranged between 250 and 4999 copies/ μL ; and macrometastases when CK19 mRNA levels were ≥ 5000 copies/ μL) [15].

4.6. Statistical Analysis

The statistical analysis was performed using R Studio version 4.3.2. Main clinical and pathological data of interest were reported. Quantitative variables were described as the median and interquartile range (IQR, 25th and 75th percentiles), whereas qualitative variables were presented as frequencies and percentages. To assess the discrimination ability of OSNA to identify LN metastases already detected with H&E staining, receiver operating characteristic (ROC) curves were plotted, and the corresponding area under the curve (AUC) was determined. To compare the performance of OSNA and conventional H&E staining in detecting LN metastases, crosstabs and McNemar's test were used, and concordance and the measure of agreement (Cohen's Kappa coefficient (κ)) between the two methods was determined. Sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values (PPV and NPV) of OSNA were also calculated. The threshold for statistical significance was set at a two-sided alpha value of 0.05.

5. Conclusions

The OSNA pooling method was comparable to H&E staining for the detection of LN invasion after PLND in PCa patients.

This article is a revised and expanded version of a paper entitled "POPCORN Study: Application of the "One-Step Nucleic Acid Amplification" (OSNA) Method for the Detection of Nodal Metastasis in Patients with Prostate Cancer", which was presented at the Congress of the European Association of Urology (EAU24), Paris (France), 7 April 2024 [36].

Author Contributions: Conceptualization, M.C., M.E.S. and J.M.; study design, M.C., M.E.S. and J.M.; data collection, M.C., M.E.S., J.P., I.M.d.T., L.R., A.C., E.T., S.R.y.C., R.A.M., B.C., D.M., M.A.J., M.R., A.C.-F., A.L., M.B.A., E.G., P.G.-P., D.V.-M., Á.C.-L., V.C., F.J.Q., J.L.G., C.C., R.J.L., J.M.-J., I.C.-F., C.L. and J.M.; data analysis, M.C. and J.M.; data interpretation, M.C. and J.M.; manuscript drafting, M.C. and J.M.; revision of drafts, M.C., M.E.S., J.P., I.M.d.T., L.R., A.C., E.T., S.R.y.C., R.A.M., B.C., D.M., M.A.J., M.R., A.C.-F., A.L., M.B.A., E.G., P.G.-P., D.V.-M., Á.C.-L., V.C., F.J.Q., J.L.G., C.C., R.J.L., J.M.-J., I.C.-F., C.L. and J.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The authors did not receive external funding for the study. SYSMEX funded the statistical analysis, medical writing, and the Open Access fee.

Institutional Review Board Statement: This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Hospital Vall d'Hebron (PR(AG)316/2019) on 20 September 2019.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in this study.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgments: The authors would like to thank Sysmex for the statistical analysis and interpretation of the results of this study, and i2e3 Procomms on behalf of Sysmex for providing medical writing support during the manuscript preparation.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Abdollah, F.; Suardi, N.; Gallina, A.; Bianchi, M.; Tutolo, M.; Passoni, N.; Fossati, N.; Sun, M.; dell'Oglio, P.; Salonia, A.; et al. Extended Pelvic Lymph Node Dissection in Prostate Cancer: A 20-Year Audit in a Single Center. *Ann. Oncol.* **2013**, *24*, 1459–1466. [\[CrossRef\]](#)
2. Winter, A.; Kneib, T.; Wasylow, C.; Reinhardt, L.; Henke, R.P.; Engels, S.; Gerullis, H.; Wawroschek, F. Updated Nomogram Incorporating Percentage of Positive Cores to Predict Probability of Lymph Node Invasion in Prostate Cancer Patients Undergoing Sentinel Lymph Node Dissection. *J. Cancer* **2017**, *8*, 2692–2698. [\[CrossRef\]](#)
3. Eggener, S.E.; Scardino, P.T.; Walsh, P.C.; Han, M.; Partin, A.W.; Trock, B.J.; Feng, Z.; Wood, D.P.; Eastham, J.A.; Yossepowitch, O.; et al. Predicting 15-Year Prostate Cancer Specific Mortality after Radical Prostatectomy. *J. Urol.* **2011**, *185*, 869–875. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Joniau, S.; Briganti, A.; Gontero, P.; Gandaglia, G.; Tosco, L.; Fieuws, S.; Tombal, B.; Marchioro, G.; Walz, J.; Kneitz, B.; et al. Stratification of High-Risk Prostate Cancer into Prognostic Categories: A European Multi-Institutional Study. *Eur. Urol.* **2015**, *67*, 157–164. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Cheng, L.; Zincke, H.; Blute, M.L.; Bergstralh, E.J.; Scherer, B.; Bostwick, D.G. Risk of Prostate Carcinoma Death in Patients with Lymph Node Metastasis. *Cancer* **2001**, *91*, 66–73. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Hövels, A.M.; Heesakkers, R.A.M.; Adang, E.M.; Jager, G.J.; Strum, S.; Hoogeveen, Y.L.; Severens, J.L.; Barentsz, J.O. The Diagnostic Accuracy of CT and MRI in the Staging of Pelvic Lymph Nodes in Patients with Prostate Cancer: A Meta-Analysis. *Clin. Radiol.* **2008**, *63*, 387–395. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Hofman, M.S.; Lawrentschuk, N.; Francis, R.J.; Tang, C.; Vela, I.; Thomas, P.; Rutherford, N.; Martin, J.M.; Frydenberg, M.; Shakher, R.; et al. 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* **2020**, *395*, 1208–1216. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. van Leeuwen, P.J.; Emmett, L.; Ho, B.; Delprado, W.; Ting, F.; Nguyen, Q.; Stricker, P.D. Prospective Evaluation of 68Ga Gallium-Prostate-Specific Membrane Antigen Positron Emission Tomography/Computed Tomography for Preoperative Lymph Node Staging in Prostate Cancer. *BJU Int.* **2017**, *119*, 209–215. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Pepe, P.; Pepe, L.; Fiorentino, V.; Curduman, M.; Pennisi, M.; Fraggetta, F. PSMA PET/CT Accuracy in Diagnosing Prostate Cancer Nodes Metastases. *In Vivo* **2024**, *38*, 2880–2885. [\[CrossRef\]](#)
10. Cornford, P.; van den Bergh, R.C.N.; Briers, E.; Van den Broeck, T.; Brunckhorst, O.; Darraugh, J.; Eberli, D.; De Meerleer, G.; De Santis, M.; Farolfi, A.; et al. EAU-EANM-ESTRO-ESUR-ISUP-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. *Eur. Urol.* **2024**, *86*, 148–163. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
11. Małkiewicz, B.; Kiełb, P.; Karwacki, J.; Czerwińska, R.; Długosz, P.; Lemiński, A.; Nowak, Ł.; Krajewski, W.; Szydełko, T. Utility of Lymphadenectomy in Prostate Cancer: Where Do We Stand? *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 2343. [\[CrossRef\]](#)
12. Lawrence, W.; Association Pathology. ADASP Recommendations for Processing and Reporting of Lymph Node Specimens Submitted for Evaluation of Metastatic Disease. *Virchows Arch.* **2001**, *439*, 601–603. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Li, K.; Meng, M.; Zhang, W.; Li, J.; Wang, Y.; Zhou, C. Diagnostic Value of One-Step Nucleic Acid Amplification for Sentinel Lymph Node Metastasis in Cytokeratin 19-Positive Tumors: Evidence from Bioinformatics and Meta-Analysis. *Front. Oncol.* **2024**, *14*, 1370709. [\[CrossRef\]](#)
14. Cuadras, M.; Planas, J.; Celma, A.; Regis, L.; de Torres, I.M.; Semidey, M.E.; Trilla, E.; Morote, J. Application of One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) in Different Cancer Entities and Usefulness in Prostate Cancer: A Systematic Review. *BMC Cancer* **2022**, *22*, 357. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Tsujimoto, M.; Nakabayashi, K.; Yoshidome, K.; Kaneko, T.; Iwase, T.; Akiyama, E.; Kato, Y.; Tsuda, H.; Ueda, S.; Sato, K.; et al. One-Step Nucleic Acid Amplification for Intraoperative Detection of Lymph Node Metastasis in Breast Cancer Patients. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 4807–4816. [\[CrossRef\]](#)

16. Rakislova, N.; Montironi, C.; Aldecoa, I.; Fernandez, E.; Bombi, J.A.; Jimeno, M.; Balaguer, F.; Pellise, M.; Castells, A.; Cuatrecasas, M. Lymph Node Pooling: A Feasible and Efficient Method of Lymph Node Molecular Staging in Colorectal Carcinoma. *J. Transl. Med.* **2017**, *15*, 14. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Vodicka, J.; Mukensnabl, P.; Vejvodova, S.; Spidlen, V.; Kulda, V.; Topolcan, O.; Pesta, M. A More Sensitive Detection of Micrometastases of NSCLC in Lymph Nodes Using the One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) Method. *J. Surg. Oncol.* **2018**, *117*, 163–170. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Winter, A.; Engels, S.; Goos, P.; Sütykers, M.C.; Henke, R.P.; Gerullis, H.; Wawroschek, F. Detection of CK19 mRNA Using One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) in Prostate Cancer: Preliminary Results. *J. Cancer* **2018**, *9*, 4611–4617. [\[CrossRef\]](#)
19. Engels, S.; Brautmeier, L.; Reinhardt, L.; Wasylow, C.; Hasselmann, F.; Henke, R.P.; Wawroschek, F.; Winter, A. Evaluation of Fast Molecular Detection of Lymph Node Metastases in Prostate Cancer Patients Using One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA). *Cancers* **2021**, *13*, 1117. [\[CrossRef\]](#)
20. Brierley, J.D.; Gospodarowicz, M.K.; Wittekind, C. *TNM Classification of Malignant Tumours*, 8th ed.; Wiley-Blackwell: Hoboken, NJ, USA, 2017; ISBN 978-1-119-26357-9.
21. Argun, O.B.; Mourmouris, P.; Saglican, Y.; Doganca, T.; Tuna, M.B.; Kayhan, C.K.; Yalcinkaya, O.; Tufek, L.; Kara, H.; Obek, C.; et al. One Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) for Detection of Lymph Node Metastasis during Robotic Radical Prostatectomy for Prostate Cancer: A Pilot Study. *Arch. Ital. Urol. Androl.* **2022**, *94*, 265–269. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Lannes, F.; Baboudjian, M.; Ruffion, A.; Rouy, M.; Giammarile, F.; Rousseau, T.; Kraeber-Bodéré, F.; Rousseau, C.; Rusu, D.; Colombié, M.; et al. Radioisotope-Guided Lymphadenectomy for Pelvic Lymph Node Staging in Patients With Intermediate- and High-Risk Prostate Cancer (The Prospective SENTINELLE Study). *J. Urol.* **2023**, *209*, 364–373. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Shi, F.; Liang, Z.; Zhang, Q.; Wang, C.; Liu, X. The Performance of One-Step Nucleic Acid Amplification Assay for Intraoperative Detection of Sentinel Lymph Node Macrometastasis in Breast Cancer: An Updated Meta-Analysis. *Breast* **2018**, *39*, 39–45. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Heck, M.M.; Retz, M.; Bandur, M.; Souchay, M.; Vitzthum, E.; Weirich, G.; Mollenhauer, M.; Schuster, T.; Autenrieth, M.; Kübler, H.; et al. Topography of Lymph Node Metastases in Prostate Cancer Patients Undergoing Radical Prostatectomy and Extended Lymphadenectomy: Results of a Combined Molecular and Histopathologic Mapping Study. *Eur. Urol.* **2014**, *66*, 222–229. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Daniele, L.; Annaratone, L.; Allia, E.; Mariani, S.; Armando, E.; Bosco, M.; Macrì, L.; Cassoni, P.; D'Armento, G.; Bussolati, G.; et al. Technical Limits of Comparison of Step-Sectioning, Immunohistochemistry and RT-PCR on Breast Cancer Sentinel Nodes: A Study on Methacarn-Fixed Tissue. *J. Cell Mol. Med.* **2009**, *13*, 4042–4050. [\[CrossRef\]](#)
26. Menz, A.; Bauer, R.; Kluth, M.; von Barga, C.M.; Gorbokov, N.; Viehweger, F.; Lennartz, M.; Völkl, C.; Fraune, C.; Uhlig, R.; et al. Diagnostic and Prognostic Impact of Cytokeratin 19 Expression Analysis in Human Tumors: A Tissue Microarray Study of 13,172 Tumors. *Hum. Pathol.* **2021**, *115*, 19–36. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Sweat, S.D.; Pacelli, A.; Murphy, G.P.; Bostwick, D.G. Prostate-Specific Membrane Antigen Expression Is Greatest in Prostate Adenocarcinoma and Lymph Node Metastases. *Urology* **1998**, *52*, 637–640. [\[CrossRef\]](#)
28. Martín-Salvago, M.D.; Sancho, M.; López-García, M.A.; Cano Jiménez, A.; Pérez-Luque, A.; Alfaro, L.; Vieites, B. Value of Total Tumor Load as a Clinical and Pathological Factor in the Prognosis of Breast Cancer Patients Receiving Neoadjuvant Treatment. Comparison of Three Populations with Three Different Surgical Approaches: NEOVATTL Pro 3 Study. *Breast Cancer Res. Treat.* **2023**, *200*, 203–215. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Vieites, B.; López-García, M.; Martín-Salvago, M.D.; Ramirez-Tortosa, C.L.; Rezola, R.; Sancho, M.; López-Vilaró, L.; Villardell, E.; Burgués, O.; Fernández-Rodríguez, B.; et al. Predictive and Prognostic Value of Total Tumor Load in Sentinel Lymph Nodes in Breast Cancer Patients after Neoadjuvant Treatment Using One-Step Nucleic Acid Amplification: The NEOVATTL Study. *Clin. Transl. Oncol.* **2021**, *23*, 1377–1385. [\[CrossRef\]](#)
30. Piñero-Madrona, A.; Ripoll-Orts, F.; Sánchez-Méndez, J.I.; Chaves-Benito, A.; Gómez-de la Bárcena, M.R.; Calatrava-Fons, A.; Menjón-Beltrán, S.; Peg-Cámara, V. External Validation of a Prognostic Model Based on Total Tumor Load of Sentinel Lymph Node for Early Breast Cancer Patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **2020**, *181*, 339–345. [\[CrossRef\]](#)
31. Díaz-Mercedes, S.; Archilla, I.; Camps, J.; de Lacy, A.; Gorostiaga, I.; Momblan, D.; Ibarzabal, A.; Maurel, J.; Chic, N.; Bombí, J.A.; et al. Budget Impact Analysis of Molecular Lymph Node Staging Versus Conventional Histopathology Staging in Colorectal Carcinoma. *Appl. Health Econ. Health Policy* **2019**, *17*, 655–667. [\[CrossRef\]](#)
32. Rincón Mayans, A.; Zudaire Bergera, J.J.; Rioja Zuazu, J.; Zudaire Díaz-Tejeiro, B.; Barba Abad, J.; Brugarolas Rosselló, X.; Rosell Costa, D.; Berán Polo, J.M. Pelvic Lymph Node Dissection (Extended vs. Standard) and Prostate Cancer. *Actas Urol. Esp.* **2008**, *32*, 879–887. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Heidenreich, A.; Ohlmann, C.H.; Polyakov, S. Anatomical Extent of Pelvic Lymphadenectomy in Patients Undergoing Radical Prostatectomy. *Eur. Urol.* **2007**, *52*, 29–37. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Regulation (EU) 2016/679 of the European Parliament and of the Council of 27 April 2016 on the Protection of Natural Persons with Regard to the Processing of Personal Data and on the Free Movement of Such Data, and Repealing Directive 95/46/EC (General Data Protection Regulation). Available online: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2016/679/oj> (accessed on 23 October 2024).

