



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO
INTEGRADO EM MEDICINA**

[ANA BEATRIZ PEREIRA FIGUEIREDO]

**[PSA E NOVOS MARCADORES NO
DIAGNÓSTICO DE CARCINOMA DA PRÓSTATA]
[ARTIGO DE REVISÃO]**

ÁREA CIENTÍFICA DE UROLOGIA

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:
PROFESSOR DOUTOR ALFREDO JOSÉ FÂNZERES MOTA
DR. PEDRO TIAGO COELHO NUNES**

MARÇO 2012

**PSA E NOVOS MARCADORES NO
DIAGNÓSTICO DE CARCINOMA DA PRÓSTATA
ARTIGO DE REVISÃO**

Ana Beatriz Pereira Figueiredo¹

¹Aluna da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 4 |
| LISTA DE IMAGENS E TABELAS..... | 5 |
| RESUMO | 6 |
| ABSTRACT..... | 7 |
| I – INTRODUÇÃO..... | 8 |
| OBJETIVOS:..... | 14 |
| II – MATERIAIS E MÉTODOS..... | 15 |
| III – DESENVOLVIMENTO / RESULTADOS | 17 |
| ANTIGÉNIO ESPECÍFICO DA PRÓSTATA (PSA OU hK3)..... | 17 |
| CALICREÍNA GLANDULAR HUMANA 2 E 4 (hK2 E hK4) | 29 |
| ANTIGÉNIO CANCRO DA PRÓSTATA 3 (PCA3) | 34 |
| ANTIGÉNIO PRECOCE CANCRO DA PRÓSTATA (EPCA)..... | 40 |
| ALFA-METILACIL-COA RACEMASE (AMACR) | 43 |
| GENES DE FUSÃO..... | 47 |
| IV – DISCUSSÃO..... | 52 |
| AGRADECIMENTOS | 57 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 58 |

LISTA DE ABREVIATURAS

CAP – Carcinoma da Próstata

HBP – Hipertrofia Benigna da Próstata

PSA – *Prostate specific antigen* - Antígeno Específico da Próstata

VP SA – *Velocity of prostate specific antigen* - Velocidade do Antígeno Específico da Próstata

PCA3 – *Prostate cancer antigen* - Antígeno Cancro da Próstata

KLK – *Human kallikrein* - Calicreína humana

hK2 - *Human glandular kallikrein* – Calicreína humana glandular

PAR-1 – *Protease-activator receptor-1* - Recetor ativado protease-1

EPCA – *Early prostate cancer antigen* - Antígeno Precoce Cancro da Próstata

AMACR – *α -Methyl acyl-CoA Racemase* – Alfa-metilacil-coARacemase

PIN – *Prostate intraepithelial neoplasia* - Neoplasia Intraepitelial Prostática

PIA – *Proliferative inflammatory atrophy* - Atrofia Inflamatória Proliferativa

ERG – *Ets-related gene*

ETV1- *Ets translocation variant 1*

LISTA DE IMAGENS E TABELAS

| | |
|---|----|
| 1. Taxas de Mortalidade por CAP em homens dos EUA entre 1930 e 2005 | 7 |
| 2. Taxas de Incidência e Mortalidade por CAP em Portugal em 2008 | 7 |
| 3. Próstata com vesículas seminais e canais deferentes, vista da frente e de cima | 8 |
| 4. Zonas da próstata..... | 9 |
| 5. Graus de Gleason | 10 |
| 6. Diagnóstico precoce do CAP | 11 |
| 7. Estadiamento e atitudes pós-tratamento do CAP | 13 |
| 8. Mortalidade associada ao CAP nos EUA entre 1975 e 2005 | 17 |
| 9. Relação entre PSA e a prevalência de CAP e CAP de alto grau..... | 19 |
| 10. Algoritmo para diagnóstico de CAP | 19 |
| 11. Sensibilidade e Especificidade associada a cada <i>cut-off</i> PSA..... | 20 |
| 12. Valores de referência para o PSA ajustado à idade..... | 26 |
| 13. Diagnóstico precoce CAP com PSA, PSA livre e hK2..... | 31 |
| 14. Oportunidade de uso teste Progenza® PCA3 na prática clínica | 36 |
| 15. Fusão de genes ETS no CAP..... | 47 |
| 16. Marcadores biológicos no diagnóstico de CAP | 50 |

RESUMO

INTRODUÇÃO: A detecção precoce e o tratamento do carcinoma da próstata resulta numa sobeja diminuição da morbidade e mortalidade associada à doença e, por isso, é importante o desenvolvimento de novos testes capazes de diagnosticar esta neoplasia na sua fase inicial. Apesar do marcador PSA e do toque retal se manterem como ferramentas de base para o diagnóstico, vários estudos têm sido feitos para encontrar o marcador ideal para a prática clínica mais sensível e específico. Definimos como **OBJETIVOS** desta revisão a avaliação da utilidade do uso do antigénio específico da próstata e definir e caraterizar os novos marcadores laboratoriais no diagnóstico do Carcinoma da Próstata.

MATERIAIS E MÉTODOS: Pesquisa bibliográfica na base de dados MedLine usando como palavras-chave *prostate cancer*, *PSA* e *new serum biomarkers* para as datas entre 2001 e 2011. Foram escolhidas mais algumas publicações de revisão sobre este assunto com um recuo máximo de 20 anos.

DESENVOLVIMENTO/RESULTADOS: As várias publicações analisadas demonstram as limitações do uso generalizado do PSA no diagnóstico de neoplasia da próstata, e outras que avaliam a sensibilidade e especificidade associada especificamente aos marcadores escolhidos: antigénio carcinoma da próstata 3, calicreínas, antigénio precoce do carcinoma da próstata, α -metilacil CoA racemase e genes de fusão. Foi possível avaliar a sua utilidade atual e a sua aplicabilidade futura no diagnóstico e monitorização do carcinoma da próstata.

DISCUSSÃO: Não está provado que um só marcador seja suficiente para, isoladamente, diagnosticar com precisão o carcinoma da próstata. O antigénio específico da próstata continua a ser o marcador mais fiável para aplicação clínica; nenhum dos outros marcadores atuais conhecidos tem, para já, valor diagnóstico superior. No entanto, a sua aplicação em conjunto com o PSA pode ser uma mais-valia no diagnóstico do carcinoma da próstata.

PALAVRAS-CHAVE: Diagnóstico cancro próstata, PSA, KLK, PCA3, EPCA, genes fusão e AMACR.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The early detection and treatment of prostate cancer result in a significant decrease in disease-related morbidity and mortality and therefore it is imperative the development of assays capable of diagnosing cancer in an earlier state. Although elevated serum PSA and digital rectal exam remain the primary tools of diagnosis, various studies have been conducted in order to find new sensitive and specific markers useful in clinical practice.

OBJECTIVES: Review of the current utility of PSA and to define and characterize new biomarkers that might be used to diagnose prostate cancer.

METHODS: Medline research was done using the following terms: prostate cancer, *PSA* and *new serum biomarkers*, for dates between 2001 and 2011. Further studies were chosen on the basis of manual searches of reference lists and review papers.

RESULTS: Several assays and publication were used to study the limitations to general use of PSA to diagnose prostate cancer and to examine the sensibility and specificity of the following markers: prostate cancer antigen 3, kallikreins, early prostate cancer antigen, α -methylacyl CoA racemase and fusion genes. With that information, we were able to assess the utility and analyze how promising they might be in the future of prostate cancer diagnosis.

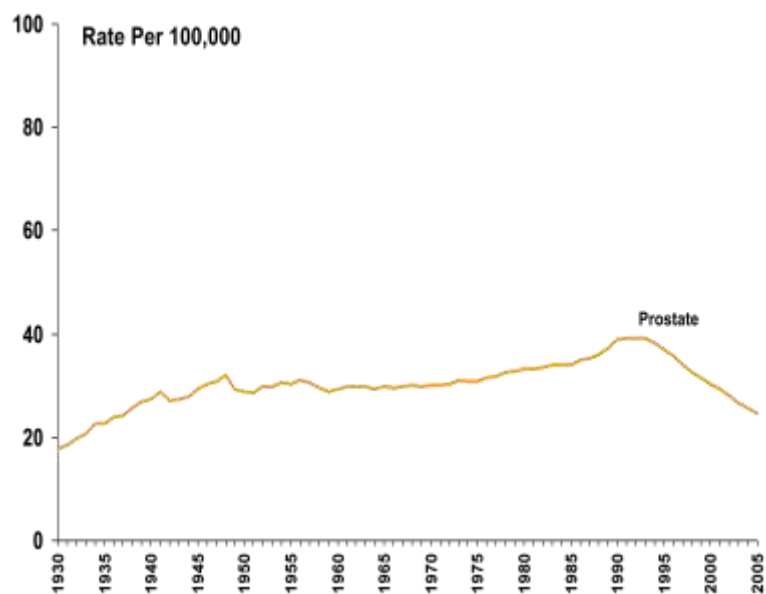
DISCUSSION: To present date, there is no precise evidence that allow us to assert that only one marker can be used to accurately screen prostate cancer, and none of the biomarkers analyzed supersede the clinical use of PSA. Nevertheless, their application along with the PSA can be a benefit for the diagnosis of prostate carcinoma.

KEYWORDS: Prostate cancer diagnosis, PSA, KLK, PCA3, EPCA, genes fusão e AMACR.

I – INTRODUÇÃO

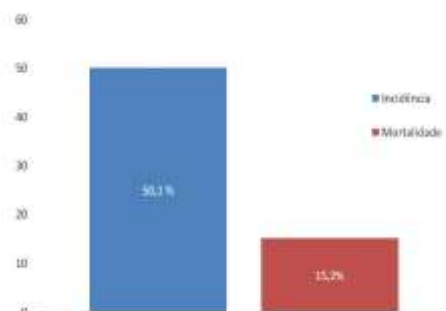
O Carcinoma da Próstata (CAP) é a neoplasia mais frequente em homens do mundo ocidental, sendo responsável por um quarto de todos os tumores nos homens Europeus e ocasionando cerca de 11% mortes nos países da União Europeia. Nos Estados Unidos da América, é diagnosticado um novo caso de CAP a cada três minutos e a cada quinze minutos morre um homem em resultado desta patologia [1]. O gráfico seguinte mostra a evolução das taxas de mortalidade por CAP

em homens Estados Unidos da América entre 1930 e 2005, segundo um estudo da *US Mortality Data 1960-2005, US Mortality Volumes 1930-1959, National Center for Health Statistics, Centers for Disease Control and Prevention, 2008*.



1. Taxas de Mortalidade por CAP em homens dos EUA entre 1930 e 2005

As taxas de mortalidade nos EUA aumentaram gradualmente desde 1976 até 1992, mas decresceram continuamente até 2005, justificado pela redução de doentes diagnosticados com doença em estado avançado.



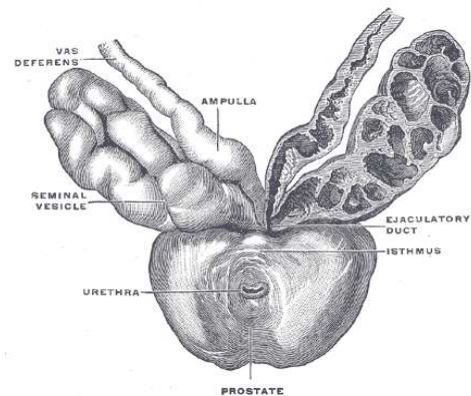
2. Taxas de Incidência e Mortalidade de CAP em Portugal em 2008

Em Portugal, o CAP é o carcinoma mais incidente nos homens e o terceiro com a maior taxa de mortalidade (depois do cancro do pulmão e do cancro colo-retal) [2].

O CAP raramente é diagnosticado em homens com menos de 40 anos de idade, sendo que a idade média no momento do diagnóstico é de 65 anos e a sua incidência aumenta com a idade, daí que em países com populações mais idosas, concretamente países mais desenvolvidos, esta neoplasia atinja os 15% de todos os tumores nos homens. Na Suécia, por exemplo, onde a esperança média de vida é elevada, este número sobe para 36,8%. Em contrapartida, em países em vias de desenvolvimento, este valor está muito reduzido, sendo em alguns casos de apenas 4% [1].

Está provado que existe um risco acrescido nos indivíduos de raça negra, não estando exatamente esclarecido se se trata de uma causa genética ou ambiental. Em aproximadamente 15% dos casos, existe uma história familiar de CAP, associada a presença dos genes p53 e bcl-2, E-caderina, c-erb-2, PTEN-1 e o gene de recetor de androgénios [1].

A próstata é uma glândula exócrina que faz parte do sistema reprodutor masculino e tem como função produzir e armazenar um fluido incolor e ligeiramente alcalino (pH 7.29), que constitui 10-30% do volume do líquido seminal e que, em conjunto com os espermatozoides, constitui o esperma [3]. Nas secreções prostáticas humanas, o conteúdo proteico é



3. Próstata com vesículas seminais e canais deferentes, vista da frente e de cima

menor que 1%, e inclui algumas enzimas proteolíticas e o PSA. A próstata é regulada pelos androgénios, principalmente pela testosterona, produzida pelos testículos (responsável pelo desenvolvimento dos caracteres masculinos). Uma próstata saudável é pouco maior que uma noz, e está circundada pelos músculos do pavimento pélvico que contraem durante a ejaculação.

A próstata possui quatro zonas distintas, como se pode ver pela tabela:

| | Percentagem, aprox. | Descrição |
|-------------------|----------------------------|--|
| Zona Periférica | Até 70% | Porção subcapsular posterior que envolve a uretra distal. Zona de origem de mais de 70% dos CAP. |
| Zona Central | 25% | Envolve os canais deferentes. Zona de origem de mais de 25% dos CAP. |
| Zona de transição | 5% | Raramente associada a CAP. Envolve a uretra proximal e é a zona que cresce durante toda a vida e responsável pela HBP. |
| Estroma | 5% | Isenta de componentes glandulares, composta por músculo e tecido fibroso. |

4. Zonas da próstata

O diagnóstico histológico de CAP é estabelecido através de um método minimamente invasivo: biópsia guiada por ecografia trans-retal. Atualmente, os indicadores para realização de biópsia são toque retal anormal ou PSA entre 2,6 e 4 ng/mL ou velocidade $PSA \geq 0.35$ ng/mL por ano [4]. Considera-se que um valor inferior a 4,0 ng/mL não merece consideração para execução de biópsia e que um valor de PSA superior a 10 ng/mL é francamente suspeito, considerando-se que um valor entre 4 e 10 se encontra na “zona cinzenta”. Além disso, o valor de PSA deve ser interpretado em função de outros parâmetros como a idade do doente, o volume prostático, a progressão do valor de PSA, a presença de alterações ao toque retal ou o resultado de biópsias anteriores.

