



## Antígeno Prostático Específico

Em 1.971 foi caracterizada uma molécula reconhecida como componente antigênico do plasma seminal humano, cujo gene pertence à família do gene da calicreína humana, localizada no braço longo do cromossomo 19. Somente em 1.979, essa molécula foi nomeada de antígeno prostático específico (PSA), sendo exaustivamente estudada, culminando a partir de 1.981, com pesquisas a respeito de sua ligação com o câncer de próstata.

O câncer de próstata é o segundo mais diagnosticado depois do de pele, na população masculina, no mundo ocidental, com uma incidência mundial, que parece estar aumentando anualmente cerca de 2 a 3%. É a segunda mais comum causa de morte por câncer, após o de pulmão, na população masculina americana, com taxa de mortalidade duas vezes maior em homens negros que em brancos. Embora amplamente reconhecida a necessidade de diagnóstico precoce, quando a doença está ainda confinada à glândula, na maioria dos homens já está na fase avançada, quando do diagnóstico. Foi com a intenção do diagnóstico precoce que as dosagens de PSA, uma vez disponíveis, foram intensamente utilizadas nos últimos dez anos. Ocorre que durante este período o conhecimento da biologia do tumor, bem como o comportamento do seu marcador, o PSA, avançaram grandemente, tornando-se necessária uma revisão dos conceitos iniciais, bem como uma mudança na metodologia analítica do marcador.

### Biologia Molecular do PSA

O locus do gene da calicreína humana compõem-se de três membros: a calicreína tissular, a glandular e o PSA. Os genes do PSA e das calicreínas estão expressos no epitélio prostático normal, bem como no epitélio hiperplásico benigno e maligno. A grande similaridade estrutural entre estes produtos constitui-se num problema potencial, em vista da reatividade cruzada entre anticorpos dirigidos contra as diferentes moléculas, ou seja, anticorpos contra o PSA podem agir de forma cruzada com as duas calicreínas e vice-versa.

O PSA é uma das três mais predominantes proteínas derivadas da próstata no líquido seminal, onde sua concentração varia de 0,5 a 3,0 g/L, e é detectado no epitélio prostático já no retículo endoplasmático, e na superfície humana, sugerindo exocitose. É detectado ainda, em baixas concentrações, nas glândulas periuretrais, endométrio humano e células tumorais mamárias. Pertence ao grande grupo das serina-proteases extracelulares e assemelha-se a quimiotripsina. Seu principal substrato fisiológico são as proteínas formadoras de gel no sêmen, produzidas e secretadas pelas vesículas seminais, as semenogelinas I e II e a fibronectina, as quais são degradadas em fragmentos menores, solúveis, devido a ação do PSA, que liquefazendo o ejaculado, permite a liberação e progressivo aumento da mobilidade dos espermatozoides.

Outras atividades têm sido atribuídas ao PSA, como a modulação do crescimento celular em vista da sua ação proteolítica sobre a IGF-BP 3, diminuindo assim a capacidade ligadora de IGF-1. Além disso, pelo menos *in vitro*, o PSA tem atividade proteolítica sobre a PTH-rP, paralelamente a ação inibidora de amp-ciclíco dependente de PTH-rP em células de osteosarcoma de rato. O PSA maduro, cataliticamente ativo, é uma cadeia polipeptídica única

de 237 aminoácidos e massa molecular de 26kDa, originando-se de uma molécula precursora contendo 24 aminoácidos a mais na extremidade amino terminal da molécula madura.

No fluído seminal 1/3 do PSA é desprovido de atividade enzimática em vista da clivagem da molécula; os 2/3 remanescentes constituem-se de PSA enzimaticamente ativo.

No líquido seminal o PSA encontra-se predominantemente na forma livre, estando apenas 1 a 2% complexado com inibidores de protease como a alfa-1-antiquimiotripsina (ACT), e o inibidor da proteína C. O epitélio prostático nos dutos glandulares, secreta PSA e é efetivo no sequestro da enzima, impedindo assim, escape da protease para a circulação geral, de modo que a razão entre o PSA no líquido seminal e no soro é da ordem de 10<sup>6</sup>.