35. Epstein, J.I.; Egevad, L.; Amin, M.B.; Delahunt, B.; Srigley, J.R.; Humphrey, P.A. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* **2016**, *40*, 244–252. [[CrossRef](#)]
36. Cuadras Sole, M.; Semidey, M.E.; de Torres, I.S.M.; Planas, J.; Medina, R.; Marcilla, D.; Martínez-Pineiro, L.; González-Peramato, P.; Leivar, A.; Carrato, C.; et al. POPCORN Study: Application of the “One-Step Nucleic Acid Amplification” (OSNA) Method for the Detection of Nodal Metastasis in Patients with Prostate Cancer. In Proceedings of the 39th Congress of the European Association of Urology (EAU24), Paris, France, 5–8 April 2024.

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

5. RESUM GLOBAL DELS RESULTATS

El nostre projecte s'ha centrat en avaluar el rendiment diagnòstic d'OSNA com a mètode alternatiu per a la detecció de metàstasis ganglionars en pacients amb CP sotmesos a LP. L'examen histopatològic convencional mitjançant tinció HE, tot i considerar-se l'estàndard de referència actual, presenta certes limitacions, com ara la subjectivitat de l'observador, el consum elevat de temps i una sensibilitat limitada per detectar dipòsits tumorals petits o focals. Aquesta limitació, coneguda com a biaix per mostreig, és inherent al mètode i pot comportar un risc de falsos negatius en l'estat ganglionar. En aquest context, OSNA es presenta com una alternativa prometedora, basada en l'anàlisi quantitativa de còpies d'ARNm de CK19, que permet estudiar la totalitat del teixit ganglionar de forma ràpida, objectiva, automatitzada i reproduïble, millorant així la precisió diagnòstica i determinant l'estat ganglionar dels pacients amb CP.

En la revisió sistemàtica de la literatura publicada a *BMC Cancer* (113), se seleccionaren 25 estudis prospectius, publicats entre el gener de 2007 i el març de 2021, seguint els principis de la declaració PRISMA (114). L'objectiu principal fou presentar la darrera evidència sobre la detecció de metàstasis ganglionars en diferents entitats tumorals mitjançant el mètode OSNA, en comparació amb l'estàndard de referència postoperatori (HE). Per primera vegada, s'hi inclogué un estudi sobre CP (105). L'anàlisi de qualitat mitjançant l'eina QUADAS-2 (90) revelà un baix risc de biaix i una qualitat global moderada a alta dels estudis inclosos (Taula 2). S'hi analitzaren ganglis sentinella i no sentinella de sis grups neoplàsics diferents: 1) càncer de mama (93,115–121); 2) tumors gastrointestinals: colorectal (122–125) i gàstric (108,126,127); 3) tumors ginecològics: de cèrvix (128) i d'endometri (129–131); 4) càncer de pulmó (132–134); 5) tumors de cap i coll: carcinoma de cèl·lules escamoses de cap i coll (135) i de tiroides (136); i 6) CP (105). En tots els casos, els ganglis limfàtics foren seccionats en dues o més seccions (en funció de la mida) i analitzats aleatòriament amb ambdues tècniques diagnòstiques: OSNA i HE postoperatoria.

Els resultats es resumiren en dues taules. La Taula 3 recull les principals característiques dels estudis inclosos: tipus de càncer, any de publicació, nombre de pacients i ganglis limfàtics analitzats —més de 100 ganglis per estudi—, mètode de diagnòstic de referència emprat (generalment HE, complementada en 11 estudis amb immunohistoquímica) i, la realització d'estudis addicionals per a casos discrepants (descrits fins en 17 dels 25 estudis). La Taula 4 sintetitza els resultats per gangli, mostrant que OSNA presenta una elevada sensibilitat i especificitat per detectar metàstasis, incloses les micrometàstasis, en tumors amb expressió confirmada de CK19.

La concordança entre OSNA i HE va superar el 85% en tots els grups, amb valors especialment alts en el càncer de mama, colorectal i pulmó (entre el 91% i el 98%). Tant el VPP com el VPN foren també elevats, confirmant la fiabilitat diagnòstica d'OSNA.

Pel que fa al CP, l'únic estudi disponible en el moment de la realització de la revisió sistemàtica reportà una sensibilitat del 84,2%, una especificitat del 96,1% i una concordança del 94,4% en comparació amb HE (105). Aquests resultats, similars als obtinguts en altres tumors, reforcen el potencial d'OSNA per millorar l'estadiatge limfàtic en pacients amb CP.

La revisió sistemàtica conclou, doncs, que el mètode de diagnòstic molecular OSNA permet detectar metàstasis ganglionars amb alta precisió diagnòstica —incloses les micrometàstasis— en tumors amb expressió de CK19 mostrant una excel·lent correlació amb la histopatologia convencional. En conseqüència, OSNA es postula com una eina prometedora per millorar l'estadificació ganglionar i afavorir la presa de decisions tant intraoperatòries com postoperatòries. Tanmateix, la limitada evidència en CP en el moment de la seva realització justificava la seva inclusió com a hipòtesi del nostre projecte de recerca.

Amb aquest objectiu, es dissenyà i desenvolupà l'estudi prospectiu multicèntric POPCORN (137), publicat recentment en la *International Journal of Molecular Sciences*, amb la finalitat de validar la tècnica OSNA en la modalitat *pooling* per detectar

metàstasis ganglionars en pacients amb CP sotmesos a LP. OSNA fou comparat amb el mètode histopatològic convencional amb HE.

S'analitzaren un total de 2.503 ganglis limfàtics de 131 pacients amb CP, tots ells amb expressió positiva de CK19, confirmada per immunohistoquímica a la biòpsia prostàtica diagnòstica, fet que minimitzava la probabilitat de falsos negatius amb OSNA. Dels 131 pacients, només un (0,8%) fou sotmès a una LP per recaiguda bioquímica. Les característiques basals dels pacients es detallen a la Taula 1. La mediana d'edat fou de 65 anys, i el valor inicial de PSA fou de 8,5 ng/ml. El 80% dels pacients presentaren un estadi clínic inicial cT1c o cT2a i només un 7% presentà malaltia localment avançada (T3). Els GG de la ISUP predominants en la biòpsia prostàtica foren el 2 i el 3, representant el 75,5% dels casos. L'estat ganglionar determinat per mètodes d'imatge convencional (TC i gammagrafia òssia) fou negatiu (cN0) en 126 pacients (88,6%), i positiu en cinc (11,5%). Un 30% foren classificats com a pacients d'alt risc segons els grups de risc de recidiva bioquímica de l'AEU i el 70% restant com a risc intermedi, i foren sotmesos a LP extensa segons diverses calculadores de risc. Postoperatòriament, gairebé la meitat dels pacients presentaren malaltia localitzada (pT2) i, l'altra meitat, malaltia localment avançada (pT3a en el 41,9% casos i pT3b fins en un 21%). El GG de la ISUP més freqüent a la peça de prostatectomia fou el 3 (52%), seguit del GG 2 (37%) i del GG 4 (9,3%), amb un increment del 5,4% del GG 5 respecte a la biòpsia. S'analitzà una mediana de 18 ganglis limfàtics per pacient. Dels cinc pacients amb ganglis clínicament positius (cN1), es passà a 15 amb afectació patològica (pN1) confirmada per HE, amb 11 pacients (8,5%) amb una o dues metàstasis ganglionars, i quatre (3%), amb més de dues.

La taula de contingència representada en la Taula 2 mostra que 112 pacients obtingueren resultats negatius per a detecció de metàstasis ganglionars amb ambdues tècniques diagnòstiques, mentre que 11 foren positius. Tanmateix, cal destacar resultats discrepants en vuit pacients (6,1%): en quatre, OSNA fou positiu i HE negatiu, i en quatre, la situació fou inversa. Tot i l'absència de diferències estadísticament

significatives ($p = 1,00$), els paràmetres de rendiment diagnòstic d'OSNA *pooling* foren clínicament rellevants. La concordança global entre OSNA i HE fou del 93,9% (IC 95%: 88,4 - 96,9), amb un coeficient Kappa de 0,70, indicatiu d'un grau d'acord substancial entre tècniques. OSNA mostrà una sensibilitat del 73,3% i una especificitat del 96,6%, mentre que el VPP i VPN foren del 73,3% i 96,6%, respectivament. Aquests valors indiquen una excel·lent capacitat d'OSNA per descartar metàstasi en cas de resultat negatiu i una alta fiabilitat per confirmar-la quan el resultat és positiu.