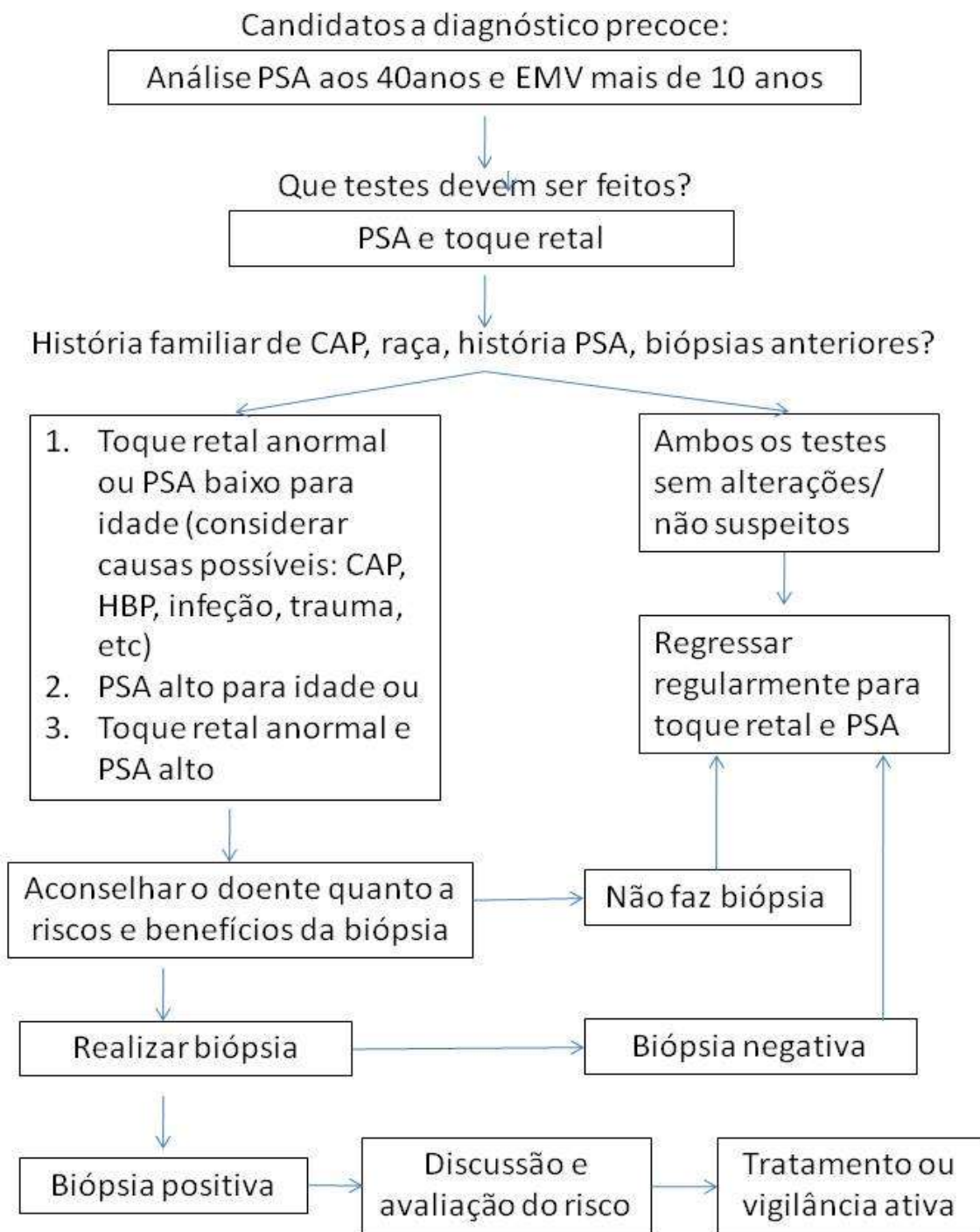
O toque retal é fundamental no exame objetivo, mas sendo um ato que desperta relutância em muitos doentes, acaba por ser um fator de atraso no diagnóstico de patologia prostática. Muitos homens preferem a realização de ecografia trans-retal, que é mais desconfortável e dispendiosa. O toque retal permite identificar características tais como: dimensões e volume aproximado, consistência, superfície, limites e existência de zonas suspeitas ou dolorosas. Apesar do toque retal só avaliar a face posterior da próstata, permite distinguir neoplasia de outras patologias prostáticas; por exemplo, zonas duras assimétricas,

irregulares ou heterogêneas, mal delimitadas e com sulco mediano não palpável, ou nódulos duros, são sugestivos de ser CAP. Quando há um aumento simétrico e firmeza da próstata a probabilidade é de se tratar de HBP. Um toque retal suspeito em homens com PSA até 2 ng/mL tem um valor preditivo positivo de CAP de 5-30% e apresenta uma sensibilidade de 59% e uma especificidade de 94% [5] [6].

O CAP pode ser classificado histologicamente através dos Graus de Gleason que quantifica o padrão predominante de 1 a 5 (tem que ser maior que 50% do padrão total contemplado na amostra) que representa a maioria do tumor, e o segundo padrão mais figurado entre 2 e 10 (tem que ser menos que 50% mas pelo menos 5% do padrão total observado), que representa a minoria do tumor, tendo esta classificação implicações prognósticas [7].

| Padrão | Características |
|---------------|--|
| 1 | As células cancerígenas são semelhantes ao tecido prostático normal. As glândulas são pequenas, bem formadas e compactas |
| 2 | O tecido mantém glândulas bem formadas mas estas são maiores e têm mais tecido prostático entre elas |
| 3 | O tecido mantém glândulas reconhecíveis mas as células são mais escuras. Numa maior ampliação, algumas células deixaram as glândulas e começaram a invadir o tecido envolvente |
| 4 | O tecido tem poucas glândulas reconhecíveis. Muitas células invadem o tecido envolvente |
| 5 | Não se reconhecem glândulas no tecido. Há, frequentemente, apenas lençóis de células no tecido envolvente |

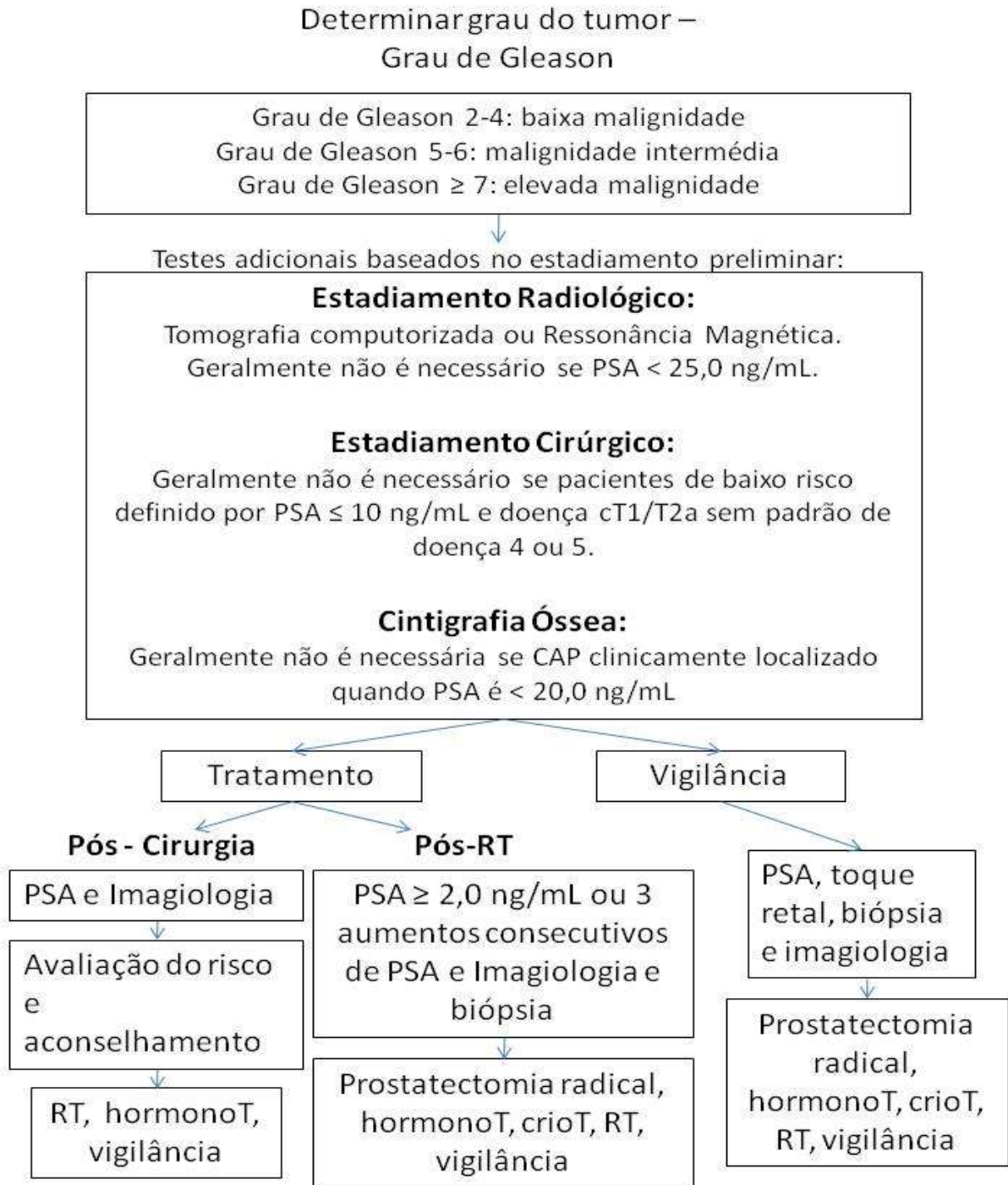
5. Graus de Gleason



6. Diagnóstico Precoce do CAP (EMV: esperança média de vida)

O esquema anterior, da imagem 6, destina-se a exemplificar como deve ser a abordagem para o diagnóstico precoce do CAP, segundo a *American Urology Association* [8].

O prognóstico num doente com CAP é influenciado pelo maior ou menor potencial de malignidade e pela terapêutica usada. Assim, em pacientes com esperança média de vida inferior a 10 anos e tumor com baixo grau de diferenciação, é preferível adotar uma abordagem conservadora. Os doentes mais jovens e saudáveis beneficiam da realização de prostatectomia radical, o tratamento *gold standard*, quando há indicação para tratamento agressivo, já que a taxa de progressão da neoplasia e possível formação de metástases diminui drasticamente. Após prostatectomia radical, o seguimento do doente deve ser feito através da medição dos níveis de PSA, pois um aumento de PSA no soro sanguíneo pode ser o primeiro indício de recidiva. Como complicações da cirurgia pode surgir disfunção erétil, incontinência urinária, hérnia inguinal e estenose da uretra. Como outras técnicas de tratamento temos a Radioterapia Externa, que pode ser útil em doentes que não podem ou recusam ser submetidos a cirurgia e útil em pacientes com CAP localizado. A Braquiterapia intersticial é atualmente uma das terapêuticas mais usadas no tratamento do CAP localizado, idealmente quando grau de Gleason ≤ 6 , PSA ≤ 10 , volume prostático igual a 50cc e o fluxo máximo maior que 11 nl/seg. [1]. A terapêutica médica hormonal não é curativa, mas há relatos de remissões completas a longo prazo; É usada em pacientes mais idosos e com co-morbilidades. No esquema apresentado pela imagem 7 (adaptado de [8]) está indicado qual a abordagem necessária para estadiar o CAP, e ainda quais as atitudes a serem tomadas, e como é feita a vigilância após instituição da terapêutica (hormonoterapia = hormonoT, radioterapia = RT, crioterapia = crioT).



7. Estadiamento e atitudes pós-tratamento do CAP

OBJETIVOS:

O objetivo principal deste estudo é efetuar uma revisão da literatura existente sobre a utilidade do PSA como marcador de diagnóstico do CAP e discutir outros marcadores laboratoriais no diagnóstico do CAP, nomeadamente, se apresentam ou não aplicabilidade na clínica atual.

II – MATERIAIS E MÉTODOS

Em Junho de 2011 fizemos uma pesquisa bibliográfica usando a base de dados da MEDLINE, dos últimos cinco anos, segundo as palavras-chave: *diagnosis prostatic cancer*, *sérum biomarkers* e *PSA*. Seleccionamos uma lista de artigos que nos pareceram mais interessantes para o trabalho através da leitura dos seus títulos e resumos, dando preferência a metanálises ou artigos de revisão.

Solicitei ao serviço de Documentação dos Hospitais da Universidade de Coimbra essa lista em formato digital ou em papel. Fizemos ainda uma pesquisa mais generalizada sobre os últimos 20 anos em artigos de revisão referenciados, em alguns livros de texto, na área de Urologia. Posteriormente, após definir quais os marcadores que iria abordar na minha tese, efetuámos pesquisas individuais para cada marcador, desde 2001 a 2011 com a seguinte pesquisa: *prostatic cancer* e *PCA3*, *AMACR*, *Kallikreins* ou *gene fusion*.

Critérios de inclusão:

- ⊙ Estudos com amostras significativas de estudos realizados na Europa ou Estados Unidos da América, em homens com idade superior a 40 anos;
- ⊙ Estudos sobre eficácia do doseamento do PSA sérico como teste diagnóstico de rastreio do CAP;
- ⊙ Estudos que comparassem o PSA com outros biomarcadores;
- ⊙ Estudos que abordassem as características específicas de cada marcador individualmente e quais os métodos de biologia molecular e bioquímica (ELISA, Northern Blot) usadas no seu doseamento (Calicreínas, PCA3, EPCA, AMACR e genes de fusão);
- ⊙ Estudos que comparassem a sensibilidade e especificidade dos diferentes marcadores consoante o grau histológico (grau de Gleason);

- ⊙ Estudos com elevado fator de impacto, citados várias vezes em publicações e livros de referência da área científica de Urologia.