No soro o PSA é encontrado nas formas livre e complexada com ACT. Cerca de 90% do PSA no soro encontra-se complexada com a ACT, estando na forma livre os 10% restantes. A meia vida do PSA total imunoreativo é semelhante à meia vida da fração complexada a ACT (PSA-ACT), em torno de 2 a 3 dias na circulação. Esta lenta eliminação deve-se ao tamanho da molécula (90kDa para o PSA-ACT), grande demais para permitir eliminação por filtração glomerular. Já a fração livre do PSA (~30kDa) no soro, tem meia vida de menos de 2 horas, compatível com filtração glomerular, ou possível eliminação via formação de complexo com alfa-2-macroglobulina (A2M), não mensurável, em vista do encapsulamento do PSA por esta globulina, com perda de seus epítopos. Este complexo do PSA-A2M é clareado (retirado) da circulação através de receptor específico, envolvido no "clearance" de complexos protease-inibidor de protease, em células tumorais. Demonstrou-se recentemente, que a atividade deste receptor é menor em sub- clones invasivos de células de câncer de próstata, quando comparados com clones não invasivos. É possível que isto possa contribuir para as diferenças nos níveis de PSA-livre e PSA-complexado, entre pacientes com hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata.

## **Recentes Avanços**

O PSA tem sido usado como marcador para o câncer de próstata já há 10 anos, não somente como ferramenta para o diagnóstico, mas também para monitorizar pacientes durante o tratamento. O maior problema é a diferenciação entre pacientes com câncer e pacientes com hiperplasia benigna da próstata, desde que também, esta última condição é acompanhada por aumento dos níveis séricos de PSA. A publicação de vários relatos descrevendo maior razão entre complexos PSA-ACT e PSA total no soro de pacientes com câncer, em relação aos pacientes com hiperplasia benigna, tem facilitado o diagnóstico diferencial.

A prevalência de câncer em próstatas obtidas de necrópsias ou excisadas cirurgicamente, por motivos outros que não o câncer, é da ordem de 33 a 38%. Calcula-se que se todos os cânceres latentes fossem diagnosticados pelo rastreamento e tratados por prostatectomia radical (que tem mortalidade de 1%), o efeito líquido sobre a sobrevivência seria negativo. A maioria dos cânceres latentes, entretanto, são menores que 0,2 cm<sup>3</sup>, e apenas os tumores com mais de 10 cm<sup>3</sup> são capazes de aumentar o PSA sérico. A produção de PSA é diretamente proporcional a massa tumoral. Por sua vez, quanto maior a massa tumoral, maior a chance de extensão extra-prostática da doença. Levando-se em consideração que 38% do PSA é perdido com a estocagem, o ponto de corte em 3 a 4 ug/L pode não espelhar realmente o nível de PSA circulante. Analisando-se as probabilidades de doença restrita (confinada) à glândula, tendo como base os níveis de PSA circulante, vemos que esta probabilidade é apenas de 40% quando o PSA está acima de 10 ug/L, de 75% quando o PSA está na faixa de 4 a 10 ug/L e de 100% quando o PSA é menor que 4 ug/L. Sabemos que a curva do câncer de próstata é factível quando a doença está confinada à glândula; assim, as chances de cura são maiores quando o PSA é baixo. Um ponto de corte baixo torna o método do PSA altamente sensível, porém pouco específico. A especificidade pode melhorar pelo rastreamento de homens abaixo de 65 anos e pela medida do PSA-ACT/PSA total. A exatidão da dosagem de PSA em homens abaixo de 65 anos deve-se, principalmente, aos menores valores de

referência para este grupo do que para os grupos mais velhos. Assim, valores de referência mais baixos, poderiam ser usados para melhorar a especificidade. Desde que o PSA sérico aumenta com a idade, tem sido sugerido que valores de referência relacionados com a idade deveriam ser usados, ao invés de se usar 4,0 ug/L como valor de referência para todas as faixas etárias.