Per facilitar la comprensió dels resultats, l'estudi inclou representacions gràfiques. La Figura 1 il·lustra les corbes ROC (Receiver Operating Characteristic), que mostren la capacitat discriminatòria d'OSNA per identificar metàstasi ganglionar a nivell de pacient i de tub, amb un bon rendiment general pel llindar de 250 còpies/ μ L d'ARNm de CK19 establert pel fabricant. La Figura 2, mitjançant un diagrama de Venn, permet visualitzar clarament les coincidències i discrepàncies entre tècniques.

Així doncs, tot i la bona concordança global, s'identificaren vuit casos discordants. En quatre pacients, OSNA detectà metàstasi (310 i 580 còpies/ μ L), però ni la tinció amb HE ni la immunohistoquímica per CK19 en la mateixa secció van mostrar presència tumoral. Es considerarà, per tant, que podria tractar-se de micrometàstasis no localitzades per l'estudi histològic, probablement a causa del biaix d'assignació tumoral (TAB) assumit metodològicament en aquest estudi. En els altres quatre casos, HE detectà metàstasis (dues micro i dues macrometàstasis), mentre que OSNA fou negatiu. En tres d'ells, els nivells d'ARNm de CK19 foren inferiors a 160 còpies/ μ L (límit de detecció de la tècnica) i, en un cas, de 210 còpies/ μ L, un valor proper al llindar de positivitat. Aquesta situació es reflecteix a la Figura 3, que presenta un diagrama de dispersió on es contextualitzen aquests valors i es reforça la hipòtesi que micrometàstasis amb baixa expressió de CK19 poden no ser detectades per OSNA.

La revisió de les característiques tumorals d'aquests pacients (Taula 5) revelà que els casos HE positius i OSNA negatius sovint presentaven característiques

adverses, com estadi pT3, alta càrrega tumoral i GG de la ISUP alts, fet que podria relacionar-se amb una expressió reduïda de CK19 en tumors menys diferenciats.

Així doncs, en l'estudi POPCORN, la tècnica OSNA en modalitat *pooling* mostra una capacitat diagnòstica comparable a l'HE per a la detecció de metàstasis ganglionars en pacients amb CP sotmesos a LP.

6. RESUM GLOBAL DE LA DISCUSSIÓ

6.1. DISCUSSIÓ

La presència de metàstasis ganglionars en el CP és un factor pronòstic desfavorable, amb impacte tant en la supervivència lliure de recidiva bioquímica com en la supervivència global (138–140). Així doncs, una determinació acurada de l'estat ganglionar és essencial per guiar el tractament. Tot i els avenços en tècniques d'imatge, com la PET/TC amb PSMA-68Ga, la identificació de ganglis afectats continua essent un repte. Malgrat la seva elevada especificitat (>90%), la sensibilitat per detectar metàstasis de petit volum (<5 mm) és limitada (33,141), fet que implica un risc considerable de falsos negatius. Per aquest motiu, la LP extensa es manté com el mètode més fiable per avaluar la invasió limfàtica en pacients amb CP localitzat o localment avançat, amb un risc intermedi-alt de recidiva bioquímica segons la classificació de les guies de l'AEU (17). No obstant això, tant els criteris d'indicació com la definició de l'extensió òptima de la LP continuen essent objecte de debat continu i el seu benefici terapèutic *per se* es manté controvertit. Tot i que algunes evidències suggereixen un possible impacte en la supervivència lliure de recidiva bioquímica, la LP es considera principalment una eina d'estadiatge i comporta un risc no menyspreable de complicacions (26,142). En aquest escenari, resulta fonamental explorar tècniques alternatives d'estadiatge limfàtic que millorin la sensibilitat diagnòstica i permetin optimitzar la detecció precisa de micrometàstasis, tot reduint la morbiditat associada a la limfadenectomia.

Un cop realitzada la LP els ganglis extirpats s'analitzen mitjançant tècniques histològiques convencionals. El protocol estàndard consisteix en el tall macroscòpic dels ganglis en intervals de 3 - 4 mm, seguits d'un processament histològic amb tinció d'HE i revisió microscòpica d'almenys una làmina de cadascun (80). Tot i ser el mètode de referència actual, aquest procediment presenta limitacions importants. En primer lloc, l'anàlisi d'una petita part del teixit pot comportar errors de classificació, especialment en el cas de micrometàstasis, que poden quedar fora del tall analitzat. Aquest fenomen, conegut com a biaix per mostreig, compromet la sensibilitat diagnòstica de la tècnica. A

més, el processament histològic és laboriós i consumeix temps, recursos materials i humans, representant una càrrega assistencial notable per als serveis d'Anatomia Patològica. Cal afegir que la interpretació dels resultats depèn en gran mesura del criteri del patòleg, amb una variabilitat interobservador no menyspreable, especialment en contextos de metàstasis de petit volum o amb morfologia atípica.

Davant d'aquestes limitacions, el mètode molecular OSNA ha estat proposat com a alternativa per a l'anàlisi de l'estat ganglionar. Aquesta tècnica, introduïda per primera vegada l'any 2007 en el context del càncer de mama, es basa en la detecció quantitativa de l'ARNm de la CK19 mitjançant amplificació isotèrmica en temps real (RT-LAMP) (93). A diferència de la histologia convencional, el teixit ganglionar és processat íntegrament mitjançant homogeneïtzació, fet que permet una avaluació global. Posteriorment, s'analitza l'expressió d'ARNm de CK19, una proteïna epitelial expressada en diversos tumors i utilitzada com a marcador de metàstasi ganglionar, atès que es troba habitualment absent en el teixit limfàtic sa (91,143). El resultat s'expressa com el nombre de còpies d'ARNm de CK19 per μL , fet que permet establir llindars diagnòstics diferenciats entre teixit negatiu (<250 còpies/ μL), micrometàstasi (entre 250 i 5.000 còpies/ μL) i macrometàstasi (>5.000 còpies/ μL) (93).

Un dels avantatges més destacats de la tècnica OSNA és la possibilitat d'analitzar la totalitat del teixit ganglionar, fet que elimina el biaix de mostreig i incrementa la capacitat de detecció de micrometàstasis. A més, el seu funcionament automatitzat redueix la variabilitat interobservador i accelera el temps de resposta diagnòstica, fet que resulta especialment útil en entorns d'elevada càrrega assistencial o en escenaris intraoperatoris. La ràpida aplicació, l'objectivitat i la reproductibilitat del mètode fan que sigui una eina diagnòstica altament atractiva en múltiples contextos clínics.

Des de la seva validació inicial en el càncer de mama, on la CK19 s'expressa en més del 98% dels casos (90), la tècnica OSNA ha estat aplicada amb èxit en altres neoplàsies epitelials com el càncer colorectal, gàstric, ginecològic (cèrvix i endometri),

pulmonar, tiroïdal i de cap i coll. En aquests tumors, la tècnica ha demostrat una elevada precisió diagnòstica en la diferenciació entre ganglis limfàtics metastàtics i no metastàtics, amb valors de concordança amb la histologia convencional que oscil·len entre el 80% i el 97% (101). En el context del càncer de mama, l'aplicació intraoperatòria en el gangli sentinella ha permès reduir el temps quirúrgic, evitar reintervencions i millorar l'eficiència assistencial. Aquests avantatges, juntament amb la seva fiabilitat diagnòstica, han afavorit la seva incorporació a diverses guies de pràctica clínica internacionals com a tècnica validada per a l'estudi del gangli sentinella (110,111).

Tanmateix, perquè la tècnica sigui aplicable de manera fiable, és imprescindible que el tumor primari expressi CK19, ja que aquest és l'únic marcador que detecta OSNA. En aquest sentit, la revisió sistemàtica publicada el 2022 (113) posa de manifest que la majoria de tumors epitelials presenten una elevada expressió d'aquest marcador: 98% en tumors de mama (90), 94.1% en colorectal (123), 98,6% en gàstric (108), 96% en pulmó (134), 98% en tumors ginecològics (129) i 91% en carcinomes escamosos de cap i coll (135). Aquesta elevada prevalença en múltiples neoplàsies n'ha permès una aplicació àmplia. A més, els resultats publicats mostren valors de concordança amb la histologia superiors al 85%, reforçant-ne la validesa com a alternativa diagnòstica. Tanmateix, diversos estudis han posat de manifest la variabilitat en l'expressió de CK19 segons el tipus histològic i el grau de diferenciació del tumor. En tumors de mama, per exemple, s'ha observat una pèrdua del marcador en subtipus menys freqüents, com els carcinomes metaplàstics o lobulars (144), mentre que en tumors escamosos de cap i coll s'ha detectat l'absència del marcador fins en el 75% de les mostres amb resultats discordants entre OSNA i HE (135). Com a resposta a aquest risc de falsos negatius, diversos estudis recents en tumors de mama, tiroide i pulmó han incorporat sistemàticament la verificació immunohistoquímica prèvia de CK19 com a criteri per a l'aplicació d'OSNA (117,134,136).

En el cas específic del CP, la literatura disponible presenta resultats aparentment contradictoris. L'estudi de Winter et al. (102) descrigué una expressió universal de CK19

en el 100% dels tumors prostàtics analitzats mitjançant OSNA, independentment del GG de la ISUP. Tot i que aquest treball estava limitat per una mostra petita ($n = 20$), seleccionada majoritàriament amb tumors de mal pronòstic ($PSA > 10$ ng/mL, pT3 i GG de la ISUP ≥ 3), va constituir un precedent important per al desenvolupament posterior d'aquesta línia d'investigació. En canvi, Engels et al. (65) reportaren diversos casos de metàstasi ganglionar amb OSNA negatiu. L'anàlisi retrospectiva revelà una expressió dèbil o absent de CK19 en el tumor primari, especialment en tumors altament desdiferenciats, amb patrons histològics desfavorables (pT3, GG de la ISUP ≥ 3 , alt volum tumoral i elevat percentatge de patrons Gleason 4 i 5). Aquests resultats posen de manifest la heterogeneïtat en l'expressió de CK19 en el CP, influïda pel grau de desdiferenciació cel·lular, habitualment associat a un pitjor pronòstic (104), i per subtipus histològics menys freqüents, com els tumors neuroendocrins i de cèl·lula petita, en què el marcador pot estar parcial o totalment absent. A més, a diferència d'altres tumors epitelials, el teixit prostàtic benigne també pot expressar CK19, especialment en contextos de hiperplàsia o inflamació (103). Encara que aquesta expressió no té implicació maligna, pot generar falsos positius si es produeix contaminació durant la manipulació quirúrgica o al laboratori. Aquesta situació és especialment crítica en pacients amb valors de CK19 propers al llindar diagnòstic, en què la interpretació pot ser més ambigua. Igualment, una neoplàsia sincrònica amb drenatge limfàtic compartit podria donar lloc a un resultat falsament positiu. Per tal de minimitzar aquests riscos, el nostre estudi (137) incorporà dos criteris metodològics clau: *i.* l'exclusió sistemàtica de pacients amb tumors epitelials sincrònics amb drenatge compartit, *ii.* la verificació prèvia d'una expressió positiva de CK19 (amb una intensitat $\geq 50\%$) mitjançant immunohistoquímica en el tumor primari com a requisit d'inclusió. Aquest doble filtratge assegura que només se seleccionin casos amb una expressió molecular adequada del marcador i amb risc mínim de contaminació, incrementant la fiabilitat i precisió de la tècnica OSNA aplicada a pròstata. En paral·lel, i com a línia de futur, es proposa complementar OSNA amb biomarcadors moleculars més específics del teixit prostàtic,

com el PSMA (145), que ha demostrat gran utilitat tant en el diagnòstic per imatge com en les teràpies dirigides. La combinació de CK19 amb dianes moleculars pròpies del teixit prostàtic podria millorar la sensibilitat de la tècnica i ampliar-ne l'aplicabilitat, especialment en tumors atípics o de fenotip agressiu.