Critérios de exclusão:

- ⊙ Estudos com amostras não-significativas realizados fora da Europa ou Estados Unidos da América;
- ⊙ Estudos que comparassem diferentes técnicas de diagnóstico imagiológico do CAP;
- ⊙ Estudos que relacionem doseamento de PSA com outras patologias prostáticas (HBP, prostatite);

Optei ainda por referenciar algumas *guidelines* ou recomendações de Associações Europeias ou Americanas, assim como dados estatísticos publicados em *sites* internacionais de referência. Usei ainda livros de referência na área da Urologia, em língua inglesa e portuguesa e na área da Medicina Interna.

III – DESENVOLVIMENTO / RESULTADOS

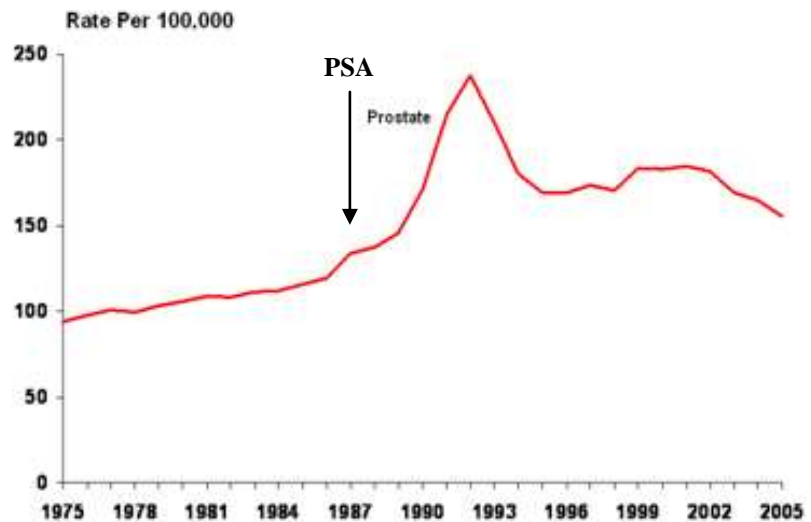
ANTIGÉNIO ESPECÍFICO DA PRÓSTATA (PSA OU HK3)

O marcador mais conhecido da família das caliceínas é o hK3, vulgarmente conhecido como PSA que foi descoberto no final da década de 70 do século passado.

O PSA é uma glicoproteína com função enzimática, uma serina protease produzida exclusivamente pelas células epiteliais da próstata, que tem como função a liquefação do líquido seminal [9]. Existe no soro num valor reduzido (medido em ng / mL) e qualquer alteração da arquitetura normal da próstata, quer seja um aumento benigno, inflamação ou trauma ou tumor, pode conduzir ao aumento na quantidade de PSA circulante ou seja o PSA é específico para a próstata, mas não para carcinoma da próstata [10]. No soro, o PSA circula em forma livre (inativo) e conjugado, preferencialmente ligado ou complexado às antiproteases como a ACT e as Macroglobulinas (MG).

PSA tem vindo a ser usado universalmente como marcador tumoral no diagnóstico inicial, na estratificação do risco, na monitorização da resposta à terapêutica e o seu valor permite distinguir entre

doença localizada e doença metastizada [10]. É um teste minimamente invasivo e exequível, de fácil acesso, com uma baixa taxa de falsos negativos e, como muitos defendem, tem um impacto importante na diminuição da mortalidade resultante do cancro da próstata [11].



8. Mortalidade associada ao CAP nos Estados Unidos da América entre 1975 e 2005

Em 1992, aproximadamente 5 anos após a introdução do PSA na prática clínica, a incidência do CAP atingiu o seu auge e decaiu vertiginosamente até 1995, aumentando outra

vez lentamente em 1995, numa inclinação semelhante à observada antes da era do PSA, e diminuindo novamente nos últimos anos, a partir de 2002, como é possível visualizar no gráfico ao lado adaptado da publicação de *Surveillance, Epidemiology and End Results Program, Delay adjusted Incidence database: SEER Incidence Delay-adjusted Rates (9 Registries, 1975-2005, National Cancer Institute, 2008)*. A diminuição na sua incidência entre 1992 e 1995 foi atribuída ao *cull effect*, verificando-se seguidamente um retorno à linha basal [12]. Nos últimos 20 anos houve um aumento da deteção de CAP no seu estadio inicial graças ao uso rotineiro do PSA, reduzindo drasticamente o número de pacientes diagnosticados numa fase avançada em que há invasão de tecidos adjacentes ou numa fase metastática.

Muitos autores acreditam que o uso do PSA tem levado ao diagnóstico e tratamento de várias neoplasias da próstata que não têm relevância clínica, que não constituem nenhuma ameaça para a saúde do doente [9]. Tem havido desacordo sobre qual o valor limiar de PSA indicado para a realização da biópsia.

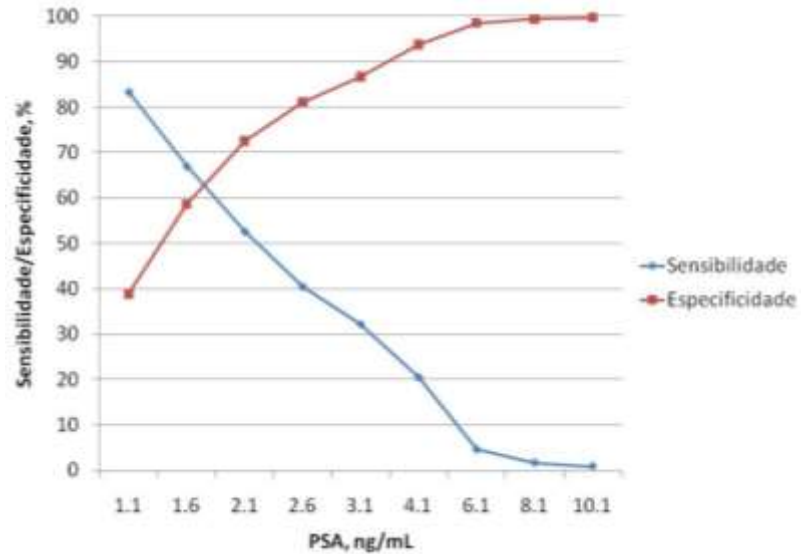
A *American Cancer Society* revê regularmente a literatura para avaliar a eficácia do marcador biológico PSA [13]. O *cut-off* tradicional para valor de PSA anormal é 4,0 ng/mL, a sensibilidade estimada é de 21% para deteção de qualquer tipo de CAP de 51% para detetar CAP de elevado grau de diferenciação (Gleason \geq 8); Já usando um *cut-off* de 3,0 ng/mL a sensibilidade aumenta para 21% e 68%, respetivamente. A especificidade estimada para *cut-off* de 4,0 ng/mL é de 91% e para um *cut-off* de 3,0 ng/mL é de 85%. No geral, o valor preditivo positivo para PSA > 4.0 ng/mL é aproximadamente 30%, o que significa que 1 em cada 3 homens com PSA elevado vai ter CAP confirmado por biopsia [14]. Para níveis de PSA entre 4.0 e 10.0 ng/mL, o valor preditivo positivo é cerca de 25% e aumenta para 42-64% se PSA > 10 ng/mL [15] [16]. O valor preditivo negativo para PSA \leq 4 ng/mL é de cerca de 85% [17]. Cerca de 75% dos CAP detetados com PSA situado na zona cinzenta, entre 4.0 e 10.0 ng/mL são confinados ao órgão e com bom prognóstico. A percentagem de CAP

confinado ao órgão com PSA acima de 10.0 ng/mL é menor que 50%, por isso, é que a detecção de CAP nestes homens é um desafio diagnóstico, com vista a evitar biópsias desnecessárias [15]. Um valor de 100 µg/L faz, inequivocamente, o diagnóstico de tumor, no entanto, encontrar-se-ão provavelmente sinais de metastização [18].

O gráfico 11, adaptado de [19],

11. Sensibilidade e Especificidade associada a cada cut-off PSA

mostra que o *cut-off* de 4,0 ng/mL usado para identificar homens em risco de CAP apresenta uma sensibilidade de aproximadamente 20% mas uma especificidade superior a 90%.

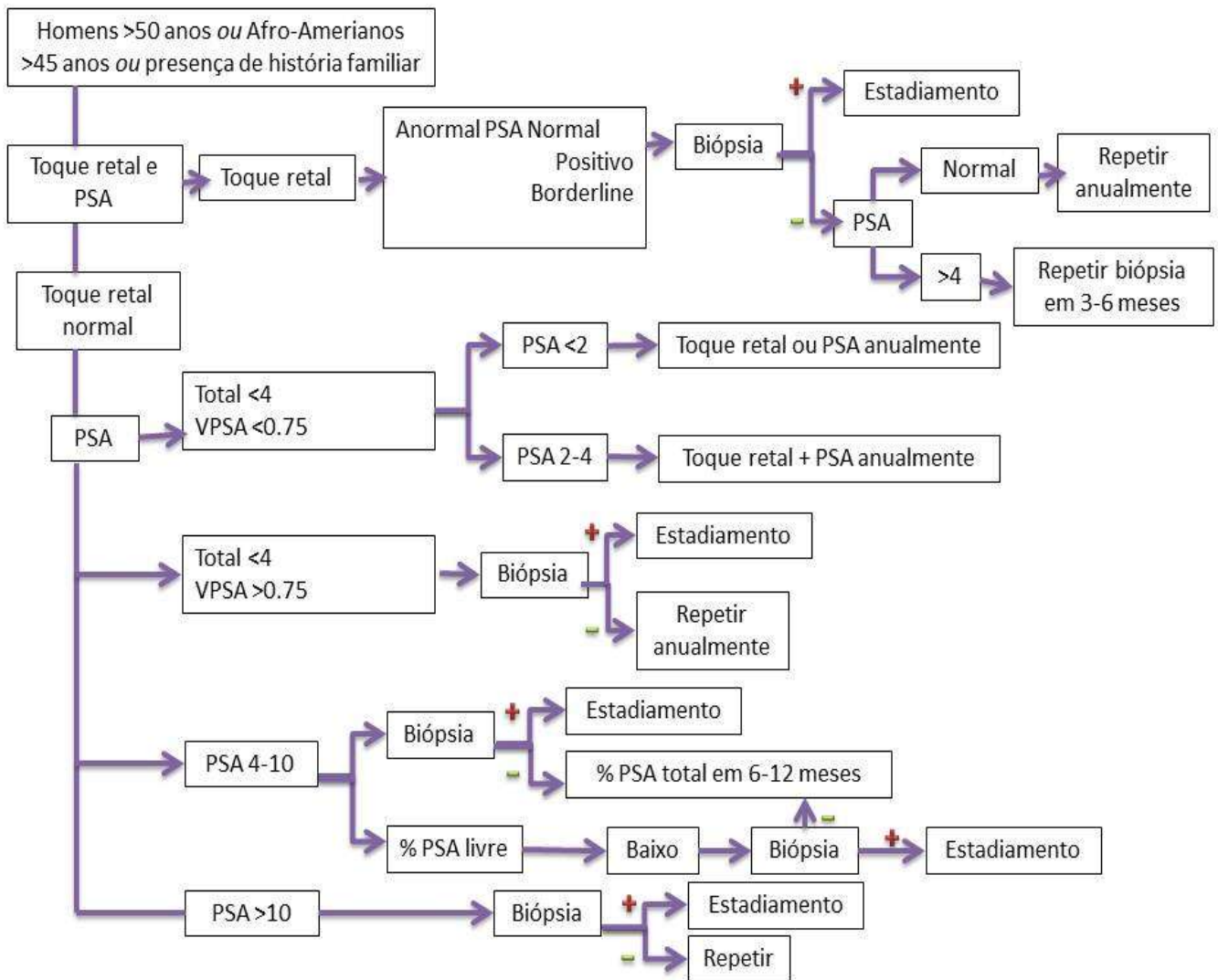


A tabela 9 mostra a relação entre os valores de PSA e qual a percentagem associada a CAP e a CAP de alto grau, ou seja, Grau de Gleason ≥ 7 [17].

| PSA (ng/mL) | Nr. Homens (N-2950) | Homens com CAP (N-449) | Homens com CAP Grau Gleason ≥ 7 (N-67) |
|-------------|---------------------|------------------------|---|
| 0-0,5 | 486 | 6,6% | 12,5% |
| 0,6-1 | 791 | 10,1% | 10,0% |
| 1,1-2 | 998 | 17,0% | 11,8% |
| 2,1-3 | 482 | 23,9% | 19,1% |
| 3,1-4 | 193 | 26,9% | 25,0% |

9. Relação entre PSA e a prevalência de CAP e CAP Alto Grau

O esquema 10 mostra o algoritmo para o diagnóstico de CAP baseado no toque retal e no PSA [20].



10. Algoritmo para diagnóstico de CAP (+ = positivo e - = negativo)

Em 2006, foi desenvolvido um método que calcula a probabilidade de existência de neoplasia através das variáveis PSA e toque retal que determina se a biópsia deve ser feita ou não. Este cálculo encontra-se disponível na Internet mas implica deteção PSA e realização de toque retal há menos de um ano [21].

LIMITAÇÕES

O PSA persiste com várias limitações e é necessário discernir se é um bom “aliado”, ou um “adversário”, no diagnóstico de CAP. A maioria do PSA produzido pela próstata é excretado pelo sémen mas uma pequena quantidade é libertada para a circulação e qualquer disfunção na arquitetura prostática (CAP, HBP, prostatite) pode elevar esse valor na circulação, o que leva a uma redução do uso do PSA como teste diagnóstico.

Níveis elevados de PSA podem indicar quais os pacientes que estão em maior risco de serem portadores de neoplasia assintomática limitada ao órgão, contudo, um único valor de PSA não indica com certeza se estamos na presença de neoplasia e, não devemos ignorar as implicações de um valor elevado de PSA, quando enquadrado num contexto clínico. Não há nenhum *cut-off* de PSA com sensibilidade e especificidade elevada simultaneamente e que todos os valores de PSA apresentados estão associados a algum risco de CAP.