Cerca de 70% dos pacientes com câncer de próstata, identificados pelo toque retal, ultrassonografia transretal ou biopsia por agulha, têm concentração de PSA acima dos valores de corte geralmente usados (3 a 4 ug/L). Dos valores anormais de PSA, cerca de 70 a 80% são falso-positivo; apenas um em cada quatro homens com PSA acima de 4 ug/L terá câncer de próstata. Os cânceres considerados confinados à glândula são tratados com prostatectomia radical. O exame histopatológico do material excisado cirurgicamente evidencia doença extracapsular em 63%, e cerca de 20% destes cânceres progredirão dentro de 10 anos. Vemos assim, que a dosagem de PSA como vinha sendo realizada, levando em consideração a dosagem do PSA total apenas, está sujeita à um inaceitável percentual de falso-positivos, sendo portanto, pouco específica. Este fato conduz a grandes gastos com procedimentos diagnósticos na área de saúde, além de ser motivo de ansiedade, não só para o profissional da saúde, mas também para o paciente. Em resumo, discrepância entre achados de doenças extracapsulares, em próstatas excisadas, com prévio diagnóstico de doença localizada, fizeram crer que parâmetros mais seguros eram necessários. O exame dígito-retal, a ultrassonografia prostática e as dosagens de PSA total, ferramentas tão utilizadas, não são mais suficientes para o diagnóstico diferencial de câncer de próstata, em homens com hipertrofia prostática benigna. Pacientes portadores de patologias benignas apresentam maior proporção de *forma livre do PSA* em relação ao *PSA total*. Por sua vez, pacientes portadores de câncer de próstata apresentam maiores proporções da forma do PSA complexado a ACT (PSA-ACT) em relação ao total. A razão PSA-ACT/PSA total, é maior no câncer de próstata do que na hiperplasia benigna prostática. Medidas desta razão reduzem o número de falso-positivo para câncer de próstata em populações selecionadas de homens, como por exemplo grupos divididos com relação à faixa etária.

O ensaio disponível no Bioanálises Apoio, baseia-se na detecção por técnica fluorimométrica, no qual três anticorpos monoclonais são utilizados. Em uma primeira etapa os controles e as amostras dos pacientes (que contém as formas de PSA livre e complexada) são incubadas na presença de um anticorpo direcionado ao segmento da molécula presente em ambas as formas de PSA.

Anticorpos, marcados com Európio, dirigidos contra um segmento da molécula de PSA que está exposta apenas no PSA livre, são acrescentadas ao ambiente de reação.

Simultaneamente, outros anticorpos, marcados com Samário, dirigidos contra um ponto antigênico comum tanto ao PSA livre como ao complexado, são acrescentados à reação.

A emissão fluorescente advinda do Európio é proporcional ao PSA livre e aquela proveniente do Samário será proporcional à concentração total do PSA livre e complexado.

Concluindo, podemos dizer que agora, a medida do PSA atenderá à duas diferentes necessidades. Num primeiro tempo, a dosagem do PSA atenderia o desejo de se conhecer o estado geral da próstata, ou se há suspeita de câncer prostático. Posteriormente, esse sistema também estaria servindo para seguimento ou monitorização de tratamento de pacientes com câncer de próstata.

Do exposto até então, entendemos que é excepcional o diagnóstico de câncer de próstata quando a concentração sérica de PSA está abaixo de 4 ug/L, sendo porém comum quando um nível deste marcador está acima de 10 ug/L. Assim, o problema diagnóstico maior é quando a concentração do marcador encontra-se dentro da faixa de 4 a 10 ug/L. Luderer e colaboradores, plotando as proporções da fração livre contra vários níveis de PSA total obtidos num estudo envolvendo 181 homens com idade variando entre 50 e 75 anos (sendo 55

portadores de câncer de próstata, confirmados por histopatologia, 62 com hipertrofia benigna de próstata e 64 homens normais) construíram uma curva teórica de distribuição que correlaciona muito bem estas duas medidas. Nesta curva podemos observar que a proporção de PSA livre em relação ao total (isto é,  $\text{PSA livre} \times 100 / \text{PSA total}$ ) de 20% é o melhor valor possível de ser estabelecido como cut-off para este parâmetro. Isto significa que é improvável o diagnóstico de câncer com proporções de PSA livre superiores a este valor. Neste estudo todos os casos de câncer tinham proporção de PSA livre inferiores à 20%.