Existeixen dues modalitats d'aplicació de la tècnica OSNA descrites en la literatura: l'anàlisi del gangli limfàtic sentinella i l'anàlisi mitjançant la metodologia d'agrupació ganglionar (*pooling*). En tumors com el de mama, on la tècnica de gangli sentinella està àmpliament validada, OSNA s'ha consolidat com una tècnica fiable per a l'anàlisi intraoperatòria, amb capacitat per discernir entre presència o absència de metàstasi ganglionar, quantificar la càrrega tumoral total (TTL) i predir l'afectació ganglionar addicional. Per contra, el drenatge limfàtic prostàtic és altament variable i sovint bilateral (41), fet que complica l'estandardització d'aquesta estratègia. En els darrers anys, alguns estudis han explorat tècniques per a la detecció del gangli sentinella mitjançant la injecció de traçadors radioactius i l'ús de gamma-*probes* intraoperatòries. En aquest sentit, el recent estudi multicèntric SENTINELLE (66) ha aportat dades rellevants: en una cohort de 162 pacients amb CP localitzat de risc intermedi o alt, la biòpsia de gangli sentinella mostrà una sensibilitat del 95,4% i una especificitat del 100% en la detecció de metàstasi ganglionar, prenent com a referència la LP extensa. Tot i aquests resultats prometedors, la tècnica del gangli sentinella encara no s'ha consolidat com a estàndard clínic en pròstata, principalment per la manca de protocols homogenis, la complexitat anatòmica del drenatge i l'absència de validació en cohorts àmplies (17). En aquest escenari, cal destacar que l'estudi d'Engels et al. (105), a diferència del nostre estudi POPCORN, analitzà individualment els ganglis sentinella identificats i extirpats mitjançant cirurgia guiada per magnetòmetre, després de la injecció intraprostàtica de nanopartícules d'òxid de ferro superparamagnètiques. Davant d'aquesta situació, diversos autors han proposat l'aplicació d'OSNA mitjançant la metodologia *pooling*, és a dir, analitzant diversos ganglis dins d'un mateix tub per optimitzar recursos, especialment en tumors amb disseccions ganglionars àmplies. Aquesta estratègia ja

havia estat aplicada prèviament en altres tumors com el colorectal i el pulmonar, amb bons resultats diagnòstics (94,95). Tanmateix, fins ara no s'havia avaluat de manera sistemàtica ni prospectiva en el CP. El nostre estudi POPCORN és el primer treball multicèntric i prospectiu que aplica OSNA en modalitat *pooling* (137). S'hi analitzaren 2.503 ganglis limfàtics de 131 pacients, agrupats en 972 tubs de mostra, i els resultats obtinguts mostren una elevada concordança amb la histologia convencional amb HE ($\kappa = 0,70$; 93,9%), amb una especificitat i un VPN del 96,6%, i una sensibilitat del 73,3%. Aquestes dades són consistents amb estudis previs en altres tumors, i també amb les reportades per Engels et al., consolidant l'ús d'OSNA com una tècnica diagnòstica fiable en el CP, sempre que s'apliqui sota criteris de selecció adequats (113).

Centrant-nos en la metodologia *pooling*, aquesta presenta diversos avantatges que la fan especialment atractiva en el context del CP. En primer lloc, permet analitzar un elevat nombre de ganglis per pacient amb un nombre reduït de reaccions moleculars, la qual cosa suposa en un estalvi significatiu de temps, costos i càrrega de treball, tant per als laboratoris com per als serveis d'Anatomia Patològica. Aquesta eficiència logística és especialment rellevant en tumors com el CP, on la dissecció ganglionar pot incloure més d'una vintena de ganglis per pacient. A més, en analitzar tot el teixit ganglionar, es redueix el biaix per mostreig propi de la histologia convencional i s'obté una mesura objectiva de la càrrega tumoral total (TTL), potencialment útil com a eina de predicció d'afectació addicional en ganglis no analitzats i com a factor pronòstic de recurrència, com ja s'ha demostrat en altres neoplàsies com el càncer de mama (99). Tanmateix, si en un futur s'aconsegueix una definició consistent del gangli sentinella en pròstata, la tècnica OSNA podria esdevenir una eina altament útil per a l'anàlisi intraoperatòria d'aquest gangli, permetent decisions quirúrgiques immediates i evitant disseccions extensives innecessàries.

A més dels avantatges tècnics i diagnòstics, l'estratègia *pooling* també podria tenir un impacte positiu des del punt de vista econòmic i logístic. El fet d'analitzar diversos ganglis en un mateix tub permet reduir de forma significativa el nombre de

reaccions moleculars necessàries, amb la consegüent disminució de costos i temps de laboratori. Tot i que caldrien estudis específics de cost-efectivitat per confirmar-ho, l'evidència existent en altres neoplàsies ja ha suggerit que l'ús d'OSNA en modalitat *pooling* pot traduir-se en beneficis econòmics i clínics per als sistemes de salut i els pacients (96). En aquest sentit, futurs estudis haurien d'avaluar si la seva implementació sistemàtica pot contribuir a optimitzar recursos sense comprometre la qualitat diagnòstica. Tanmateix, l'estratègia *pooling* comporta certes limitacions. El fet d'agrupar múltiples ganglis en un únic tub impedeix conèixer-ne els aspectes morfològics i determinar el nombre exacte de ganglis afectats, una informació rellevant avui dia per valorar la necessitat de tractaments adjuvants (17). Així mateix, el procés d'homogeneïtzació del teixit no permet conservar el material per a estudis histològics complementaris ni per a biobanc. Aquestes limitacions metodològiques s'han de tenir en compte a l'hora d'integrar la tècnica en la pràctica clínica, i poden condicionar-ne l'aplicació segons el context assistencial i els objectius de l'estudi.

En resum, l'estratègia *pooling* ofereix una via innovadora, pràctica i altament eficient per aplicar OSNA en tumors en què no és factible identificar un gangli sentinella, com el CP. Tot i així, la seva implementació ha de tenir en compte els condicionants clínics, tècnics i logístics propis de cada centre i de cada pacient, així com el propòsit diagnòstic o pronòstic perseguit.

Tot i els avantatges exposats del mètode OSNA —com la seva rapidesa, objectivitat, automatització i capacitat per analitzar íntegrament el gangli limfàtic—, un aspecte clau a considerar en la seva aplicació clínica són els casos amb resultats discordants respecte a la histologia convencional. De manera pràcticament unànime, tots els estudis comparatius publicats fins avui, inclòs el nostre estudi POPCORN, han reportat discrepàncies entre els resultats d'OSNA i els de l'anàlisi mitjançant tinció amb HE. Aquestes discordances poden presentar-se en dues direccions: ganglis limfàtics que són OSNA positius però HE negatius, i d'altres que són HE positius però OSNA negatius. Malgrat representar una proporció minoritària de casos, aquestes

discrepàncies poden tenir implicacions rellevants en la presa de decisions clíniques, especialment en pacients amb càrrega metastàtica baixa o limítrofa. En aquest context, entendre els punts forts i febles de cada tècnica és essencial per evitar errors d'estadiatge que podrien condicionar el tractament quirúrgic o adjuvant. Les causes d'aquestes discrepàncies, comentades anteriorment amb més detall, inclouen principalment el biaix per assignació tumoral (TAB), la variabilitat en l'expressió de CK19 i el llindar de detecció utilitzat per OSNA.

En primer lloc, l'alta sensibilitat de la tècnica pot permetre detectar cèl·lules tumorals de petit volum que no són visibles en el tall histològic analitzat, especialment en contextos de micrometàstasi. En aquests casos, l'aparent fals positiu podria reflectir, de fet, una detecció més precoç o més completa de la malaltia. Tanmateix, també poden produir-se falsos positius reals, com en situacions de contaminació accidental durant la manipulació, o bé en pacients amb neoplàsies sincròniques que comparteixen drenatge limfàtic i que poden expressar també CK19, com certs tumors d'origen urotelial o colorectal. Aquestes situacions subratllen la importància d'un acurat coneixement del context clínic i d'una selecció adequada dels pacients.

D'altra banda, els falsos negatius d'OSNA poden aparèixer en tumors amb baixa o inexistent expressió de CK19 —especialment en subtipus desdiferenciats o histològicament atípics—, o bé en aquells casos en què la metàstasi es troba exclusivament en el fragment ganglionar que no ha estat processat per OSNA. Aquest darrer supòsit és especialment rellevant des del punt de vista metodològic: per fer una comparació fiable entre OSNA i HE, la mostra ganglionar s'ha de dividir entre ambdues tècniques, sovint mitjançant una distribució aleatòria del teixit. Aquest fet comporta un biaix inherent al disseny dels estudis comparatius i fa pràcticament impossible assolir una concordança diagnòstica del 100%. Aquest fenomen ha estat àmpliament documentat en tumors com el de mama, colorectal, gàstric, pulmó i ginecològics, on OSNA ha demostrat un rendiment molt alt però, igualment, ha generat dubtes i la necessitat de validació en casos límit. Diversos grups han proposat tècniques

complementàries per estudiar millor aquests casos discordants, com la verificació immunohistoquímica per CK19 en el tumor primari, la repetició de l'anàlisi amb OSNA, l'exhauriment de blocs de parafina, o fins i tot tècniques moleculars com la qRT-PCR o western blot. Aquestes aproximacions han permès confirmar moltes metàstasis inicialment dubtoses i han ajudat a redefinir el valor pronòstic i la sensibilitat real de la tècnica.

En aquest context general, el CP representa un àmbit emergent per a l'aplicació d'OSNA, amb un interès creixent per millorar l'estadificació ganglionar en pacients amb malaltia local o localment avançada de risc intermedi o alt. Tot i així, les dades sobre l'ús d'OSNA en pròstata són molt limitades. El nostre estudi POPCORN aporta nova evidència en aquest sentit, mitjançant l'anàlisi molecular de ganglis limfàtics extrets en el context d'una LP extensa. Amb un total de 131 pacients i més de 2.500 ganglis analitzats en modalitat *pooling*, l'estudi mostra una concordança elevada (93,9%) entre OSNA i HE, una especificitat del 96,6% i un VPN igualment alt.

Tot i aquests bons resultats globals, es van detectar vuit pacients amb resultats discordants (6,1%), una proporció similar a la reportada en altres neoplàsies. Quatre d'aquests casos van resultar positius per OSNA i negatius per HE, i en tots ells es van identificar micrometàstasis. En canvi, quatre pacients presentaven metàstasis detectades només per HE (dues micro i dues macrometàstasis). Entre aquests, destaca una mostra amb un valor OSNA de 210 còpies/ μ L, molt proper al llindar diagnòstic establert per a micrometàstasi, plantejant dubtes sobre la interpretació clínica i valor pronòstic d'aquestes càrregues moleculars tan baixes. Aquestes situacions podrien correspondre a cèl·lules tumorals aïllades o a metàstasis molt incipients, però actualment no disposem de dades suficients per establir-ne el comportament clínic. Aquesta incertesa subratlla la necessitat de futurs estudis que permetin definir, si escau, uns llindars específics per a CP. D'altra banda, la majoria dels casos falsament negatius amb OSNA presentaven característiques histopatològiques desfavorables, en línia amb les observacions realitzades per Engels et al. (105): pT3, alt volum tumoral, GG de la

ISUP ≥ 3 i elevat percentatge de patrons Gleason desfavorables (4 i 5), fet que podria associar-se a una menor expressió de CK19 i, en conseqüència, a una reducció de la sensibilitat diagnòstica en tumors d'alt risc.

Les discrepàncies observades entre OSNA i la histologia convencional amb HE, lluny de desautoritzar cap de les dues tècniques, posen de manifest la importància de conèixer-ne els límits, comprendre'n el funcionament i considerar-les com a eines complementàries en l'estudi ganglionar. OSNA, doncs, aporta una anàlisi objectiva, ràpida i exhaustiva del teixit limfàtic, amb capacitat per detectar micrometàstasis i quantificar la càrrega tumoral total (TTL), dos factors amb potencial valor diagnòstic i pronòstic. Tot i això, aspectes com la baixa expressió de CK19 en tumors desdiferenciats, la possible contaminació o la compartició de drenatge amb altres neoplàsies poden afectar-ne la precisió i generar discrepàncies.