O doente tem que compreender os benefícios e as consequências deste teste diagnóstico antes de aceitar realizá-lo. Face à suspeita de CAP, numa análise de PSA elevado torna-se imperativo a realização de biópsia eco-guiada trans-retal e a esse procedimento estão associados complicações como sangramento e infeção (em 1 a 4% dos casos). Posteriormente, se de facto se diagnosticar CAP, dependendo do tratamento escolhido, este pode resultar em incontinência e disfunção erétil, quando na realidade poderíamos estar perante uma lesão maligna, sem implicações diretas na saúde do doente.

Apesar de todos os estudos que tentam defender o uso de PSA, está provado que enquanto o risco de ser diagnosticado com CAP aumentou de 1 em 11 homens para 1 em 6 homens, o risco de morrer por CAP mantém-se de 1 em 34 homens, segundo dados do estudo *SEER Cancer Statistics Review* (período entre 1975-2004), publicado em 2007. O que prova que a taxa de mortalidade na população rastreada com PSA é semelhante à obtida na

população não rastreada, apesar de já vários estudos terem tentado comprovar, sem sucesso, que o rastreio por PSA diminuí a taxa de mortalidade de CAP.

O estudo da *European Random Study of screening for Prostate Cancer* (ERSPC) demonstra uma redução de 20% no risco relativo de morte associado a CAP nos homens entre os 55 e 69 anos, com diagnóstico precoce de CAP estabelecido com auxílio do PSA [22]. Vários estudos defendem que pacientes com CAP que têm, presumivelmente, um tumor de baixo risco, clinicamente insignificante, beneficiam de uma intervenção precoce; outros em que a vigilância pode ser uma opção alternativa pertinente o resultado a longo prazo é semelhante. A dificuldade continua na definição dos critérios para prever baixo risco e doença confinada ao órgão, por isso é que, ainda não é possível selecionar quais os doentes que devem usufruir apenas de uma monitorização [23].

A deteção precoce de CAP pelo teste de PSA está associada a um número excessivo de diagnósticos e tratamentos e a este fenómeno chama-se sobrediagnóstico [24]. Os doentes com CAP clinicamente detetáveis são, aproximadamente, 80% sendo a avaliação feita pelo tamanho do tumor e pelo seu grau de Gleason, porém à autópsia, cerca de 30-45% homens que aos 50 anos morreram por outra causa que não CAP apresentam CAP, e este valor aumenta para 80% em homens com mais de 70 anos [25]. Um estudo que aplica simulações computadorizadas do modelo teste de PSA estima que 29% dos CAP diagnosticados em doentes caucasianos e 44% diagnosticados em doentes afro-americanos são sobrediagnosticados, e este valor de sobrediagnóstico aumenta para 50% em homens entre os 55 e os 67 anos, parecendo relacionar-se o aumento de casos sobrediagnosticado com o aumento da idade [26] [27] [28].

Atualmente, as recomendações para o uso do teste sanguíneo de PSA como meio de rastreio levantam muitas dúvidas por parte dos clínicos, especialmente porque os mesmos valores de PSA detetados no soro levam a planos de ação diferentes, daí a necessidade de

avaliar o paciente de acordo com a idade, raça, história familiar, medicação, esperança média de vida e volume prostático. A idade proposta para o diagnóstico precoce de CAP através do PSA são os 50 anos, exceto se o homem com co-morbilidades ou que possui uma esperança média de vida de mais de 10 anos [13]. O diagnóstico precoce CAP não é benéfico para homens com menos de 10 anos de esperança de vida devido ao curso indolente que é característico da doença.

Foram propostas algumas variações na avaliação do PSA para tornar este marcador um parâmetro mais sensível e específico de forma a indicar quais os homens com biópsia negativa que necessitam nova biópsia e, quando é que esta deve ser feita, entre eles referimos o PSA livre, PSA conjugado, densidade PSA, PSA ajustado à idade e velocidade de PSA.

PSA LIVRE E PSA CONJUGADO

A percentagem de PSA que circula no soro na forma conjugada é, aproximadamente, 70% e está ligado, maioritariamente, a três proteínas: a α 1-antitripsina (ACT), a α 2macroglobulina (A2M), e o inibidor da alfa 1 proteinase (API), sendo a concentração maior a do PSA-ACT imunoreativo. O PSA conjugado apresenta especificidade elevada quando comparado com PSA total, e especificidade comparável com PSA livre no diagnóstico de CAP.

Cerca de 30% do PSA existe como PSA livre, sendo essa percentagem significativamente mais pequena em pacientes com CAP não tratado do que em pacientes com HBP ($p < 0.0001$). Esta variação é devido a diferente expressão das isoformas de PSA na zona de transição, zona de HBP quando comparado com a zona periférica, onde se desenvolvem grande parte dos tumores [29]. Sabemos que o PSA produzido pelas células malignas parece escapar ao processamento proteolítico e, por isso, os homens com CAP têm, no soro, uma maior parte de PSA complexado com ACT, aproximadamente 30 kDa, e uma

menor percentagem de PSA livre, em comparação com os homens saudáveis [29]. A aplicação clínica da percentagem de PSA livre pode auxiliar o médico quanto ao risco de neoplasia, e à necessidade de uma avaliação mais rigorosa, em homens com PSA entre 4 e 10 ng / mL [10] [30]. O PSA livre varia ainda diretamente com a idade, mas não com a raça ou com o efeito de inibidores, como a 5 α -redutase. Foi demonstrado que para homens com PSA elevado entre 4 e 10 ng/mL, glândula prostática palpável e PSA livre com um *cut-off* de 25% a sensibilidade é de até 95% homens com CAP, evitando a realização de até 20% de biópsias. A densidade do PSA parece ter especificidade similar à do PSA livre, mas para calcular a densidade de PSA é necessária a realização de ecografia trans-retal.

Um estudo que comparou a especificidade das diversas variações de PSA conclui que a razão PSA livre/PSA total e o PSA complexado isoladamente apresentavam uma especificidade de 15,6% e 26,7%, respetivamente, para *cut-offs* de 95% de sensibilidade, provando assim que o PSA complexado, apresenta vantagens sobre o PSA total ou sobre a razão PSA livre/PSA total e, dispensa uma segunda determinação analítica o que é uma vantagem económica [31].

Segundo as Guidelines de Utilização do PSA segundo a *European Association of Urology*, de 2011, a decisão de realizar o teste PSA deve ser partilhada entre paciente e o seu médico, ponderando as suas vantagens e desvantagens. O resultado da determinação do PSA em homens com 40 anos pode ajudar a definir qual deverá ser o intervalo das pesquisas de PSA subsequentes, para $PSA \leq 1$ ng/mL admite-se que o intervalo de 8 anos é suficiente, e esta determinação deve cessar em homens com mais de 75 anos e $PSA \leq 3$ ng/mL, devido ao seu baixo risco de morrer por CAP [5].

DENSIDADE DO PSA

A densidade do PSA é um ajuste do nível de PSA em relação ao volume total da próstata, obrigando a ecografia trans-retal, e calcula-se dividindo o valor de PSA no soro pelo volume da próstata ou pelo volume da zona de transição. Este parâmetro foi criado porque é extremamente difícil distinguir nos homens que têm valores elevados de PSA se é consequência da HBP ou do CAP e, uma vez que a HBP é bastante frequente e resulta num aumento do órgão, esta avaliação imagiológica complementar, permite ajustar o valor do PSA obtido, aumentando a sua especificidade e potencialmente diminuindo o número de biópsias desnecessárias. Um valor *cut-off* de densidade do PSA $\geq 0,15\text{ng/mL/cm}^3$ só consegue detetar 50% dos CAP em homens com toque retal sem alterações e PSA entre 4 e 10 ng/mL [32]. A densidade de PSA também pode estar relacionada diretamente com a agressividade do tumor. É possível também fazer o cálculo do PSA ajustado ao volume da zona de transição, a zona que contribuiu para a maioria do aumento de PSA na circulação em homens que não apresentam carcinoma da próstata, sendo um parâmetro muito sensível para diagnosticar CAP. O PSA livre, o PSA complexado e a densidade do PSA podem ser usados em conjunto para aumentar a especificidade no diagnóstico de CAP e, são úteis especialmente para a estratificação do risco e para o aconselhamento de homens com PSA entre 4 e 10 ng/mL quanto à realização ou não de biópsia, ou na repetição desta se o PSA permanece elevado [33].

O cálculo da densidade PSA exige medição do volume prostático através de ecografia trans-retal (ou de ressonância magnética), o que comporta custos e é uma estimativa de difícil obtenção e de reprodução inter-observador [34]. Mesmo entre médicos com muita experiência no cálculo da densidade PSA guiado por ecografia trans-retal, este método está vulnerável a variações intra-observador, contudo esta variação pode não ser suficiente para afetar a vigilância ativa do CAP [35].

PSA AJUSTADO À IDADE

Como o PSA aumenta com a idade, foram estabelecidos valores-padrão específicos para cada idade para reduzir o número de biópsias em idosos e aumentar a sensibilidade nos homens mais jovens. Na tabela 12 podemos visualizar quais os valores de referência para o PSA ajustado à idade, de acordo com as várias raças [36].

| Idade | Asio-americanos | Afro-americanos | Caucasianos |
|-------------------|------------------------|------------------------|--------------------|
| 40-49 anos | 0-2.0 | 0-2.0 | 0-2.5 |
| 50-59 anos | 0-3.0 | 0-4.0 | 0-3.5 |
| 60-69 anos | 0-4.0 | 0-4.5 | 0-4.5 |
| 70-79 anos | 0-5.0 | 0-5.5 | 0-6.5 |

12. Valores de Referência para o PSA ajustado à idade (em ng/mL)

Se usarmos o PSA ajustado à idade, estamos a diminuir as biópsias nos homens mais idosos, mas a aumentá-las nos homens mais novos.

VELOCIDADE DO PSA (VPSA)

Esporadicamente, podem ocorrer oscilações no valor de PSA em homens com ou sem CAP, devido a variações fisiológicas do organismo, logo, outra medida vantajosa é avaliar o PSA ao longo do tempo, ou velocidade de PSA, utilizando três valores obtidos nos últimos 18 meses [8]. Designa-se por velocidade do PSA a evolução no tempo do valor de PSA, ou seja, o PSA é corrigido no intervalo de tempo das medições. Em doentes com PSA entre 4 e 10 ng/mL e velocidade de PSA igual ou superior a 0,75ng/mL/ano, pode-se fazer o diagnóstico de CAP; por outro lado, para PSA inferior a 4 e VPSA igual ou superior a 0,35ng/mL/ano a mortalidade aos 25 anos é significativamente superior. Não foi demonstrado que a VPSA seja um bom marcador de prognóstico do resultado da terapêutica, quando adicionado apenas ao

PSA [37]. Outros estudos revelaram que homens com CAP têm uma elevação no PSA mais súbita que homens sem CAP. Não foi provado que a VPSA antevêja quais os homens que, no futuro, vão desenvolver CAP, nem que esta seja uma medida que quando comparada com o PSA, isoladamente, tenha mais sensibilidade ou especificidade, mas a cinética do PSA pode ser uma ferramenta relevante para detetar doentes com maior risco de mortalidade por CAP, assim como, auxilia na vigilância ativa da progressão do tumor [33] [38]. Não foi provado que o VPSA elevado deva ser uma recomendação para execução de biópsia, na ausência de outros parâmetros alterados e, por isso, há mesmo quem sugira a exclusão deste parâmetro da prática clínica [39].

ISOFORMAS DO PSA

Atualmente, várias pesquisas têm surgido sobre a utilidade de outras isoformas do PSA, como o proPSA e o BPSA para averiguar se estes parâmetros isoladamente ou em conjunto podem aumentar a exatidão do diagnóstico precoce de CAP [33]. O PSA é secretado pelo epitélio luminal da glândula prostática num precursor sob a forma de pPSA ou proPSA. O PSA livre ativo pode ser clivado para as formas inativas BPSA ou PSA intacto, formas não complexadas e estão presentes, preferencialmente, no tecido nodular da zona de transição, podendo ser considerado indicadores da presença de HBP. Estudos recentes foram elaborados para estabelecer o uso clínico do pPSA no diagnóstico precoce de tumores. O pPSA pode melhorar a identificação de CAP quando o PSA se situa entre 2 a 10 ng/mL [11].

CALICREÍNA GLANDULAR HUMANA 2 E 4 (hK2 E hK4)

A calicreína humana 3 (hK3), vulgo PSA, e a calicreína 2 (hK2) são serina-proteases, pertencem à família das calicreínas tecidulares e, são reguladas por androgénios e secretadas pelas células epiteliais glandulares da próstata para o líquido seminal para ajudarem na liquefação do líquido ejaculado [40]. O gene regulador KLK2 e o KLK3 estão localizados no cromossoma 19q e, entre muitas semelhanças, são homólogos em 80% dos aminoácidos constituintes; apresentam especificidade semelhante para a próstata. Devido às suas propriedades, a calicreína humana 2 pode ser útil no diagnóstico de CAP e no seu estadiamento, sendo que corresponde a 1% da concentração de PSA no plasma seminal e a sua função principal de precursor enzimático é dividir o zimogénio pró-PSA inativo, resultando na libertação de enzimas ativas. O hK2 tem especificidade para tripsinas-*like* e cinde o fator de crescimento insulina-*like* ligado às proteínas e o ativador do plasminogénio urocinase-*like*, o que pode condicionar a progressão dos tumores [40].

Segundo um estudo Europeu aleatório feito em 2010 para deteção de CAP, um conjunto de 4 calicreínas pode auxiliar na previsão do resultado numa biópsia inicial negativa, em pacientes com PSA elevado, usando um modelo estatístico como ferramenta de aconselhamento para realização de biópsia ou para a manutenção da vigilância [41]. Um estudo identificou um bloco haplótipo do gene KLK2 que está associado à presença de neoplasia e ao aumento da produção da sua protease (hK2), apontando para o estudo do gene KLK2, como forte candidato para diagnóstico de CAP [42].