Concluindo, este estudo nos mostra que pacientes com níveis de PSA entre 4 a 10 ug/L serão beneficiados com a verificação da proporção de PSA livre em relação ao total.

grafico

### Valores de Referência do PSA

Um ponto muito importante na discussão a respeito dos valores de referência do PSA, é o fato que estes valores ainda estão sendo estabelecidos nos vários Centros de Onco-Urologia mundo a fora, não existindo consenso entre os envolvidos quanto aos valores obtidos em diferentes populações, faixas etárias, etc.

Embora a maior parte dos estudos tenham como preocupação a determinação da presença de tumor restrito à glândula prostática, vários autores demonstraram uma possível discrepância entre os níveis de PSA e a biologia da célula tumoral propriamente dita. Além disso, nunca foram estabelecidos critérios uniformes para cada núcleo populacional, fato que não contribui para a implantação “universal” de valores de referência.

Os valores que são apresentados abaixo representam a redução a grandezas estatísticas que se aplicam a uma população aparentemente sadia (572) com idade entre 20 e 60 anos cujo volume prostático não excedia 40 mL. As “medidas de corte” (cut-off) são os valores a partir dos quais o risco para o câncer “insitu” é maior.

São eles:

#### Limite de Referência (97,5%)

#### Intervalo de Confiança

PSA Livre: Até 0,72 mg/L

0,63 a 0,88 m g/L

PSA Total: Até 4,0 m g/L

3,20 a 5,20 m g/L

Limites superiores de normalidade para o PSA Total e Livre agrupados em faixa etária decenal e por decentis:

IDADE	40 a 49 anos				50 a 59 anos			
	25	50	75	95	25	50	75	95
Percentil								
PSA Livre ( m g/L)	0,15	0,21	0,28	0,5	0,17	0,26	0,34	0,70

<b>PSA Total ( m g/L)</b>	0,49	0,65	0,93	2,0	0,54	0,85	1,23	3,0
---------------------------	------	------	------	-----	------	------	------	-----

IDADE	60 a 69 anos				70 a 79 anos			
	25	50	75	95	25	50	75	95
<b>PSA Livre ( m g/L)</b>	0,24	0,38	0,62	1,0	0,28	0,46	0,77	1,2
<b>PSA Total ( m g/L)</b>	0,80	1,39	2,75	4,0	0,90	1,64	2,68	5,5

O quadro acima apresenta os resultados de um estudo mais amplo envolvendo 422 homens saudáveis com idades entre 40 e 79 anos. Os valores encontrados foram analisados estatisticamente e classificados conforme o percentil de distribuição em cada década de vida, servindo como referência da evolução do PSA total e livre.

## Disposições Finais

O lab São camilo, sempre com o intuito de proporcionar o que há de mais avançado e adequado à cada análise que realiza, disponibiliza à nossos parceiros, para as análises de PSA e de diversos outros marcadores tumorais, a melhor metodologia disponível hoje no mercado diagnóstico, o TRACE – Time Resolved Amplificade Criptate Emission, com leitura fluorimunométrica, brevemente descrita anteriormente no subtítulo Recentes Avanços, metodologia esta, desenvolvida pelo físico Jean Marie Lehn, Premio Nobel em 1986, devidamente automatizada em um equipamento de nome Kriptor, comercializada por uma empresa francesa chamada CIS-BIO International, adquirida recentemente pela Schering Laboratories.