Concloem aquest resum de discussió destacant que el nostre estudi POPCORN és el primer que descriu i valida l'aplicació d'OSNA en modalitat *pooling* per a l'anàlisi ganglionar de pacients amb CP sotmesos a LP, mostrant una elevada concordança amb la histologia convencional amb HE. Aquests resultats consoliden OSNA com una alternativa diagnòstica robusta i eficient per a l'estadificació limfàtica en el CP, si bé caldrà validar-los en cohorts més àmplies i amb el seguiment clínic per determinar el seu valor predictiu en relació amb la recidiva bioquímica i el seu impacte real en la pràctica assistencial.

6.2. LIMITACIONS

El nostre projecte presenta certes limitacions que cal considerar per a una correcta interpretació dels resultats. En el cas de la revisió sistemàtica, la principal limitació fou l'heterogeneïtat entre els estudis inclosos, fins i tot dins de cada subgrup tumoral. Tot i compartir el mateix punt de tall diagnòstic per a OSNA, es detecten diferències en el disseny dels estudis, els criteris d'inclusió, el nombre de ganglis analitzats, la verificació prèvia de l'expressió de CK19 i l'ús de tècniques complementàries en casos discordants. Aquesta variabilitat metodològica dificulta la comparabilitat i limita l'extrapolació dels resultats. A més, la manca de dades de seguiment clínic en la majoria dels estudis impedeix valorar l'impacte pronòstic real de la detecció molecular. Finalment, no es va poder dur a terme un metanàlisi per la manca d'homogeneïtat, tot i que hauria permès obtenir una estimació global més robusta de la sensibilitat i especificitat d'OSNA.

Pel que fa a l'estudi POPCORN, malgrat el seu disseny multicèntric, prospectiu i l'elevat nombre de ganglis analitzats, presenta també algunes limitacions que cal tenir en compte. En primer lloc, la comparació entre OSNA i HE es basa en una divisió física del teixit ganglionar, fet que introdueix un biaix inevitable d'assignació tumoral (TAB), especialment rellevant en el cas de micrometàstasis. Aquest aspecte pot explicar algunes de les discrepàncies detectades i és compartit per la majoria d'estudis que comparen tècniques moleculars i histològiques. En segon lloc, tot i que es va verificar prèviament l'expressió de CK19 en el tumor primari, no es pot descartar una certa heterogeneïtat intraindividual en aquesta expressió, especialment en tumors amb fenotip desdiferenciat o amb presència de múltiples subclons cel·lulars. Aquesta heterogeneïtat podria reduir la sensibilitat diagnòstica d'OSNA en subgrups específics de pacients. Addicionalment, l'estudi no incorpora dades de seguiment clínic, la qual cosa impedeix analitzar la correlació entre els resultats moleculars obtinguts i l'evolució

oncològica dels pacients. Aquesta absència limita la capacitat de valorar el valor pronòstic real de la càrrega tumoral total (TTL) detectada per OSNA.

Finalment, tot i haver exclòs pacients amb neoplàsies sincròniques amb drenatge compartit i haver establert directrius de manipulació per evitar contaminació, no es pot descartar completament aquest risc en l'aplicació real de la tècnica, especialment en entorns amb alta càrrega quirúrgica. Per tot això, els nostres resultats s'han d'interpretar amb precaució, i caldrà validar-los en futurs estudis amb cohorts més àmplies, seguiment clínic prolongat i, si escau, integració de nous biomarcadors moleculars que permetin augmentar la sensibilitat i especificitat de la tècnica OSNA aplicada al CP .

7. CONCLUSIONS

1. El mètode molecular OSNA ofereix uns resultats equivalents als de les tècniques histopatològiques convencionals basades en tinció HE, amb alta precisió diagnòstica per a la detecció de metàstasis ganglionars en diferents entitats tumorals.
2. OSNA permet quantificar de manera ràpida, objectiva i postoperatòria l'expressió d'ARNm de CK19 en els ganglis extrets durant la LP extensa en pacients amb CP, obtenint resultats comparables als de l'estudi histopatològic convencional amb tinció HE.
3. La modalitat *pooling* possibilitza l'optimització de recursos i l'obtenció d'un valor de càrrega tumoral total (TTL) per a cada pacient. Tanmateix, aquesta modalitat limita l'anàlisi morfològica dels ganglis i la determinació del nombre exacte de ganglis afectats. Malgrat això, la determinació de la TTL podria aportar informació pronòstica i terapèutica rellevant en un futur, tal i com ja s'ha observat en altres neoplàsies.
4. Finalment, i com a resposta a l'objectiu principal d'aquest estudi, es conclou que l'estadiatge convencional basat en la tinció HE podria ser substituït pel mètode de diagnòstic molecular OSNA en aquells pacients en què prèviament s'hagi confirmat l'expressió de CK19 en la biòpsia del teixit tumoral prostàtic.

8. LÍNIES DE FUTUR

Els resultats obtinguts, juntament amb l'anàlisi de l'evidència disponible, senten clares hipòtesis de treball i obren la porta a noves àrees de recerca que poden reforçar i ampliar l'aplicabilitat clínica de la tècnica OSNA en el CP. A continuació, es descriuen algunes línies de treball futures que poden contribuir a optimitzar-ne l'ús diagnòstic i pronòstic.

1. **Estudis aleatoritzats amb seguiment clínic.** Són necessaris estudis prospectius aleatoritzats amb seguiment oncològic que permetin correlacionar els valors de càrrega tumoral total (TTL) obtinguts mitjançant OSNA amb el risc de recidiva bioquímica i/o progressió clínica, i comparar aquests resultats amb els criteris actuals basats en el nombre de ganglis afectats segons l'anàlisi histopatològica convencional (HE), especialment amb el llindar de més de dos ganglis positius. Addicionalment, caldrà validar els resultats en cohorts més àmplies i diverses per tal de garantir la seva aplicabilitat en contextos clínics diferents.
2. **Verificació sistemàtica de la CK19.** La incorporació sistemàtica de la tècnica d'immunohistoquímica per a CK19 en el tumor primari, abans de l'aplicació d'OSNA en el teixit ganglionar, pot ajudar a evitar falsos negatius en tumors amb baixa expressió. Aquesta estratègia podria esdevenir una part essencial del protocol diagnòstic, garantint una aplicació més segura i eficient de la tècnica molecular.
3. **Estudi i validació del gangli sentinella en CP.** El desenvolupament de tècniques fiables i reproduïbles per a la identificació del gangli sentinella en CP permetria explorar l'aplicació d'OSNA en escenaris intraoperatoris. La seva aplicació podria evitar disseccions ganglionars innecessàries i reduir la morbiditat quirúrgica associada.
4. **Combinació amb altres biomarcadors moleculars.** L'ús combinat de CK19 amb altres biomarcadors específics de pròstata, com el PSMA, podria augmentar la sensibilitat d'OSNA, especialment en tumors desdiferenciats. Aquesta estratègia obre la porta al desenvolupament de versions multiplexades de la tècnica.

5. **Comparació amb tècniques d'imatge molecular.** L'estudi comparatiu entre OSNA i tècniques com la PET/TC-PSMA permetria definir millor el paper complementari de cada eina en l'estadiatge ganglionar. OSNA podria tenir un rol rellevant en la detecció de micrometàstasis no visibles radiològicament.

6. **Redefinició del punt de tall específic per pròstata.** Seria interessant explorar si el llindar diagnòstic actual (250 còpies d'ARNm de CK19/ μ L) és l'òptim per al CP. Estudis específics podrien contribuir a definir punts de tall més ajustats al context histològic i biològic d'aquest tumor.

7. **Estudis cost-efectivitat.** És important desenvolupar estudis econòmics que analitzin l'impacte de la tècnica OSNA, especialment en la seva modalitat de *pooling*, en comparació amb la histologia convencional amb HE. Aquests estudis haurien de tenir en compte no només els costos directes del procés diagnòstic, sinó també els beneficis associats a l'optimització dels recursos patològics i a una millor estratificació del risc.

9. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024;74:229–63.
2. Fleshner K, Carlsson S, Roobol MJ. The effect of the USPSTF PSA screening recommendation on prostate cancer incidence patterns in the USA. *Nat Rev Urol.* 2017;14:26–37.
3. Bell KJL, Del Mar C, Wright G, Dickinson J, Glasziou P. Prevalence of incidental prostate cancer: A systematic review of autopsy studies. *Int J Cancer.* 2015;137:1749–57.
4. Rebbeck TR, Devesa SS, Chang BL, Bunker CH, Cheng I, Cooney K, et al. Global Patterns of Prostate Cancer Incidence, Aggressiveness, and Mortality in Men of African Descent. *Prostate Cancer.* 2013;2013:1–12.
5. Prostate Source: Globocan 2022. <https://gco.iarc.fr/today/>.
6. Hemminki K. Familial risk and familial survival in prostate cancer. *World J Urol.* 2012;30:143–8.
7. Leitzmann MF, Rohrmann S. Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates. *Clin Epidemiol.* 2012;4:1–11.
8. Stamey TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE, Freiha FS, Redwine E. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med.* 1987;317:909–16.
9. Hayes JH, Barry MJ. Screening for prostate cancer with the prostate-specific antigen test: a review of current evidence. *JAMA.* 2014;311:1143–9.
10. Albertsen PC. Prostate cancer screening and treatment: where have we come from and where are we going? *BJU Int.* 2020;126:218–24.
11. Sotelo RJ, Mora KE, Pérez LH, Novoa J, Carmona O, De Andrade R, et al. Assay Standardization Bias: Different Prostate Cancer Detection Rates and Clinical Outcomes Resulting from Different Assays for Free and Total Prostate-Specific Antigen. *Urology.* 2007;69:1143–6.

12. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TLJ, Ciatto S, Nelen V, et al. Prostate-cancer mortality at 11 years of follow-up. *N Engl J Med*. 2012;366:981–90.
13. Nadler RB, Humphrey PA, Smith DS, Catalona WJ, Ratliff TL. Effect of inflammation and benign prostatic hyperplasia on elevated serum prostate specific antigen levels. *J Urol*. 1995;154:407–13.
14. Ahmed HU, El-Shater Bosaily A, Brown LC, Gabe R, Kaplan R, Parmar MK, et al. Diagnostic accuracy of multi-parametric MRI and TRUS biopsy in prostate cancer (PROMIS): a paired validating confirmatory study. *Lancet*. 2017;389:815–22.
15. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours*. UICC International Union Against Cancer. 8th edn. 2017.
16. Gleason DF, Mellinger GT, Arding LJ. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol*. 1974;111:58–64.
17. Cornford P, Tilki D, van den Bergh RCN, Briers E, Patient Advocate (European Prostate Cancer Coalition/Europa UOMO), Eberli D, et al. *EAU-EANM-ESTRO-ESUR-ISUP-SIOG-Guidelines on Prostate Cancer*. EAU Guidelines 2024. 2024.
18. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA, et al. 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*. 2016;40:244–52.
19. Pierorazio PM, Walsh PC, Partin AW, Epstein JI. Prognostic Gleason grade grouping: data based on the modified Gleason scoring system. *BJU Int*. 2013;111:753–60.
20. Gandaglia G, Ploussard G, Isbarn H, Suardi N, De Visschere PJJ, Futterer JJ, et al. What is the optimal definition of misclassification in patients with very low-risk prostate cancer eligible for active surveillance? Results from a multi-institutional series. *Urol Oncol*. 2015;33:164.e1-164.e9.