Em praticamente todos os subgrupos analisados pelos testes de hK2, através de redes neurais artificiais (ANN), conclui-se que estes melhoram a acuidade do resultado da razão do PSA livre / PSA total, mas não da razão hK2 / (PSA livre / PSA total). Quando avaliados os resultados anteriores, com sensibilidades entre 90% a 95%, o hK2 por ANN tem uma ação notavelmente superior no ratio PSA livre / PSA total e é vantajoso, especialmente, para valores mais baixos de PSA [43].

hK2:

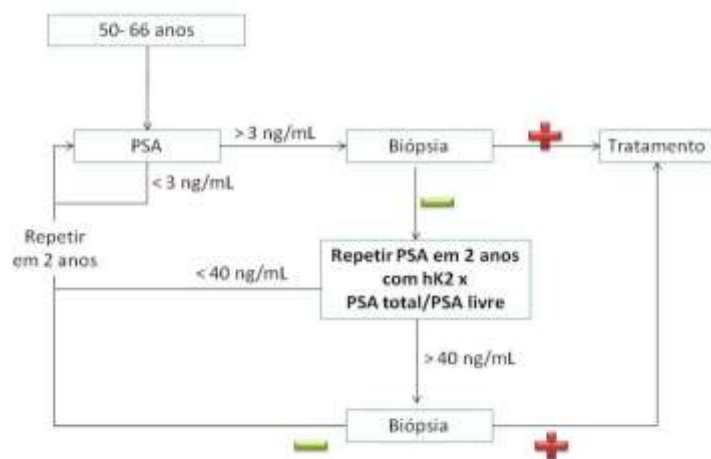
A expressão de hK2 está mais elevada em tecidos tumorais com baixo grau de diferenciação do que em tecido saudável ou benigno. A maioria da hK2 na corrente sanguínea está na forma livre, logo a capacidade para prever estadiamento ou grau é idêntica quando comparada a forma livre e a forma conjugada [44]. Há estudos que demonstram e caracterizam a produção e secreção endógena de PSA e hK2 pelas células PC-3 transferidas de forma estável através da cadeia longa AR cDNA. O hK2 parece, então estar correlacionado diretamente com o grau e volume do tumor e pode ser vantajoso em pacientes após diagnóstico de CAP [44]. Estudos recentes indicam que o uso do teste imunofluorométrico de alta sensibilidade (para pesquisar hK2 no soro) aumenta a especificidade quando usado juntamente com o PSA em distinguir homens com CAP dos afetados por outras patologias prostáticas. Vários autores provaram que a medição de hK2 no soro, juntamente com o valor de PSA e de PSA livre, aumenta a capacidade de diferenciar pacientes com HBP daqueles que têm CAP, sendo particularmente importante se o valor de PSA está situado entre 4 e 10 ng/mL.

A hK2 não antecipa o resultado do estadiamento, nem o grau do tumor, melhor que o PSA, mas as diferenças de concentração entre estes dois marcadores surgem em pontos diferentes da progressão da neoplasia, o que sugere que a expressão de hK2 segue um padrão diferente do PSA. Nem o doseamento do PSA total, nem o da hK2 total, podem ser usados para distinguir graus de Gleason diferentes em pacientes com CAP, mas sabemos que há um aumento significativo no PSA quando se trata de tumores com estadiamento entre T2b e T3a, enquanto, em relação ao hK2, este aumento é mais pronunciado entre os estadios T3a e T3b [44]. Alguns estudos provam que a análise de hK2 e o cálculo da densidade da hK2 podem, isoladamente, prever o estadiamento T2a do CAP e distinguir entre tumores G1-G2 e G3, no entanto não permite identificar patologia confinada ao órgão [45]. Em doentes que foram

submetidos a prostatectomia radical, o ratio entre hK2 e PSA livre / (PSA total x hK2) distingue entre tumores do T2a-b e T3a. O doseamento da hK2 no soro disponibiliza informação que pode contribuir para o prognóstico da doença, conjuntamente com outros parâmetros serológicos e pré-operatórios.

Contudo, há outros estudos que admitem que a hK2 não é diferente entre tumores T2 e T3, nem entre G2 ou G3, nem para graus de Gleason maiores ou menores que 7 [46]. A imagem 13 mostra o diagnóstico precoce do CAP, utilizando os parâmetros PSA, PSA livre e hK2 [47].

13. Diagnóstico precoce CAP com PSA, PSA livre e hK2



hK4:

Sabemos que o recetor ativado protease-1 (PAR-1) está localizado nas células do estroma peritumoral e que a caliceína humana 4 pode ser um potencial ativador do PAR-1 e PAR-2. Durante a progressão da doença, as células tumorais proliferam e invadem a membrana basal para o estroma, o que pode expor diretamente o PAR-1 e algumas proteases, como hK4 produzida pelo epitélio. O estroma prostático reativo é composto, maioritariamente por miofibroblastos, que têm um papel fundamental na regulação de atividades epiteliais através da expressão de componentes da matriz extracelular, tais como, proteases e fatores de crescimento parácrinos [48]. A expressão de PAR-1 no estroma reativo foi observado em tumores da mama e da próstata, mas a sua função celular ainda não foi esclarecida. No estágio

inicial do CAP, há uma regulação do PAR-1 mRNA, processo onde os androgénios estão envolvidos e, num estágio tardio, a proteína de crescimento inicial *response -1* (Erg-1) tem um papel importante na resistência do tumor à hormonoterapia. Funcionalmente, as caliceínas humanas surgem como possível ativador do PAR devido à sua atividade tripsina-*like*, sendo que a KLK4 ativa PARs como PAR-2 ativador KLK2 e TMPRSS2, enquanto o PSA (KLK3) não ativa as PARs, pois a sua atividade é quimotripsina-*like*. A caliceína 4 ativa o ativador plasminogénio urokinase-tipo (uPA) que se liga aos recetores da superfície celular (uPAR) e converte o plasminogénio em plasmina, desencadeando a degradação das células musculares lisas e a libertação de fatores de crescimento. O PAR-1 medeia a interação entre as células do estroma e as células epiteliais tumorais e que o abundante fator epitelial KLK4 que inicia essa interação [48]. Assim, esta dupla interação parácrina desenha um processo cíclico que conduz as células tumorais a uma proliferação progressiva e andrógeno-independente, com invasão local e metástases distantes e, por isso, poderá ser investigado um método para interromper este ciclo, possibilitando uma nova terapêutica para CAP.

ANTIGÉNIO CANCRO DA PRÓSTATA 3 (PCA3)

O PCA3, antes denominado DD3, foi descoberto em 1999 usando a técnica de Northern Blot para comparar os níveis de mRNA expressado pelo tecido benigno e pelo tecido maligno [49]. Trata-se de um gene localizado no cromossoma 9q21-22, constituído por quatro exões com poliadenilação alternativa em três posições diferentes no exão quatro. Graças à clivagem alternativa, descobriu-se que o exão dois está ausente em 95% dos clones de cDNA analisados. Foi localizado no tecido prostático expressão da proteína DD3/PCA3 e esta foi detetada em 95% das amostras selecionadas, a partir de pacientes com CAP metastizado. Em 2002, foi desenvolvida a técnica de transcriptase reversa PCR, em tempo real (QRT-PCR) para PCA3, e foi comprovado que esta proteína tem um aumento de 66 vezes de recetores sensíveis nas células alvo em tecidos cancerígenos relativamente a tecidos de controlo. Outra propriedade interessante do PCA3 é ser detetado em amostras que contêm apenas 10% células neoplásicas, o que significa que é capaz de distinguir neoplasia numa amostra com grande quantidade de células normais. O mais interessante acerca deste marcador é que foi observado que os valores urinários de PCA3 não aumentam com o aumento do órgão só por si, mas sim, com o aumento do volume tumoral. O PCA3 também parece sofrer alterações consoante o *score* de Gleason associado ao tumor [49].

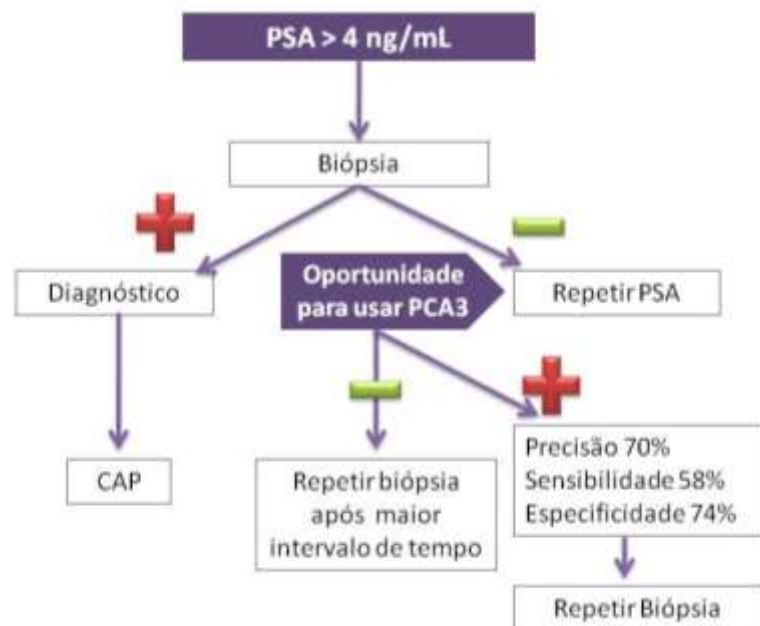
Mais recentemente, foram descritos quatro novos *sites* de início de transcrição, dois novos exões clivados diferencialmente e quatro novos locais de poliadenilação. É importante referir ainda a presença de um grande número de codões *stop* nas três *frames* de análise, sugerindo que o PCA3 é um RNA não codificante (ncRNA) [49].

Num estudo com 56 indivíduos prostatectomizados por CAP, em 95% foram descobertos elevadíssimos níveis de PCA3. Usando técnicas como análise por Northern Blot ou qRT-PCR, concluiu-se que tecido prostático normal e a HBP expressam níveis praticamente inexistentes de PCA3. Adicionalmente, é exclusivo da próstata, visto que em mais nenhum tecido ou tumor foram detetados níveis de PCA3 [49].

Uma vez que o PCA3 é expressado especificamente pelas células carcinomatosas da próstata, levou a que os investigadores explorassem o seu potencial para aplicação clínica por ser uma forma não-invasiva de diagnóstico. Muitos estudos têm-se centrado, especificamente, na utilidade deste biomarcador na identificação de indivíduos que se submeteram a pelo menos uma biópsia da próstata, por suspeita de carcinoma. A metodologia para doseamento de PCA3 apresenta alguma dificuldade, visto que PCA3 mRNA não é traduzido para uma proteína relacionada e, conseqüentemente, a imunohistoquímica e o teste ELISA tornam-se impraticáveis [50]. A primeira técnica praticada foi a sua deteção em sedimentos da urina centrifugada, colhida após toque retal, usando QRT-PCR, em homens previamente submetidos a biópsia, com serologia de PSA maior que 3ng/mL, revelando que, com o auxílio do valor do ratio PCA3/PSA, há uma maior acuidade quanto ao diagnóstico de carcinoma confirmado em biópsia, sendo que a sensibilidade deste teste PCA3 é de 67%, a especificidade é de 83%, e o valor preditivo negativo é de 90%. Posteriormente, foi desenvolvido um teste de pesquisa deste marcador usando ácidos nucleicos e tecnologia de amplificação da sequência de bases (*Nucleic-Acid Sequence Bases Amplification*) e fluorescência em tempo real, para análise de sedimentos urinários pós-toque retal. Parece que a massagem retal é importante antes da colheita da amostra urinária, pois o PCA3 (e o PSA) é específico da próstata e é necessário, promover a passagem das células da próstata pelo trato urinário para pesquisar estes marcadores genéticos [51]. O toque retal é executado aplicando pressão firme suficiente para rebaixar a superfície prostática aproximadamente 1 cm da base ao ápex e da linha mediana para cada lobo. Em seguida são dadas três batidas em cada lobo e são colhidos os primeiros 20-30 mL de urina imediatamente após esta manobra. Não foi, no entanto, comprovada neste estudo uma diferença concreta quando comparadas amostras urinárias pré-toque retal e pós-toque retal [50]. Com o intuito de tornar este teste disponível comercialmente, acessível ao clínico e semi-automático, foi apresentado um teste

de amplificação mediante transcrição (*transcription-mediated amplification test*) e deteção através de sondas quimiluminescentes de DNA numa amostra de urina. Esta técnica quantifica as isoformas de mRNA PCA3, tendo como alvo a junção dos exões 3 e 4a. No teste comercial Gen-Probe, o ratio mRNA PCA3/PSA é multiplicado por mil para *yield* da classificação PCA3, verificando-se uma sensibilidade de 69% a 79% de especificidade, em homens submetidos a biópsia para diagnóstico (área sob a curva [AUC]-ROC = 0,746). O teste Gen-Probe PCA3 está disponível para uso na Europa desde 2006, e é conhecido como PROGENSA® PCA3, embora ainda não tenha sido aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos da América. O esquema seguinte pretende exemplificar como deve ser aplicado o teste de PROGENSA® PCA3, segundo os laboratórios Gen-Probe.

O modelo multiplexado que inclui o recetor proteína G específico da próstata (*prostate-specific G-protein receptors*) e o PCA3, aumenta a especificidade para o diagnóstico de CAP, o que evidencia ser o PCA3 uma ferramenta útil para determinar se o paciente necessita realizar biópsia [52].



14. Oportunidade de uso teste ProgenSA® PCA3 na prática clínica

O PCA3 parece dar informação adicional para ajudar na decisão de biopsar ou não o doente, e da melhor terapia e vigilância necessárias, dando ainda uma previsão da probabilidade de doença apenas confinada ao órgão, e qual o volume e a agressividade, importantes na decisão de tratar ou não a doença [53].

Este assunto ainda está a ser debatido, sabemos que a neoplasia prostática intraepitelial de alto grau e o carcinoma intraductal podem libertar células para o trato urinário.

Vários estudos têm vindo a provar que o PCA3 é expressado na neoplasia intraepitelial de alto grau (*High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia* – HGPIN), sobretudo em lesões que circundem o adenocarcinoma da próstata, sendo que o *score* de PMU-PCA3 é superior nestes casos. Assim, numa biópsia que revele HGPIN deve ser considerado como parâmetro clínico o PCA3, para evitar a repetição desnecessária de biópsia [54].

Para diminuir o número de biópsias é urgente estabelecer testes diagnósticos que aumentem a probabilidade de biópsia positiva e que identifique neoplasias clinicamente relevantes (que necessitem de terapêutica ativa); nesse aspeto o PCA3 pode ser uma ajuda preciosa: pode ajudar na decisão de realizar biópsia em homens com valores elevados ou dúbios de PSA (2,5-10 ng/mL) no soro, e uma ou mais biópsias negativas; ou ainda em pacientes com nível de PSA dentro dos valores normais, e toque retal sem alterações, mas com antecedentes familiares relevantes; ou ainda, auxiliar em casos em que há uma doença concomitante da próstata, como sintomas do trato urinário baixo ou obstrução da bexiga ou, quando o clínico está indeciso se deve manter o doente em vigilância ou iniciar terapêutica ativa, sendo esta questão de particular importância quando falamos de neoplasias sem clínica relevante. O *score* de PCA3 prevê assim a possibilidade de doença confinada ao órgão, o volume e a agressividade da lesão, o que ajuda a estabelecer qual a terapêutica mais indicada a instituir [53].

Há uma diferença mínima quando aplicamos este teste em homens submetidos a primeira biópsia em relação aos homens com várias biópsias negativas, o que sugere que o PCA3 é fiável em ambos os casos, podendo ser um indicador de repetição de biópsia. Além disso, sabemos que o PCA3 pode estar relacionado com o volume prostático, e assim contribui para aumentar a especificidade quando analisado em conjunto com o PSA [50].

A avaliação clínica mostra que o PCA3 tem capacidade para superar o PSA total no diagnóstico, e que é indiferente a fatores inespecíficos que afetam a circulação de PSA [55]. A adição do teste de PCA3 às ferramentas diagnósticas em Urologia não leva à certeza de diagnóstico, mas a sensibilidade, a especificidade e o valor preditivo são, indiscutivelmente, superiores e, por isso, a sua inclusão na prática é fundamental [56]. Estudos mostram que PCA3 consegue superar o PSA na especificidade do diagnóstico, sendo que para um valor de PCA3 de referência 50ng/mL, a sua sensibilidade seria 69% e especificidade 79%, ao contrário do PSA que para valor de referência 2,5 ng/mL apresenta uma sensibilidade de 69% e uma especificidade de apenas 60% [55].

Num estudo da validação do uso de PCA3, feito em 2010, num grupo de 62 homens suecos, calculou-se um valor “área abaixo da curva” (*area under curve* - AUC) de 0,74 que se enquadra com valores obtidos em estudos anteriores similares e que, indica que o PCA3 é um bom marcador biológico para CAP. No entanto, ao contrário das expectativas, não foi obtido nenhum ganho adicional ao usar os dois marcadores, PCA3 e PSA total, em combinação, na sua especificidade para o diagnóstico de CAP [57].

ANTIGÉNIO PRECOCE CANCRO DA PRÓSTATA (EPCA)

A matriz nuclear das proteínas é responsável por manter a forma, função e organização dos componentes nucleares e pode sofrer alterações na carcinogénese [58]. O EPCA é uma proteína da matriz nuclear associada ao carcinoma da próstata. Consiste numa proteína inaracterística, com várias regiões comuns com outras proteínas, incluindo a matriz metaloproteinase 11, a proteína *malk-like* e o tripsinogénio 111; em amostras de biópsia prostática a coloração com EPCA é muito mais intensa nas células cancerígenas do que nas células não cancerígenas ou na HBP. Trata-se de uma ferramenta de coloração útil para estratificar pacientes com primeira biópsia negativa, mas que têm maior risco de uma biópsia posterior positiva [59].

Em amostras prostáticas obtidas cirurgicamente de doentes com carcinoma da próstata ou da bexiga foram executados testes histopatológicos e análises imunohistoquímicas para clarificar a localização e expressão de EPCA, sendo que este marcador foi positivo em vários locais com diferentes graus de Gleason associados, assim como na glândula adjacente não cancerígena ou nas lesões precursoras de carcinoma da próstata, como a atrofia proliferativa inflamatória (PIA) e neoplasia intraepitelial (PIN) [59].

O EPCA ELISA é sensível e específico para CAP e, há um aumento dos valores de EPCA em amostras obtidas em pacientes com CAP, em relação a amostras de dadores saudáveis, sendo que a maioria dos doentes com CAP têm valores acima do *cut-off* estabelecido e dos homens com prostatite e PSA elevada têm valores de EPCA no plasma abaixo do *cut-off*. Tanto a PIN como a PIA, usando coloração imunohistoquímica, expressam EPCA [60].

Sabemos atualmente que o EPCA-2, outra proteína nuclear estrutural, associada ao CAP, tem também um grande interesse como marcador serológico, com elevada sensibilidade e especificidade para identificar pacientes com doença confinada ao órgão [61]. Foi identificada através de estudos de proteómicos, possui três epítomos e os anticorpos são

produzidos para um epítipo, o EPCA-2,22. Através de um teste Elisa para quantificação destes anticorpos no soro, foi demonstrada uma especificidade de 92% e uma sensibilidade de 94% para o CAP e, esse estudo, também ajudou a demonstrar a capacidade do EPCA-2,22 de diferenciar doença localizada de não localizada, encontrando-se mais elevado em casos de tumor com extensão extracapsular relativamente aos confinados ao órgão [62] [63].

Na biópsia de doentes com CAP a intensidade da coloração imunohistoquímica para EPCA é muito maior do que em amostras de homens saudáveis; esta coloração mais intensa alarga-se, também, a tecidos adjacentes constituídos por células não cancerígenas, sendo portanto positiva mesmo em doentes que têm uma probabilidade elevada de terem biópsia negativas [64]. O EPCA-2 teria assim vantagem para o diagnóstico de CAP, face à alta sensibilidade e especificidade, e diferencia doentes com lesão confinada ao órgão, daqueles com lesão não-confinada [61]. Este estudo foi posto em causa, mais tarde, pela impossibilidade da caracterização do gene que expressa a proteína EPCA no teste ELISA e a dificuldade prática de identificar a elevação no soro de EPCA, quando se trata de uma lesão pequena e localizada, ou seja, a libertação da proteína para a circulação por morte celular é de difícil quantificação. Além disso, veio depois a provar-se que o EPCA-2 falhava na discriminação de doença confinada ao órgão e não confinada, já que havia sobreposição destes dois grupos de doentes [65].

O EPCA-2 foi considerado um marcador revolucionário no diagnóstico de CAP, por se tratar de uma proteína estrutural presente no núcleo destas células e distingue CAP de prostatite ou HBP. Além disso, identifica CAP mais ou menos agressivos e CAP localizados ou localmente avançados.

ALFA-METILACIL-CoA RACEMASE (AMACR)

A alfa-metilacil-CoA Racemase é o produto da expressão do gene P504S, [66] localizado no cromossoma 5, e foi a primeira enzima mitocondrial e peroxissomal com 382 aminoácidos codificados por 1621-bp cDNA identificada no CAP através de *microarrays*, em 1997. Possui algumas características fundamentais para se tornar um bom biomarcador, já que pode ser medido via análise imunohistoquímica, tem elevada especificidade para adenocarcinoma e outras patologias prostáticas benignas não causam aumento de AMACR (que está presente em diversos estádios e tipos de tumor)[67] [68].

É expressado pela próstata, fígado, rim, glândulas salivares e cólon. A coenzima AMACR é regulada pelos tecidos cancerígenos da próstata e tem como funções a β -oxidação de ácidos gordos de cadeia complexa, presentes nas carnes vermelhas e nos laticínios, que já foram associados ao aumento de risco de desenvolver CAP, no catabolismo de dois metabolitos do colesterol [o ácido dihidroxicolestanóico (DHCA) e o trihidroxicolestanóico (THCA)] e no metabolismo do ibuprofeno [62]. A expressão aumentada de AMACR está associada com o aumento da atividade enzimática, está envolvida na conceção de uma nova fonte energética ou metabolitos promotores do crescimento para as células cancerígenas e, pode perturbar o balanço entre oxidação e redução, devido ao excesso de produção de peróxido de hidrogénio, que não é compensado pelo aumento da expressão na catalase. Muitos estudos coorte mostram uma associação mínima entre a toma de aspirina e de outros AINE's e o risco de CAP, contudo, a AMACR tem a função de converter a enzima COX inativa em ativa nas variantes genéticas, afetando a quantidade do inibidor COX disponível para quimio-prevenção [69]. As variantes dos genes AMACR não estão diretamente relacionadas com o CAP, mas podem potenciar os efeitos quimio-preventivos do ibuprofeno no risco de CAP. Observou-se uma associação entre quatro variantes, M9V, D175G, S201L e K277E e a toma de ibuprofeno regularmente pelos pacientes no desenvolvimento de carcinoma [69].

Através de análises por imunohistoquímica e Western Blot em tecidos do CAP foram identificados elevados níveis de mRNA AMACR. Em cerca de 88% dos casos de CAP não tratados e nos casos em que há metastização refratária a hormonoterapia, a análise de AMACR foi fortemente positiva. Foram detetados valores elevados de AMACR em 69% dos homens, o que proporcionou uma sensibilidade de 100% relativamente às biópsias positivas e uma especificidade de 58%, sendo que quando é feita a análise imunohistoquímica dos tecidos da biópsia, a sensibilidade do AMACR para o CAP desce para 97% e a especificidade atinge o máximo de 100% [62]. Estão em curso novos estudos para identificar outras técnicas não invasivas para diagnóstico de CAP, a partir do AMACR. Um estudo multi-institucional que avaliou o potencial da aplicação da análise imunohistoquímica de AMACR aponta para uma sensibilidade de 97% e uma especificidade de 92% para adenocarcinoma da próstata [67].

Atualmente, há estudos que indicam que a detecção da AMACR através do PCR-RT em tempo real, tanto em amostras de sangue como de urina, pode ajudar no estadiamento, nas recaídas e na monitorização da terapêutica do CAP [70].

Para comprovar a origem dos carcinomas prostáticos da zona de transição foram usados anticorpos monoclonais, altamente específicos de coelhos (P504S), por contraposição ao AMACR, para estudar a expressão da enzima em 25 casos de tumores malignos desta zona. A AMACR é altamente expresso nas displasias de alto grau e da PIN proposto como precursor de carcinoma da zona de transição independentemente do grau [71].

Num estudo imunohistoquímico comparativo entre a telomerase humana (hTERT) e a AMACR, concluiu-se que em comparação com a racemase, a hTERT tem uma sensibilidade menor, mas uma especificidade maior para lesões malignas. Assim, admite-se que a hTERT seja um bom indicador no caso de lesões suspeitas à biópsia de agulha e, tem vantagens sobre a AMACR, pois não deteta casos falsos positivos. Contudo, ambos os anticorpos parecem

desempenhar papéis diferentes no CAP e nas suas características. A combinação do sinal citoplasmático difuso do AMACR e do nuclear de hTERT diagnostica, em teoria, o CAP [72].

A AMACR é um biomarcador promissor, que pode ser aplicado através de uma análise convencional imunohistoquímica com elevada especificidade e sensibilidade, usando PCR e dois novos métodos, ACIS e Ariol SL-50 para comparar o mRNA e proteína, diferente em tecidos benignos e neoplásicos [67]. Foi estudado um anticorpo específico queratina de elevado peso molecular, que deteta células basais em glândulas prostáticas benignas, mas não é reativo para adenocarcinoma [67].

Outros estudos comprovam um elo de ligação entre gene AMACR e o risco familiar de desenvolver CAP, o que realça a importância da vigilância e do estudo ter início precocemente, na tentativa de identificar variações genéticas (já que há uma maior possibilidade nesse caso de serem afetados por CAP) [73].

A expressão aumentada de AMACR em glândulas normais, circundando o foco do tumor, sugere uma possibilidade de maior risco desses tecidos sofrerem carcinomatogénese, e pode ser um instrumento útil na previsão, resultando em casos de repetição de biópsia ou como um *endpoint* intermediário para estudos de quimio-prevenção, como utensílio de estratificação do risco entre doentes com biópsias negativas. Assim, o produto do gene AMACR que interfere no metabolismo dos ácidos gordos pode vir a ser um ponto de bloqueio na progressão do CAP, tal como sucede no carcinoma colo-retal [74]. Tais ensaios para a deteção de CAP apontam uma nova direção a seguir, mas requerem ainda bastante investigação adicional.

GENES DE FUSÃO

Os genes de fusão são genes híbridos constituídos por dois genes, anteriormente, separados, que por translocação, deleção intersticial ou inversão resultam, frequentemente, em oncogenes. A presença da fusão de genes na neoplasia da próstata foi uma descoberta que serviu de marco à realização de trabalhos sucessivos para diagnosticar ou fornecer informações importantes para o prognóstico. Os fatores de transcrição da fusão de TMPRSS2 e ETS revelaram novos dados biológicos sobre tumores com elevado potencial de aplicação, designadamente, em análise da urina pós toque retal em homens prestes a ser submetidos a biópsia para diagnóstico. Os genes de fusão são detetáveis em cerca de metade dos casos de CAP e constituem, de facto, um bom indicador em tumores mais agressivos, sendo que a deteção de apenas uma fusão, pode não ter valor patológico.

| | TMPRSS2 | SLC45A3 | ACSL3 | HERV-K | FOXP1 | EST14 | KLK2 | CANT1 | DOX2 |
|------|--|--------------------------|--------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|------|-------|------|
| ERG | 21q22 Protease Trans-membranar | 1q32 | | | | | | | |
| ETV1 | | Proteína soluto carrier | 2q36.1 Sintetase Acetil-CoA | 22q11.23 Retrovirus endógeno | 3q13 Regulada por androgéneos | 14q21.1 Regulada por androgéneos | | | |
| ETV5 | | Regulada por androgéneos | Regulada por androgéneos | Regulada por androgéneos | Regulada por androgéneos | | | | |
| ETV4 | Técnicas: RT-PCR, FISH, QRT-PCR, microarrays | | | | | | | | |

| | | |
|---|---|---|
| 19q13.33 Peptidase Caliceína Regulada por androgéneos | 17q25.3 Nucleotidase ativada pelo Cálcio Regulada por androgéneos | 17q24.1 Helicase RNA Androgéneos sem efeito |
|---|---|---|

15. Fusão de genes ETS no CAP

O quadro 15 caracteriza algumas das fusões entre os diversos genes ETS relativamente ao *locus*, função, resposta a androgénios e métodos de deteção [75].