21. Van Der Kwast TH, Roobol MJ. Defining the threshold for significant versus insignificant prostate cancer. *Nat Rev Urol*. 2013;10:473–82.
22. Preisser F, Cooperberg MR, Crook J, Feng F, Graefen M, Karakiewicz PI, et al. Intermediate-risk Prostate Cancer: Stratification and Management. *Eur Urol Oncol*. 2020;3:270–80.
23. D'Amico A V., Whittington R, Bruce Malkowicz S, Schultz D, Blank K, Broderick GA, et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA*. 1998;280:969–74.
24. Sohn M, Hubmann R, Moll F, Hatzinger M. The history of prostate cancer from the beginning to DaVinci. *Aktuelle Urol*. 2012;43:228–30.
25. Joniau S, Briganti A, Gontero P, Gandaglia G, Tosco L, Fieuws S, et al. Stratification of high-risk prostate cancer into prognostic categories: a European multi-institutional study. *Eur Urol*. 2015;67:157–64.
26. Fossati N, Willemse PPM, Van den Broeck T, van den Bergh RCN, Yuan CY, Briers E, et al. The Benefits and Harms of Different Extents of Lymph Node Dissection During Radical Prostatectomy for Prostate Cancer: A Systematic Review. *Eur Urol*. 2017;72:84–109.
27. Briganti A, Blute ML, Eastham JH, Graefen M, Heidenreich A, Karnes JR, et al. Pelvic lymph node dissection in prostate cancer. *Eur Urol*. 2009;55:1251–65.
28. Motterle G, Ahmed ME, Andrews JR, Karnes RJ. The Role of Radical Prostatectomy and Lymph Node Dissection in Clinically Node Positive Patients. *Front Oncol*. 2019;9:01395.
29. Abuzallouf S, Dayes I, Lukka H. Baseline staging of newly diagnosed prostate cancer: A summary of the literature. *Journal of Urology*. 2004;171:2122–7.
30. Briganti A, Abdollah F, Nini A, Suardi N, Gallina A, Capitanio U, et al. Performance characteristics of computed tomography in detecting lymph node metastases in

- contemporary patients with prostate cancer treated with extended pelvic lymph node dissection. *Eur Urol*. 2012;61:1132–8.
31. Hövels AM, Heesakkers RAM, Adang EM, Jager GJ, Strum S, Hoogeveen YL. The diagnostic accuracy of CT and MRI in the staging of pelvic lymph nodes in patients with prostate cancer: a meta-analysis. *Clin Radiol*. 2008;63:387–95.
32. Maurer T, Eiber M, Schwaiger M, Gschwend JE. Current use of PSMA-PET in prostate cancer management. *Nat Rev Urol*. 2016;13:226–35.
33. Hofman MS, Lawrentschuk N, Francis RJ, Tang C, Vela I, Thomas P, et al. 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*. 2020;395:1208–16.
34. Wu H, Xu T, Wang X, Yu YB, Fan ZY, Li DX, et al. Diagnostic Performance of 68Gallium Labelled Prostate-Specific Membrane Antigen Positron Emission Tomography/Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging for Staging the Prostate Cancer with Intermediate or High Risk Prior to Radical Prostatectomy: A Systematic Review and Meta-analysis. *World J Mens Health*. 2020;38:208–19.
35. Corfield J, Perera M, Bolton D, Lawrentschuk N. 68Ga-prostate specific membrane antigen (PSMA) positron emission tomography (PET) for primary staging of high-risk prostate cancer: a systematic review. *World J Urol*. 2018;36:519–27.
36. Hope TA, Eiber M, Armstrong WR, Juarez R, Murthy V, Lawhn-Heath C, et al. 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*. 2021;7:1635–42.
37. Afshar-Oromieh A, Avtzi E, Giesel FL, Holland-Letz T, Linhart HG, Eder M, et al. The diagnostic value of PET/CT imaging with the (68)Ga-labelled PSMA ligand HBED-CC in the diagnosis of recurrent prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2015;42:197–209.

38. Perera M, Papa N, Roberts M, Williams M, Udovicich C, Vela I, et al. 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.* 2020;77:403–17.
39. van Leeuwen PJ, Emmett L, Ho B, Delprado W, Ting F, Nguyen Q, et al. Prospective evaluation of 68Gallium-prostate-specific membrane antigen positron emission tomography/computed tomography for preoperative lymph node staging in prostate cancer. *BJU Int.* 2017;119:209–15.
40. Briganti A, Suardi N, Gallina A, Abdollah F, Montorsi F. Platinum Priority-Editorial Pelvic Lymph Node Dissection in Prostate Cancer: The Mystery Is Taking Shape. *Eur Urol.* 2013;63:459–61.
41. Paño B, Sebastià C, Buñesch L, Mestres J, Salvador R, Macías NG, et al. Pathways of Lymphatic Spread in Male Urogenital Pelvic Malignancies. *RadioGraphics.* 2011;31:135–60.
42. Heidenreich A, Ohlmann CH, Polyakov S. Anatomical extent of pelvic lymphadenectomy in patients undergoing radical prostatectomy. *Eur Urol.* 2007;52:29–37.
43. Bader P, Burkhard FC, Markwalder R, Studer UE. Is a limited lymph node dissection an adequate staging procedure for prostate cancer? *J Urol.* 2002;168:514–8.
44. Mattei A, Fuechsel FG, Bhatta Dhar N, Warncke SH, Thalmann GN, Krause T, et al. The template of the primary lymphatic landing sites of the prostate should be revisited: results of a multimodality mapping study. *Eur Urol.* 2008;53:118–25.
45. Joniau S, Van Den Bergh L, Lerut E, Deroose CM, Haustermans K, Oyen R, et al. Mapping of pelvic lymph node metastases in prostate cancer. *Eur Urol.* 2013;63:450–8.

46. Mayans R, Bergera Z, Zuazu R, Diaz-Tejeiro Z, Abad B, Rosselló B, et al. Linfadenectomía (ampliada vs estándar) y cáncer de próstata. *Actas Urol Esp.* 2008;32:879–87.
47. Touijer KA, Sjoberg DD, Benfante N, Laudone VP, Ehdaie B, Eastham JA, et al. Limited versus Extended Pelvic Lymph Node Dissection for Prostate Cancer: A Randomized Clinical Trial. *Eur Urol Oncol.* 2021;4:532–9.
48. Briganti A, Larcher A, Abdollah F, Capitanio U, Gallina A, Suardi N, et al. 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.* 2012;61:480–7.
49. Gandaglia G, Fossati N, Zaffuto E, Bandini M, Dell'Oglio P, Bravi CA, et al. Development and Internal Validation of a Novel Model to Identify the Candidates for Extended Pelvic Lymph Node Dissection in Prostate Cancer. *Eur Urol.* 2017;72:632–40.
50. Gandaglia G, Ploussard G, Valerio M, Mattei A, Fiori C, Fossati N, et al. A Novel Nomogram to Identify Candidates for Extended Pelvic Lymph Node Dissection Among Patients with Clinically Localized Prostate Cancer Diagnosed with Magnetic Resonance Imaging-targeted and Systematic Biopsies. *Eur Urol.* 2019;75:506–14.
51. Draulans C, Everaerts W, Isebaert S, Van Bruwaene S, Gevaert T, Oyen R, et al. Development and External Validation of a Multiparametric Magnetic Resonance Imaging and International Society of Urological Pathology Based Add-On Prediction Tool to Identify Prostate Cancer Candidates for Pelvic Lymph Node Dissection. *J Urol.* 2020;203:713–8.
52. Gandaglia G, Martini A, Ploussard G, Fossati N, Stabile A, De Visschere P, et al. External Validation of the 2019 Briganti Nomogram for the Identification of Prostate Cancer Patients Who Should Be Considered for an Extended Pelvic Lymph Node Dissection. *Eur Urol.* 2020;78:138–42.

53. Di Pierro GB, Salciccia S, Frisenda M, Tufano A, Sciarra A, Scarrone E, et al. Comparison of Four Validated Nomograms (Memorial Sloan Kettering Cancer Center, Briganti 2012, 2017, and 2019) Predicting Lymph Node Invasion in Patients with High-Risk Prostate Cancer Candidates for Radical Prostatectomy and Extended Pelvic Lymph Node Dissection: Clinical Experience and Review of the Literature. *Cancers (Basel)*. 2023;15:1683.
54. Meijer D, van Leeuwen PJ, Roberts MJ, Siriwardana AR, Morton A, Yaxley JW, et al. External Validation and Addition of Prostate-specific Membrane Antigen Positron Emission Tomography to the Most Frequently Used Nomograms for the Prediction of Pelvic Lymph-node Metastases: an International Multicenter Study. *Eur Urol*. 2021;80:234–42.
55. Briganti A, Chun FKH, Salonia A, Suardi N, Gallina A, Da Pozzo LF, et al. Complications and other surgical outcomes associated with extended pelvic lymphadenectomy in men with localized prostate cancer. *Eur Urol*. 2006;50:1006–13.
56. Ploussard G, Briganti A, De La Taille A, Haese A, Heidenreich A, Menon M, et al. Pelvic lymph node dissection during robot-assisted radical prostatectomy: efficacy, limitations, and complications-a systematic review of the literature. *Eur Urol*. 2014;65:7–16.
57. Davis JW, Shah JB, Achim M. Robot-assisted extended pelvic lymph node dissection (PLND) at the time of radical prostatectomy (RP): a video-based illustration of technique, results, and unmet patient selection needs. *BJU Int*. 2011;108:993–8.
58. Tyritzis SI, Wallerstedt A, Steineck G, Nyberg T, Hugosson J, Bjartell A, et al. Thromboembolic complications in 3,544 patients undergoing radical prostatectomy with or without lymph node dissection. *J Urol*. 2015;193:117–25.

59. Cserni G, Maguire A, Bianchi S, Ryska A, Kovács A. Sentinel lymph node assessment in breast cancer-an update on current recommendations. *Virchows Arch.* 2022;480:95–107.
60. de Vries HM, Lee HJ, Lam W, Djajadiningrat RS, Ottenhof SR, Roussel E, et al. Clinicopathological predictors of finding additional inguinal lymph node metastases in penile cancer patients after positive dynamic sentinel node biopsy: a European multicentre evaluation. *BJU Int.* 2022;130:126–32.
61. Wong SL, Faries MB, Kennedy EB, Agarwala SS, Akhurst TJ, Ariyan C, et al. Sentinel Lymph Node Biopsy and Management of Regional Lymph Nodes in Melanoma: American Society of Clinical Oncology and Society of Surgical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol.* 2018;36:399–413.
62. Wawroschek F, Vogt H, Weckermann D, Wagner T, Harzmann R. The sentinel lymph node concept in prostate cancer - first results of gamma probe-guided sentinel lymph node identification. *Eur Urol.* 1999;36:595–600.
63. van der Poel HG, Wit EM, Acar C, van den Berg NS, van Leeuwen FWB, Valdes Olmos RA, et al. Sentinel node biopsy for prostate cancer: report from a consensus panel meeting. *BJU Int.* 2017;120:204–11.
64. Rossin G, Zorzi F, De Pablos-Rodríguez P, Biasatti A, Marengo J, Ongaro L, et al. Sentinel Lymph Node Biopsy in Prostate Cancer: An Overview of Diagnostic Performance, Oncological Outcomes, Safety, and Feasibility. *Diagnostics (Basel).* 2023;13:2543.
65. Engels S, Brautmeier L, Reinhardt L, Wasylow C, Hasselmann F, Henke RP, et al. Evaluation of Fast Molecular Detection of Lymph Node Metastases in Prostate Cancer Patients Using One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA). *Cancers (Basel).* 2021;13:1–12.
66. Lannes F, Baboudjian M, Ruffion A, Rouy M, Giammarile F, Rousseau T, et al. Radioisotope-guided Lymphadenectomy for Pelvic Lymph Node Staging in Patients

- With Intermediate- and High-risk Prostate Cancer (The Prospective SENTINELLE Study). *J Urol*. 2023;209:364–73.
67. Grivas N, Wit EMK, Kuusk T, KleinJan GH, Donswijk ML, Van Leeuwen FWB, et al. The impact of adding sentinel node biopsy to extended pelvic lymph node dissection on biochemical recurrence in prostate cancer patients treated with robot-assisted radical prostatectomy. *Journal of Nuclear Medicine*. 2018;59:204–9.
 68. Claps F, Ramírez-Backhaus M, Mir Maresma MC, Gómez-Ferrer Á, Mascarós JM, Marengo J, et al. Indocyanine green guidance improves the efficiency of extended pelvic lymph node dissection during laparoscopic radical prostatectomy. *Int J Urol*. 2021;28:566–72.
 69. Mazzone E, Dell'Oglio P, Grivas N, Wit E, Donswijk M, Briganti A, et al. Diagnostic Value, Oncologic Outcomes, and Safety Profile of Image-Guided Surgery Technologies During Robot-Assisted Lymph Node Dissection with Sentinel Node Biopsy for Prostate Cancer. *J Nucl Med*. 2021;62:1363–71.
 70. Fumadó L, Abascal JM, Mestre-Fusco A, Vidal-Sicart S, Aguilar G, Juanpere N, et al. Sentinel Lymph Node Biopsy in Prostate Cancer Patients: Results From an Injection Technique Targeting the Index Lesion in the Prostate Gland. *Front Med (Lausanne)*. 2022;9:931867.
 71. Maurer T, Weirich G, Schottelius M, Weineisen M, Frisch B, Okur A, et al. Prostate-specific membrane antigen-radioguided surgery for metastatic lymph nodes in prostate cancer. *Eur Urol*. 2015;68:530–4.
 72. Horn T, Krönke M, Rauscher I, Haller B, Robu S, Wester HJ, et al. Single Lesion on Prostate-specific Membrane Antigen-ligand Positron Emission Tomography and Low Prostate-specific Antigen Are Prognostic Factors for a Favorable Biochemical Response to Prostate-specific Membrane Antigen-targeted Radioguided Surgery in Recurrent Prostate Cancer. *Eur Urol*. 2019;76:517–23.
 73. Gandaglia G, Mazzone E, Stabile A, Pellegrino A, Cucchiara V, Barletta F, et al. Prostate-specific membrane antigen Radioguided Surgery to Detect Nodal

- Metastases in Primary Prostate Cancer Patients Undergoing Robot-assisted Radical Prostatectomy and Extended Pelvic Lymph Node Dissection: Results of a Planned Interim Analysis of a Prospective Phase 2 Study. *Eur Urol.* 2022;82:411–8.
74. Passoni NM, Fajkovic H, Xylinas E, Kluth L, Seitz C, Robinson BD, et al. Prognosis of patients with pelvic lymph node (LN) metastasis after radical prostatectomy: value of extranodal extension and size of the largest LN metastasis. *BJU Int.* 2014;114:503–10.
75. Schumacher MC, Burkhard FC, Thalmann GN, Fleischmann A, Studer UE. Good Outcome for Patients with Few Lymph Node Metastases After Radical Retropubic Prostatectomy. *Eur Urol.* 2008;54:344–52.
76. Touijer KA, Mazzola CR, Sjoberg DD, Scardino PT, Eastham JA. Long-term outcomes of patients with lymph node metastasis treated with radical prostatectomy without adjuvant androgen-deprivation therapy. *Eur Urol.* 2014;65:20–5.
77. Daneshmand S, Quek ML, Stein JP, Lieskovsky G, Cai J, Pinski J, et al. Prognosis of patients with lymph node positive prostate cancer following radical prostatectomy: long-term results. *J Urol.* 2004;172:2252–5.
78. Marra G, Valerio M, Heidegger I, Tsaur I, Mathieu R, Ceci F, et al. Management of Patients with Node-positive Prostate Cancer at Radical Prostatectomy and Pelvic Lymph Node Dissection: A Systematic Review. *Eur Urol Oncol.* 2020;3:565–81.
79. Prendeville S, Van Der Kwast TH. Lymph node staging in prostate cancer: perspective for the pathologist. *J Clin Pathol.* 2016;69:1039–45.
80. Lawrence WD, Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology. ADASP recommendations for processing and reporting of lymph node specimens submitted for evaluation of metastatic disease. *Virchows Arch.* 2001;439:601–3.
81. Perry-Keene J, Ferguson P, Samaratunga H, Nacey JN, Delahunt B. Total submission of pelvic lymphadenectomy tissues removed during radical prostatectomy for prostate cancer increases lymph node yield and detection of micrometastases. *Histopathology.* 2014;64:399–404.

82. Touijer K, Rabbani F, Otero JR, Secin FP, Eastham JA, Scardino PT, et al. Standard versus limited pelvic lymph node dissection for prostate cancer in patients with a predicted probability of nodal metastasis greater than 1%. *J Urol.* 2007;178(1):120–4.
83. Abdollah F, Sun M, Thuret R, Jeldres C, Tian Z, Briganti A, et al. Lymph node count threshold for optimal pelvic lymph node staging in prostate cancer. *Int J Urol.* 2012;19:645–51.
84. Boorjian SA, Thompson RH, Siddiqui S, Bagniewski S, Bergstralh EJ, Karnes RJ, et al. Long-term outcome after radical prostatectomy for patients with lymph node positive prostate cancer in the prostate specific antigen era. *J Urol.* 2007;178:864–71.
85. Briganti A, Karnes JR, Da Pozzo LF, Cozzarini C, Gallina A, Suardi N, et al. Two positive nodes represent a significant cut-off value for cancer specific survival in patients with node positive prostate cancer. A new proposal based on a two-institution experience on 703 consecutive N+ patients treated with radical prostatectomy, extended pelvic lymph node dissection and adjuvant therapy. *Eur Urol.* 2009;55:261–70.
86. Passoni NM, Fajkovic H, Xylinas E, Kluth L, Seitz C, Robinson BD, et al. Prognosis of patients with pelvic lymph node (LN) metastasis after radical prostatectomy: value of extranodal extension and size of the largest LN metastasis. *BJU Int.* 2014;114:503–10.
87. Fleischmann A, Schobinger S, Schumacher M, Thalmann GN, Studer UE. Survival in surgically treated, nodal positive prostate cancer patients is predicted by histopathological characteristics of the primary tumor and its lymph node metastases. *Prostate.* 2009;69:352–62.
88. Egevad L, Srigley JR, Delahunt B. International Society of Urological Pathology (ISUP) consensus conference on handling and staging of radical prostatectomy specimens: rationale and organization. *Mod Pathol.* 2011;24:1–5.

89. Hofer MD, Kuefer R, Huang W, Li H, Bismar TA, Perner S, et al. Prognostic factors in lymph node-positive prostate cancer. *Urology*. 2006;67:1016–21.
90. Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology*. 2002;40:403–39.
91. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*. 1982;31:11–24.
92. OSNA / RD-100i - Sysmex Europe - Catálogo PDF | Documentación técnica | Brochure. <https://pdf.medicalexpo.es/pdf/sysmex-europe/osna-rd-100i/70998-127494.html>.
93. Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, Kaneko T, Iwase T, Akiyama F, et al. One-step Nucleic Acid Amplification for Intraoperative Detection of Lymph Node Metastasis in Breast Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*. 2007;13:4807–16.
94. Vodicka J, Mukensnabl P, Vejvodova S, Spidlen V, Kulda V, Topolcan O, et al. A more sensitive detection of micrometastases of NSCLC in lymph nodes using the one-step nucleic acid amplification (OSNA) method. *J Surg Oncol*. 2018;117:163–70.
95. Rakislova N, Montironi C, Aldecoa I, Fernandez E, Bombi JA, Jimeno M, et al. Lymph node pooling: a feasible and efficient method of lymph node molecular staging in colorectal carcinoma. *J Transl Med*. 2017;15:14.
96. Diaz-Mercedes S, Archilla I, Camps J, de Lacy A, Gorostiaga I, Momblan D, et al. Budget Impact Analysis of Molecular Lymph Node Staging Versus Conventional Histopathology Staging in Colorectal Carcinoma. *Appl Health Econ Health Policy*. 2019;17:655–67.
97. Shi F, Liang Z, Zhang Q, Wang C, Liu X. The performance of one-step nucleic acid amplification assay for intraoperative detection of sentinel lymph node macrometastasis in breast cancer: An updated meta-analysis. *The Breast*. 2018;39:39–45.

98. Peg V, Espinosa-Bravo M, Vieites B, Vilardell F, Antúnez JR, De Salas MS, et al. Intraoperative molecular analysis of total tumor load in sentinel lymph node: A new predictor of axillary status in early breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;139:87–93.
99. Peg V, Sansano I, Vieites B, Bernet L, Cano R, Córdoba A, et al. Role of total tumour load of sentinel lymph node on survival in early breast cancer patients. *Breast.* 2017;33:8–13.
100. Vieites B, López-García M, Martín-Salvago MD, Ramirez-Tortosa CL, Rezola R, Sancho M, et al. Predictive and prognostic value of total tumor load in sentinel lymph nodes in breast cancer patients after neoadjuvant treatment using one-step nucleic acid amplification: the NEOVATTL study. *Clinical and Translational Oncology.* 2021;23:1377–85.
101. Tranoulis A, Georgiou D, Yap J, Attard-Montalto S, Twigg J, Elattar A, et al. The evolving role of one-step nucleic acid amplification (OSNA) for the intra-operative detection of lymph node metastases: A diagnostic accuracy meta-analysis. *European Journal of Surgical Oncology.* 2020;47:1233–43.
102. Winter A, Engels S, Goos P, Süykers MC, Henke RP, Gerullis H, et al. Detection of CK19 mRNA Using One-step Nucleic Acid Amplification (OSNA) in Prostate Cancer: Preliminary Results. *J Cancer.* 2018;9:4611–7.
103. Peehl DM, Sellers RG, McNeal JE. Keratin 19 in the adult human prostate: tissue and cell culture studies. *Cell Tissue Res.* 1996;285:171–6.
104. Menz A, Bauer R, Kluth M, Marie von Barga C, Gorbokon N, Viehweger F, et al. Diagnostic and prognostic impact of cytokeratin 19 expression analysis in human tumors: a tissue microarray study of 13,172 tumors. *Hum Pathol.* 2021;115:19–36.
105. Engels S, Brautmeier L, Reinhardt L, Wasylow C, Hasselmann F, Henke RP, et al. Evaluation of fast molecular detection of lymph node metastases in prostate cancer patients using one-step nucleic acid amplification (Osna). *Cancers (Basel).* 2021;13:1–12.

106. Argun OB, Mourmouris P, Saglican Y, Doganca T, Tuna MB, Kayhan CK, et al. One step nucleic acid amplification (OSNA) for detection of lymph node metastasis during robotic radical prostatectomy for prostate cancer: A pilot study. *Arch Ital Urol Androl.* 2022;94:265–9.
107. Wild JB, Iqbal N, Francombe J, Papettas T, Sanders DS, Ramcharan S. Is it time for one-step nucleic acid amplification (OSNA) in colorectal cancer? A systematic review and meta-analysis. *Tech Coloproctol.* 2017;21:693–9.
108. Yaguchi Y, Sugasawa H, Tsujimoto H, Takata H, Nakabayashi K, Ichikura T, et al. One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) for the Application of Sentinel Node Concept in Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2011;18:2289–96.
109. Raffone A, Travaglino A, Santoro A, Esposito I, Angelico G, Spadola S, et al. Accuracy of One-Step Nucleic Acid Amplification in Detecting Lymph Node Metastases in Endometrial Cancer. *Pathol Oncol Res.* 2020;26:2049–56.
110. Intraoperative tests (RD-100i OSNA system and Metasin test) for detecting sentinel lymph node metastases in breast cancer | Guidance and guidelines | NICE. <https://www.nice.org.uk/guidance/DG8/uptake>.
111. Bernet L, Piñero A, Martínez M, Sicart SV, Algara M, Palomares E. Consensus of the Spanish Society of Breast Senology and Pathology (SESPM) on Selective Biopsy of the Sentinel Node (BSGC) and axylar management in breast cancer. *Revista de Senologia y Patologia Mamaria.* 2022;35:243–59.
112. Archilla I, Díaz-Mercedes S, Aguirre JJ, Tarragona J, Machado I, Rodrigo MT, et al. Lymph Node Tumor Burden Correlates With Tumor Budding and Poorly Differentiated Clusters: A New Prognostic Factor in Colorectal Carcinoma? *Clin Transl Gastroenterol.* 2021;12:e00303.
113. Cuadras M, Planas J, Celma A, Regis L, de Torres IM, Semidey ME, et al. Application of One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) in different cancer entities and usefulness in prostate cancer: a systematic review. *BMC Cancer.* 2022;22:357.