Estudos publicados em 2005 mostram que, o proto-oncogene ERG é o mais expressado nos tumores da próstata e causado pela fusão da zona promotora com diversos genes, tais como o ETS e ETV1. Estudos subsequentes provaram que a proteína resultante desta fusão está presente, tanto na fase tardia da neoplasia, como na HBP. Vários estudos mostram que a fusão do gene TMPRSS2-ERG é rara em tecido prostático normal, e contribui para o diagnóstico de CAP, particularmente nos casos de PIN, tumores confinados ao órgão, metastizados refratários a hormonoterapia e, para a determinação dos doentes que irão, desenvolver metástases no decorrer da doença [76] [77].

Sabemos que há uma diferença biológica concreta entre os tumores da zona de transição e da zona periférica, e que, apesar de não haver qualquer expressão deste gene nos tumores da zona de transição, numa pequena amostra destes ainda pode existir este gene de fusão [78]. O valor mais elevado detetado na urina da transcrição de EMPRSS2:ERG foi RNA total, encontrado em material sintetizado. Na deteção de sequências patognomónicas há uma correlação positiva entre as características clínico-patológicas dos genes de fusão; assim, é possível aperfeiçoar mais o diagnóstico e estadiamento e, facultar um teste urinário adequado, em conjunto com outro marcador, específico para o CAP [79].

A presença de TMPRSS2:ERG foi associada, em alguns estudos, a elevado grau de malignidade, presença de metástases nos nódulos linfáticos e pior prognóstico, o que levou à ideia que o rearranjo deste gene pode definir o início da carcinogénese [76]. No entanto, há análises que comprovam que tumores que expressam genes de fusão estão associados a um *score* de Gleason menor do que, aqueles que não expressam, sendo que o número de cópias translocação/deleção aumenta com o aumento do *score* de Gleason, logo, propõe-se que o rearranjo TMPRSS2:ERG não está associado a características histológicas de malignidade

[80]. Estes estudos são complicados porque na família do fator ERG há cada vez mais translocações identificadas [76]. Se há algum rearranjo no gene ETS que permita inferir um prognóstico diferente, continua a ser a questão controversa; podemos indicar que há variantes específicas das translocações, como duplicação ou *splicing*, que têm mais valor de prognóstico que as restantes. Há indícios que apontam para a regulação destes genes de fusão através de hormonas androgénias; assim sendo, isto pode ser um ponto de partida para o desenvolvimento de novas técnicas terapêuticas [75].

A combinação do teste do PCA3 com a pesquisa dos genes de fusão na urina resultou num aumento da sensibilidade de deteção de CAP para 73%, mas não parece ter a capacidade de distinguir quais as doenças agressivas. A combinação da análise dos genes de fusão com a do PCA3 ou outro marcador da urina ou do soro deve ser testada no futuro, é provavelmente uma das mais promissoras hipóteses para ampliar a especificidade da deteção de CAP [81].

O objetivo para o futuro em relação aos genes de fusão é estudar qual o mecanismo de desenvolvimento dos tumores que não estão associados a estes vários rearranjos genéticos, identificando, desta forma, diferentes tipos de tumor e os seus diferentes fatores etiológicos.

Marcadores tumorais usados no estudo de neoplasias da próstata [37].

| Marcador | Amostra | Descrição | Função Biológica | Objetivo | Métodos de deteção |
|-----------------------|---------------------------------------|---|--|--|---|
| PSA (hK3) | Soro | Protease serina da família das caliceínas | Digere o gel produzido no sémen após a ejaculação | diagnóstico, prognóstico, monitorização | Imunoensaios disponíveis comercialmente |
| hK2 | Soro | Protease serina da família das caliceínas com especificidade para substrato tripsina-like | Separa pró-PSA para formar PSA | diagnóstico, prognóstico, monitorização | Em estudo e disponível comercialmente |
| PCA3 | tecidos e urina | RNA específico próstata <i>non-coding</i> | Desconhecido | Diagnóstico | Disponível comercialmente, tecnologia transcrição mediada por amplificação; quantifica PCA3 e mRNA PSA na urina após toque rectal |
| EPCA | Soro | Proteína nuclear estrutural associada a CAP | Possivelmente envolvido na carcinogénese inicial de CAP | diagnóstico, prognóstico | ELISA |
| AMACR | soro, tecidos, urina, líquido seminal | Enzima peroxisomal e mitocondrial identificada e regulada pelo CAP, com 382 aminoácidos | Sintetiza ácido biliar, β -oxidação peroxisomal de ácidos gordos de cadeia complexa e conversão de ácidos gordos de R-stereo-isómeros para S-stereo-isómeros | Diagnóstico | Real Time - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) |
| Genes de Fusão | Urina | Sintetizam protease serina da membrana dependente de androgénios | Desconhecido | diagnóstico e monitorização da terapêutica | PCR quantitativo e amplificação RNA |

16. Marcadores biológicos no diagnóstico de CAP

IV – DISCUSSÃO

Há uma necessidade imperiosa de encontrar biomarcadores anatomo-patológicos e serológicos para um diagnóstico precoce do CAP e para uma melhor distinção entre doença confinada ao órgão e localmente avançada, mas ainda mais importante que indiquem qual o grau de malignidade da doença. Com todas as limitações apresenta das anteriormente, é claro que um marcador tumoral ideal deverá atingir quatro objetivos clínicos, são eles: a) rastreio na população saudável de indivíduos em maior risco de desenvolver CAP, através de um teste simples, económico e facilmente reproduzível; b) diagnóstico com elevada especificidade e que distinga patologias benignas de malignas; c) prognóstico, que antecipe recidiva tumoral, progressão e aparecimento de metastização, após a remoção inicial do tumor sem recurso à terapia adjuvante; d) monitorização eficaz da terapêutica anti-tumoral, quer cirúrgica ou pós-radiação ou quimioterapia.

O rastreio ou *screening* do CAP por PSA pode não ser tão positivo como pensávamos que fosse, pois o conceito atual implica submeter a população geral sem sintomas a um teste que, para ser eficaz, teria que diferenciar a doença no início do seu desenvolvimento para diminuir a morbidade do tratamento e a taxa de mortalidade por CAP.

A prática genericamente aceite que todos os homens saudáveis têm que ser submetidos a este teste, para aumentar as possibilidades de cura é errada, já que embora vários estudos tenham sido feitos para tentarem comprovar que o rastreio com PSA reduz a mortalidade específica de CAP, não há nenhum estudo suficientemente extenso, aleatório e bem estruturado que compare o aumento de sobrevida ou diminuição da mortalidade, com a introdução do PSA na rotina, ou sequer a sua vantagem em relação ao toque retal. Com o uso generalizado do PSA estamos a incluir neoplasias clinicamente indolentes, que não iriam trazer qualquer implicação para o doente e, tratar desnecessariamente o CAP, com todas as complicações inerentes a que este está associado. De acrescentar, ainda, o fator económico,

que não deve ser descartado nesta altura de crise na saúde em Portugal, com os elevados custos associados a CAP. Para evitar as consequências do sobrediagnóstico, é importante vigiar ativamente o doente com carcinoma indolente diagnosticado, evitando a abordagem cirúrgica.

Por outro lado, o abandono do PSA iria levar-nos de volta ao tempo em que o diagnóstico de CAP era tardio, já numa fase avançada do tumor, o que não é obviamente o pretendido. Defendo que a primeira determinação PSA sérico seja feita por volta dos 40 anos em homens sem fatores de risco e que, o intervalo entre doseamentos deve ser discutido pela equipa médica, mas deve ser cerca de 8 anos se $PSA < 1$ ng/mL. O ideal será realizar todos os doseamentos no mesmo laboratório para que todos os valores sejam corretamente interpretados. Estes doseamentos estão indicados até aos 75 anos, pois, a partir dessa idade, o tratamento do CAP, não melhoraria a esperança média de vida.

Pensamos que o PSA continua a ser um bom marcador, mas todas as suas implicações do seu uso têm que continuar a ser tidas em consideração pelo médico e pelo doente. O doente deve ter conhecimento dos riscos adjacentes ao teste PSA, tais como, o sobrediagnóstico e o seu impacto psicológico para o homem, os efeitos secundários da biópsia ou do próprio tratamento de CAP e, compreender que este doseamento não vai prever o curso da sua doença nem prevenir a sua morte. Assim, o que se pretenda é que o PSA não seja uma análise “chapa”, rotineira que o clínico solicite, em todos os homens com idade superior a 50 anos, como se verifica em tantas unidades de cuidados primários, espalhadas pelo nosso país. O objetivo primordial é que essa análise seja pedida, após toque retal bem executado por médico experiente, capaz de identificar casos suspeitos. Isto já acontece, atualmente, nos Estados Unidos da América, em que é necessário, consentimento informado para esta análise. Observa-se, frequentemente, vários homens que inquiram o médico de medicina geral e

familiar acerca do doseamento PSA, quer motivados por antecedentes familiares, quer por conhecidos, influenciando o médico para a sua realização, mesmo sem indicação clínica.

O PSA, isoladamente ou, em conjunto, com as suas isoformas, se bem aplicado, pode ser um bom indicador de risco e malignidade do tumor e ser usado, também, para monitorização de pacientes após prostatectomia, permitindo a redução da taxa de mortalidade por CAP e a redução da taxa de efeitos colaterais da terapêutica. Contudo, não há nenhum valor *cut-off* de PSA com a sensibilidade e especificidade ideal para ser usado como teste de rastreio, por isso, penso que o mais sensato seria usar um valor PSA ajustado aos fatores de risco de cada indivíduo, como a idade, história familiar de carcinoma ou doseamentos de PSA anteriores. O PSA ajustado à idade é um parâmetro que em vários estudos se mostrou de grande aplicabilidade e que, por isso, num doente com valores entre a média ajustada à idade e 3 ng/mL deve, na minha opinião, realizar biópsia.

Por tudo o que já referi, não considero uma boa medida a introdução do rastreio a todos os homens com mais de 40 anos através do PSA, mas defendo um diagnóstico precoce em homens com fatores de risco conhecidos para CAP, após discussão racional com o médico.

Com o valor de PSA sérico e se for considerado pertinente, deve ser calculada a %fPSA e a densidade do PSA, embora esta apresente desvantagens, já que o seu valor oscila consoante o observador que executa a técnica, constituindo variações inter e intra-observado.

Em relação ao PCA3, que até à data foi considerado o marcador, apresentado nesta tese, mais promissor, embora a literatura disponível mostre que não vai permitir obter um grau de certeza absoluta, parece ter maior especificidade que o doseamento PSA para detetar CAP. Além disso, foi demonstrado que, em conjunto com outros parâmetros, vem aumentar, indubitavelmente, a sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo do diagnóstico. Contudo, como fator de decisão para biópsia e monitorização do tratamento ainda há muitas

dúvidas na sua aplicação e, por isso, não preenche claramente todos os requisitos para poder ser considerado um bom marcador que possa substituir o PSA total.

Concretamente, em relação a todos os outros marcadores analisados, KLK, EPCA, AMACR e genes de fusão, nenhum apresenta argumentos suficientes para ser incluído no diagnóstico laboratorial da prática clínica e, para ser considerado um bom marcador no diagnóstico de CAP.

O uso simultâneo de vários biomarcadores pode indicar patologia antes de esta ser visível clinicamente, mas não há nenhuma análise que, isoladamente, atinja o nível de rigor exigido para ser considerado uma estratégia básica de diagnóstico precoce.

Ainda são necessários vários estudos que complementem toda a informação divulgada até então; a direção destes estudos deve centrar-se na prova efetiva da diminuição da taxa de mortalidade, relacionada com o CAP.

O futuro deverá centrar-se na pesquisa de estratégias que permitam prever o curso natural da doença, unindo a bioquímica à prática clínica, para que o médico possa indicar ao doente qual o seu risco relativo para desenvolvimento de CAP e, qual é a melhor terapêutica para o seu tratamento, se assim for o caso. O melhoramento do conjunto de testes para diagnosticar com segurança o CAP, constitui o objetivo primordial da urologia oncológica.

O desenvolvimento de novos critérios de seleção de doentes com CAP, sem significado clínico, foi feito na expectativa de que nenhum doente perca a “janela de oportunidade” para permanecer saudável e, baseia-se objetivamente no desenvolvimento e no conhecimento dos biomarcadores moleculares de CAP.

Em conclusão, todos os estudos analisados mostram que o PSA apresenta muitas limitações, mas continua a ter elevadas taxas de deteção de CAP, sendo um método minimamente invasivo e barato, embora não exista nenhum valor *cut-off* que apresente sensibilidade e especificidade ideais para um teste de diagnóstico. Para já, ainda nenhum outro biomarcador se revela superior para o uso na prática clínica, quer em termos diagnósticos, quer em termos prognósticos. Para evitar fenómeno de sobrediagnóstico, o PSA ajustado à idade, pode ser um bom parâmetro. Contudo, a aplicação do PSA, em conjunto com outros marcadores, pode ser uma vantagem no diagnóstico de carcinoma da próstata.

O futuro deverá centrar-se na validação de biomarcadores já existentes, e na descoberta de novos marcadores, para identificar homens com CAP, de alta malignidade e, útil, também, para prever o resultado futuro das terapêuticas instituídas.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Alfredo Mota pela forma como orientou o meu trabalho e por toda a cordialidade com que me recebeu.

Ao Dr. Pedro Nunes, coorientador desta tese, por todo o apoio e disponibilidade na elaboração deste trabalho, por todos os conselhos úteis que me deu e por toda a simpatia.

Ao Dr. Josué Pereira, Padrinho e bom amigo, pela dedicação e por todos os conselhos dados.

Aos meus Pais, Irmão e Amigos por toda a paciência e apoio incondicional.

Ao Nuno pelo apoio informático.