114. Shamseer L, Moher D, Clarke M, Gherzi D, Liberati A, Petticrew M, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015: elaboration and explanation. *BMJ*. 2015;350:g7647.
115. Feldman S, Krishnamurthy S, Gillanders W, Gittleman M, Beitsch PD, Young PR, et al. A Novel Automated Assay for the Rapid Identification of Metastatic Breast Carcinoma in Sentinel Lymph Nodes. *Cancer*. 2011;117:2599–607.
116. Le Frère-Belda MA, Bats AS, Gillaizeau F, Poulet B, Clough KB, Nos C, et al. Diagnostic performance of one-step nucleic acid amplification for intraoperative sentinel node metastasis detection in breast cancer patients. *Int J Cancer*. 2012;130:2377–86.
117. Vegué LB, Rojo F, Hardisson D, Iturriagagoitia AC, Panadés MJ, Velasco A, et al. Comparison of molecular analysis and histopathology for axillary lymph node staging in primary breast cancer: results of the B-CLOSER-I study. *Diagn Mol Pathol*. 2012;21:69–76.
118. Wang Y sheng, Ou-yang T, Wu J, Liu Y hui, Cao X chen, Sun X, et al. Comparative study of one-step nucleic acid amplification assay, frozen section, and touch imprint cytology for intraoperative assessment of breast sentinel lymph node in Chinese patients. *Cancer Sci*. 2012;103:1989–93.
119. Pathmanathan N, Renthawa J, French JR, Edstrom-Elder E, Hall G, Mahajan H, et al. Intraoperative sentinel lymph node assessment in breast cancer: a comparison of rapid diagnostic method based on CK19 mRNA expression and imprint cytology. *ANZ J Surg*. 2014;84:730–4.
120. Banerjee SM, Michalopoulos N V, Williams NR, Davidson T, El Sheikh S, McDermott N, et al. Detailed evaluation of one step nucleic acid (OSNA) molecular assay for intra-operative diagnosis of sentinel lymph node metastasis and prediction of non-sentinel nodal involvement: Experience from a London Teaching Hospital. *Breast*. 2014;23:378–84.

121. Li D, Xu X, Chen J, Chen J, Yang B, Yang W, et al. Utility of one-step nucleic acid amplification (OSNA) assay in detecting breast cancer metastases of sentinel lymph nodes in a Chinese population. *Breast Cancer*. 2015;22:135–40.
122. Croner RS, Schellerer V, Demund H, Schildberg C, Papadopoulos T, Naschberger E, et al. One Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) - a new method for lymph node staging in colorectal carcinomas. *J Transl Med*. 2010;8:83.
123. Yamamoto H, Sekimoto M, Oya M, Yamamoto N, Konishi F, Sasaki J, et al. OSNA-Based Novel Molecular Testing for Lymph Node Metastases in Colorectal Cancer Patients: Results from a Multicenter Clinical Performance Study in Japan. *Ann Surg Oncol*. 2011;18:1891–8.
124. Güller U, Zettl A, Worni M, Langer I, Cabalzar-Wondberg D, Viehl CT, et al. Molecular investigation of lymph nodes in colon cancer patients using one-step nucleic acid amplification (OSNA). *Cancer*. 2012;118:6039–45.
125. Yamamoto H, Tomita N, Inomata M, Furuhashi T, Miyake Y, Noura S, et al. OSNA-Assisted Molecular Staging in Colorectal Cancer: A Prospective Multicenter Trial in Japan. *Ann Surg Oncol*. 2016;23:391–6.
126. Kumagai K, Yamamoto N, Miyashiro I, Tomita Y, Katai H, Kushima R, et al. Multicenter study evaluating the clinical performance of the OSNA assay for the molecular detection of lymph node metastases in gastric cancer patients. *Gastric Cancer*. 2014;17:273–80.
127. Shimada A, Takeuchi H, Nishi T, Mayanagi S, Fukuda K, Suda K, et al. Utility of the one-step nucleic acid amplification assay in sentinel node mapping for early gastric cancer patients. *Gastric Cancer*. 2019;23:418–25.
128. Okamoto S, Niikura H, Nakabayashi K, Hiyama K, Matoda M, Takeshima N, et al. Detection of sentinel lymph node metastases in cervical cancer: assessment of KRT19 mRNA in the one-step nucleic acid amplification (OSNA) method. *Gynecol Oncol*. 2013;130:530–6.

129. Nagai T, Niikura H, Okamoto S, Nakabayashi K, Matoda M, Utsunomiya H, et al. A New Diagnostic Method for Rapid Detection of Lymph Node Metastases Using a One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) Assay in Endometrial Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2015;22:980–6.
130. Fanfani F, Monterossi G, Ghizzoni V, Rossi ED, Dinoi G, Inzani F, et al. One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA): A fast molecular test based on CK19 mRNA concentration for assessment of lymph-nodes metastases in early stage endometrial cancer. *PLoS One*. 2018;13:e0195877.
131. Košťun J, Pešta M, Sláma J, Slunéčko R, Vlasák P, Bouda J, et al. One-step nucleic acid amplification vs ultrastaging in the detection of sentinel lymph node metastasis in endometrial cancer patients. *J Surg Oncol*. 2019;119:361–9.
132. Inoue M, Hiyama K, Nakabayashi K, Morii E, Minami M, Sawabata N, et al. An accurate and rapid detection of lymph node metastasis in non-small cell lung cancer patients based on one-step nucleic acid amplification assay. *Lung Cancer*. 2012;78:212–8.
133. Nakagawa K, Asamura H, Tsuta K, Nagai K, Yamada E, Ishii G, et al. The novel one-step nucleic acid amplification (OSNA) assay for the diagnosis of lymph node metastasis in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC): Results of a multicenter prospective study. *Lung Cancer*. 2016;97:1–7.
134. Escalante Pérez M, Hermida Romero MT, Otero Alén B, Álvarez Martínez M, Fernández Prado R, de la Torre Bravos M, et al. Detection of lymph node metastasis in lung cancer patients using a one-step nucleic acid amplification assay: a single-centre prospective study. *J Transl Med*. 2019;17:233.
135. Goda H, Nakashiro K ichi, Oka R, Tanaka H, Wakisaka H, Hato N, et al. One-step nucleic acid amplification for detecting lymph node metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2012;48:958–63.
136. del Carmen S, Gatiús S, Franch-Arcas G, Baena JA, Gonzalez O, Zafon C, et al. Concordance study between one-step nucleic acid amplification and morphologic

- techniques to detect lymph node metastasis in papillary carcinoma of the thyroid. *Hum Pathol.* 2016;48:132–41.
137. Cuadras M, Semidey ME, Planas J, de Torres IM, Regis L, Celma A, et al. Molecular Detection of Lymph Node Metastases with One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) Pooling in Prostate Cancer: The POPCORN Study. *Int J Mol Sci.* 2024;25:13489.
138. Eggener SE, Scardino PT, Walsh PC, Han M, Partin AW, Trock BJ, et al. Predicting fifteen-year cancer-specific mortality based on the pathological features of prostate cancer. *J Urol.* 2011;185:869–75.
139. Małkiewicz B, Kiełb P, Karwacki J, Czerwińska R, Długosz P, Lemiński A, et al. Utility of Lymphadenectomy in Prostate Cancer: Where Do We Stand? *J Clin Med.* 2022;11:2343.
140. Cheng L, Zincke H, Blute ML, Bergstralh EJ, Scherer B, Bostwick DG. Risk of prostate carcinoma death in patients with lymph node metastasis. *Cancer.* 2001;91:66–73.
141. van Leeuwen PJ, Emmett L, Ho B, Delprado W, Ting F, Nguyen Q, et al. Prospective evaluation of 68Gallium-prostate-specific membrane antigen positron emission tomography/computed tomography for preoperative lymph node staging in prostate cancer. *BJU Int.* 2017;119:209–15.
142. García-Perdomo HA, Correa-Ochoa JJ, Contreras-García R, Daneshmand S. Effectiveness of extended pelvic lymphadenectomy in the survival of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Cent European J Urol.* 2018;71:262–9.
143. Li K, Meng M, Zhang W, Li J, Wang Y, Zhou C. Diagnostic value of one-step nucleic acid amplification for sentinel lymph node metastasis in cytokeratin 19-positive tumors: evidence from bioinformatics and meta-analysis. *Front Oncol.* 2024;14:1370709.

144. Bettington M, Lakhani SR, Ung OA. Is the one-step nucleic acid amplification assay better for intra-operative assessment of breast sentinel nodes? ANZ J Surg. 2014;84:725–9.
145. Sweat SD, Pacelli A, Murphy GP, Bostwick DG. Prostate-specific membrane antigen expression is greatest in prostate adenocarcinoma and lymph node metastases. Urology. 1998;52:637–40.

10. ANNEX

10.1. INFORME DEL COMITÈ ÈTIC D'INVESTIGACIÓ CLÍNICA



INFORME DEL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS Y COMISIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL UNIVERSITARI VALL D'HEBRON

Sra. Mireia Navarro Sebastián, Secretaria del COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS del Hospital Universitari Vall d'Hebron,

CERTIFICA

Que el Comité de Ética de Investigación con Medicamentos del Hospital Universitario Vall d'Hebron, en el cual la Comisión de proyectos de investigación está integrada, se reunió en sesión ordinaria nº 397 el pasado 20/09/2019 y evaluó el proyecto de investigación PR(AG)316/2019 presentado con fecha 01/07/2019, titulado “*Estudio de validación para la detección de CK19 utilizando el método pooling mediante One-step Nucleic Acid Amplification (OSNA) en cáncer de próstata (Estudio POPCORN)*” que tiene como investigador principal a la Dra. M^a Eugenia Semidey Raven del Servicio de Anatomía Patológica de nuestro Centro.

Versión de documentos:

- Memoria de proyecto Versión 2.0 Septiembre 2019
- HIP/CI Versión 2.0 Septiembre 2019

El resultado de la evaluación fue el siguiente:

Aprobado

El Comité tanto en su composición como en los PNT cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con el Real Decreto 1090/2015, y su composición actual es la siguiente:



Presidente:

SOLEDAD GALLEGO MELCÓN (Médico)

Vicepresidente:

JOAN SEGARRA SARRIES (Abogado)

Secretario:

MIREIA NAVARRO SEBASTIAN (Química)

Vocales:

LLUIS ARMADANS GIL (Médico)

FERNANDO AZPIROZ VIDAUR (Médico)

VALENTINA BALASSO (Médico)

ESTHER CUCURULL FOLGUERA (Médico Farmacólogo)

INES M DE TORRES RAMÍREZ (Médico)

ELADIO FERNÁNDEZ LIZ (Farmacéutico de Atención Primaria)

INMACULADA FUENTES CAMPS (Médico Farmacólogo)

JAUME GUARDIA MASSÓ (Médico)

JUAN CARLOS HORTAL IBARRA (Profesor de Universidad)

MARIA LUJAN IAVECCHIA (Médico Farmacólogo)

NAYANA JOSHI JUBERT (Médico)

ALEXIS RODRIGUEZ GALLEGO (Médico Farmacólogo)

JUDITH SANCHEZ RAYA (Médico)

MARTA SOLÉ ORSOLA (Enfermera)

PILAR SUÑÉ MARTÍN (Farmacéutica Hospital)

VÍCTOR VARGAS BLASCO (Médico)

GLORIA GÁLVEZ HERNANDO (Enfermera)

ORIOL ROCA GAS (Médico)

ESPERANZA ZURIGUEL PEREZ (Enfermera)

En dicha reunión del Comité de Ética de Investigación con Medicamentos se cumplió el quórum preceptivo legalmente.

En el caso de que se evalúe algún proyecto del que un miembro sea investigador/colaborador, éste se ausentará de la reunión durante la discusión del proyecto.

**MIREIA
NAVARRO
SEBASTIAN**

Firmado digitalmente por MIREIA
NAVARRO SEBASTIAN
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES,
ou=Vegeu <https://www.aoc.cat/CATCert/>,
Regulacio, sn=NAVARRO SEBASTIAN,
givenName=MIREIA,
serialNumber=38121226Z, cn=MIREIA
NAVARRO SEBASTIAN
Fecha: 2019.09.20 15:57:06 +02'00'

Sra. Mireia Navarro

Secretaria del CEIm