Ao meu Avô, o principal responsável pela escolha deste tema. Que este trabalho contribua, ainda que numa ínfima parte, para o maior conhecimento desta patologia para que, no futuro, mais nenhuma família tenha que se despedir de um ente querido, vítima de carcinoma da próstata.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dias, J.S., "Cancro da Próstata" p.2-17; Dias, J.S., "Novas Técnicas de Tratamento do Cancro da Próstata" p.20-27 in Dias, J.S., *Urologia fundamental na prática clínica, cap 1-2, p.2-27*. 2010, Lisboa: Lidel.
2. Ferlay J, S.H., Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM, *GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base, ed. J. Ferlay*. 2008, Lyon.
3. Gray, H. and W.H. Lewis, *Anatomy of the human body*. 20th ed. 1918, Philadelphia and New York,: Lea & Febiger.
4. Scherr, D., P.W. Swindle, and P.T. Scardino, *National Comprehensive Cancer Network guidelines for the management of prostate cancer*. *Urology*, 2003. **61**(2): p. 14-24.
5. Heidenreich, A., et al., [EAU guidelines on prostate cancer. Part I: screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease]. *Actas Urol Esp*, 2011. **35**(9): p. 501-14.
6. Hoogendam, A., F. Buntinx, and H.C. de Vet, *The diagnostic value of digital rectal examination in primary care screening for prostate cancer: a meta-analysis*. *Fam Pract*, 1999. **16**(6): p. 621-6.
7. Tannenbaum, M.P., *Urologic pathology : the prostate*. 1977, Philadelphia: Lea & Febiger. xii, 419 p.
8. Greene, K.L., et al., *Prostate specific antigen best practice statement: 2009 update*. *J Urol*, 2009. **182**(5): p. 2232-41.
9. Lilja, H., D. Ulmert, and A.J. Vickers, *Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring*. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(4): p. 268-78.
10. Gjertson, C.K. and P.C. Albertsen, *Use and assessment of PSA in prostate cancer*. *Med Clin North Am*, 2011. **95**(1): p. 191-200.
11. Djavan, B., et al., *Prostate-specific antigen testing and prostate cancer screening*. *Prim Care*, 2010. **37**(3): p. 441-59, vii.
12. Wein, A.J., L.R. Kavoussi, and M.F. Campbell, *Campbell-Walsh urology / editor-in-chief, Alan J. Wein ; [editors, Louis R. Kavoussi ... et al.]*. 10th ed. 2012, Philadelphia, PA: Elsevier Saunders.
13. Wolf, A.M., et al., *American Cancer Society guideline for the early detection of prostate cancer: update 2010*. *CA Cancer J Clin*, 2010. **60**(2): p. 70-98.
14. Brawer, M.K., et al., *Screening for prostatic carcinoma with prostate specific antigen*. *J Urol*, 1992. **147**(3 Pt 2): p. 841-5.
15. Catalona, W.J., et al., *Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men*. *J Urol*, 1994. **151**(5): p. 1283-90.
16. Coley, C.M., et al., *Early detection of prostate cancer. Part I: Prior probability and effectiveness of tests*. *The American College of Physicians. Ann Intern Med*, 1997. **126**(5): p. 394-406.
17. Thompson, I.M., et al., *Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or =4.0 ng per milliliter*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(22): p. 2239-46.
18. Raghavan, D., *Prostate cancer: too much dogma, not enough data*. *Cleve Clin J Med*, 2008. **75**(1): p. 33-4.
19. Thompson, I.M., et al., *Operating characteristics of prostate-specific antigen in men with an initial PSA level of 3.0 ng/ml or lower*. *JAMA*, 2005. **294**(1): p. 66-70.

20. Longo, D.L., "Benign and Malignant Diseases of Prostate" cap 95 in *Harrison's principles of internal medicine*. 18th ed. 2012, New York: McGraw-Hill.
21. Linn, M.M., R.A. Ball, and A. Maradiegue, Prostate-specific antigen screening: friend or foe? *Urol Nurs*, 2007. **27**(6): p. 481-9; quiz 490.
22. Schroder, F.H., PSA screening--a review of recent studies. *Eur J Cancer*, 2009. **45 Suppl 1**: p. 402-4.
23. Bastian, P.J., et al., Insignificant prostate cancer and active surveillance: from definition to clinical implications. *Eur Urol*, 2009. **55**(6): p. 1321-30.
24. Neal, D.E., et al., Screening for prostate cancer remains controversial. *Lancet*, 2009. **374**(9700): p. 1482-3.
25. Sakr, W.A., et al., Age and racial distribution of prostatic intraepithelial neoplasia. *Eur Urol*, 1996. **30**(2): p. 138-44.
26. Etzioni, R., et al., Overdiagnosis due to prostate-specific antigen screening: lessons from U.S. prostate cancer incidence trends. *J Natl Cancer Inst*, 2002. **94**(13): p. 981-90.
27. Draisma, G., et al., Lead times and overdiagnosis due to prostate-specific antigen screening: estimates from the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2003. **95**(12): p. 868-78.
28. Pashayan, N., et al., Mean sojourn time, overdiagnosis, and reduction in advanced stage prostate cancer due to screening with PSA: implications of sojourn time on screening. *Br J Cancer*, 2009. **100**(7): p. 1198-204.
29. Christensson, A., et al., Serum prostate specific antigen complexed to alpha 1-antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. *J Urol*, 1993. **150**(1): p. 100-5.
30. Catalona, W.J., et al., Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial. *JAMA*, 1998. **279**(19): p. 1542-7.
31. Brawer, M.K., et al., Measurement of complexed PSA improves specificity for early detection of prostate cancer. *Urology*, 1998. **52**(3): p. 372-8.
32. Catalona, W.J., et al., Comparison of prostate specific antigen concentration versus prostate specific antigen density in the early detection of prostate cancer: receiver operating characteristic curves. *J Urol*, 1994. **152**(6 Pt 1): p. 2031-6.
33. Loeb, S. and W.J. Catalona, Prostate-specific antigen in clinical practice. *Cancer Lett*, 2007. **249**(1): p. 30-9.
34. Barry, M.J., Clinical practice. Prostate-specific-antigen testing for early diagnosis of prostate cancer. *N Engl J Med*, 2001. **344**(18): p. 1373-7.
35. Ko, J.S., et al., Effect of intra-observer variation in prostate volume measurement on prostate-specific antigen density calculations among prostate cancer active surveillance participants. *BJU Int*, 2011. **108**(11): p. 1739-1742.
36. Richardson, T.D. and J.E. Oesterling, Age-specific reference ranges for serum prostate-specific antigen. *Urol Clin North Am*, 1997. **24**(2): p. 339-51.
37. Castelli, T., et al., Molecular markers for prostatic cancer. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2010. **2**: p. 641-56.
38. Thanigasalam, R., et al., Prostate-specific antigen velocity (PSAV): a practical role for PSA? *ANZ J Surg*, 2009. **79**(10): p. 703-6.
39. Vickers, A.J., et al., An empirical evaluation of guidelines on prostate-specific antigen velocity in prostate cancer detection. *J Natl Cancer Inst*, 2011. **103**(6): p. 462-9.
40. Kollara, A., E.P. Diamandis, and T.J. Brown, Secretion of endogenous kallikreins 2 and 3 by androgen receptor-transfected PC-3 prostate cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2003. **84**(5): p. 493-502.

41. *Vickers, A.J., et al., A four-kallikrein panel predicts prostate cancer in men with recent screening: data from the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer, Rotterdam. Clin Cancer Res, 2010. 16(12): p. 3232-9.*
42. *Nam, R.K., et al., Variants of the hK2 protein gene (KLK2) are associated with serum hK2 levels and predict the presence of prostate cancer at biopsy. Clin Cancer Res, 2006. 12(21): p. 6452-8.*
43. *Stephan, C., et al., Clinical utility of human glandular kallikrein 2 within a neural network for prostate cancer detection. BJU Int, 2005. 96(4): p. 521-7.*
44. *Vaisanen, V., et al., Free and total human glandular kallikrein 2 in patients with prostate cancer. Urology, 2006. 68(1): p. 219-25.*
45. *Haese, A., et al., The role of human glandular kallikrein 2 for prediction of pathologically organ confined prostate cancer. Prostate, 2003. 54(3): p. 181-6.*
46. *Stephan, C., et al., Serum human glandular kallikrein 2 (hK2) for distinguishing stage and grade of prostate cancer. Int J Urol, 2006. 13(3): p. 238-43.*
47. *Becker, C., et al., Testing in serum for human glandular kallikrein 2, and free and total prostate specific antigen in biannual screening for prostate cancer. J Urol, 2003. 170(4 Pt 1): p. 1169-74.*
48. *Wang, W., et al., Kallikrein-related peptidase-4 initiates tumor-stroma interactions in prostate cancer through protease-activated receptor-1. Int J Cancer, 2010. 126(3): p. 599-610.*
49. *Day, J.R., et al., PCA3: from basic molecular science to the clinical lab. Cancer Lett, 2011. 301(1): p. 1-6.*
50. *Lin, D.W., Beyond PSA: utility of novel tumor markers in the setting of elevated PSA. Urol Oncol, 2009. 27(3): p. 315-21.*
51. *Fontenete, S., et al., Controversies in using urine samples for Prostate Cancer detection: PSA and PCA3 expression analysis. Int Braz J Urol, 2011. 37(6): p. 719-26.*
52. *Rigau, M., et al., PSGR and PCA3 as biomarkers for the detection of prostate cancer in urine. Prostate, 2010. 70(16): p. 1760-7.*
53. *Schilling, D., et al., The Prostate Cancer gene 3 assay: indications for use in clinical practice. BJU Int, 2010. 105(4): p. 452-5.*
54. *Morote, J., et al., Behavior of the PCA3 gene in the urine of men with high grade prostatic intraepithelial neoplasia. World J Urol, 2010. 28(6): p. 677-80.*
55. *Kirby, R.S., J.M. Fitzpatrick, and J. Irani, Prostate cancer diagnosis in the new millennium: strengths and weaknesses of prostate-specific antigen and the discovery and clinical evaluation of prostate cancer gene 3 (PCA3). BJU Int, 2009. 103(4): p. 441-5.*
56. *Jamaspishvili, T., et al., Urine markers in monitoring for prostate cancer. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2010. 13(1): p. 12-9.*
57. *Nyberg, M., et al., PCA3 as a diagnostic marker for prostate cancer: a validation study on a Swedish patient population. Scand J Urol Nephrol, 2010. 44(6): p. 378-83.*
58. *Nogueira, L., R. Corradi, and J.A. Eastham, Other biomarkers for detecting prostate cancer. BJU Int, 2010. 105(2): p. 166-9.*
59. *Uetsuki, H., et al., Expression of a novel biomarker, EPCA, in adenocarcinomas and precancerous lesions in the prostate. J Urol, 2005. 174(2): p. 514-8.*
60. *Paul, B., et al., Detection of prostate cancer with a blood-based assay for early prostate cancer antigen. Cancer Res, 2005. 65(10): p. 4097-100.*
61. *Leman, E.S., et al., EPCA-2: a highly specific serum marker for prostate cancer. Urology, 2007. 69(4): p. 714-20.*

62. Risk, M.C. and D.W. Lin, *New and novel markers for prostate cancer detection. Curr Urol Rep*, 2009. **10**(3): p. 179-86.
63. Steuber, T., M.F. O'Brien, and H. Lilja, *Serum markers for prostate cancer: a rational approach to the literature. Eur Urol*, 2008. **54**(1): p. 31-40.
64. Steuber, T., P. Helo, and H. Lilja, *Circulating biomarkers for prostate cancer. World J Urol*, 2007. **25**(2): p. 111-9.
65. Diamandis, E.P., *POINT: EPCA-2: a promising new serum biomarker for prostatic carcinoma? Clin Biochem*, 2007. **40**(18): p. 1437-9.
66. Kaic, G. and C. Tomasovic-Loncaric, *Alpha-methylacyl-CoA racemase (AMACR) in fine-needle aspiration specimens of prostate lesions. Diagn Cytopathol*, 2009. **37**(11): p. 803-8.
67. Jiang, Z., et al., *Alpha-methylacyl-CoA racemase: a multi-institutional study of a new prostate cancer marker. Histopathology*, 2004. **45**(3): p. 218-25.
68. Jiang, Z., et al., *Discovery and clinical application of a novel prostate cancer marker: alpha-methylacyl CoA racemase (P504S). Am J Clin Pathol*, 2004. **122**(2): p. 275-89.
69. Daugherty, S.E., et al., *Polymorphic variants in alpha-methylacyl-CoA racemase and prostate cancer. Prostate*, 2007. **67**(14): p. 1487-97.
70. Zehentner, B.K., et al., *Detection of alpha-methylacyl-coenzyme-A racemase transcripts in blood and urine samples of prostate cancer patients. Mol Diagn Ther*, 2006. **10**(6): p. 397-403.
71. Leav, I., et al., *Alpha-methylacyl-CoA racemase (P504S) expression in evolving carcinomas within benign prostatic hyperplasia and in cancers of the transition zone. Hum Pathol*, 2003. **34**(3): p. 228-33.
72. Puebla-Mora, A.G., et al., *Human telomerase and alpha-methylacyl-coenzyme A racemase in prostatic carcinoma. A comparative immunohistochemical study. Ann Diagn Pathol*, 2006. **10**(4): p. 205-8.
73. Levin, A.M., et al., *Sequence variation in alpha-methylacyl-CoA racemase and risk of early-onset and familial prostate cancer. Prostate*, 2007. **67**(14): p. 1507-13.
74. Ananthanarayanan, V., et al., *Alpha-methylacyl-CoA racemase (AMACR) expression in normal prostatic glands and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN): association with diagnosis of prostate cancer. Prostate*, 2005. **63**(4): p. 341-6.
75. Clark, J.P. and C.S. Cooper, *ETS gene fusions in prostate cancer. Nat Rev Urol*, 2009. **6**(8): p. 429-39.
76. Fiorentino, M., E. Capizzi, and M. Loda, *Blood and tissue biomarkers in prostate cancer: state of the art. Urol Clin North Am*, 2010. **37**(1): p. 131-41, Table of Contents.
77. FitzGerald, L.M., et al., *Association of TMPRSS2-ERG gene fusion with clinical characteristics and outcomes: results from a population-based study of prostate cancer. BMC Cancer*, 2008. **8**: p. 230.
78. Bismar, T.A. and K. Trpkov, *TMPRSS2-ERG gene fusion in transition zone prostate cancer. Mod Pathol*, 2010. **23**(7): p. 1040-1; author reply 1041-2.
79. Rostad, K., et al., *TMPRSS2:ERG fusion transcripts in urine from prostate cancer patients correlate with a less favorable prognosis. APMIS*, 2009. **117**(8): p. 575-82.
80. Fine, S.W., et al., *TMPRSS2-ERG gene fusion is associated with low Gleason scores and not with high-grade morphological features. Mod Pathol*, 2010. **23**(10): p. 1325-33.
81. Stephan, C., et al., *New markers and multivariate models for prostate cancer detection. Anticancer Res*, 2009. **29**(7): p. 2589-600.