

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**DETECÇÃO DE AUTO-ANTICORPOS ANTI-PSA EM PACIENTES COM E SEM
NEOPLASIA DA PRÓSTATA**

MELISSA HELENA ANGELI

Orientador: Prof. Dr. Walter José Koff

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**DETECÇÃO DE AUTO-ANTICORPOS ANTI-PSA EM PACIENTES COM E SEM
NEOPLASIA DA PRÓSTATA**

MELISSA HELENA ANGELI

Orientador: Prof. Dr. Walter José Koff

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas,
UFRGS, como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

2008

A582d **Angeli, Melissa Helena**

Detecção de auto-anticorpos anti-PSA em pacientes com e sem neoplasia da próstata / Melissa Helena Angeli ; orient. Walter José Koff. – 2008.

81 f.; il. color.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2008.

1. Antígeno prostático específico 2. Auto-anticorpos 3.

Neoplasias prostáticas 4. Hospital de Clínicas de Porto Alegre I. Koff,

Walter José II. Título.

NLM: WJ 762

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Darci e Aorelia Angeli, pelo exemplo de caráter e dedicação e constante incentivo aos estudos.

Ao meu orientador, Dr. Walter José Koff, pela oportunidade de crescimento científico e profissional.

À equipe da FK Biotecnologia, em especial ao Dr. Fernando Thomé Kreutz, pelos ensinamentos durante a realização deste trabalho.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas por oferecer condições para seguir com minha formação acadêmica.

À FK Biotecnologia pelo co-suporte financeiro.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas.....	7
Lista de tabelas.....	9
Lista de figuras.....	10
Resumo.....	11
Abstract.....	12
Introdução.....	13
1 Fundamentação Teórica.....	14
1.1 Câncer de Próstata (caP).....	14
1.1.1 Fatores de risco para o caP.....	16
1.1.1.1 Dieta.....	16
1.1.1.2 Hereditariedade.....	16
1.1.1.3 Raça.....	17
1.1.1.4 Idade.....	17
1.1.1.5 Outros fatores.....	17
1.1.2 Diagnóstico do caP.....	18
1.2 Antígeno Prostático Específico (PSA).....	19
1.2.1 História do Descobrimento.....	19
1.2.2 Bioquímica do PSA.....	20
1.2.3 Formas moleculares do PSA.....	21
1.2.4 Complexos do PSA.....	23

1.2.5	Possíveis funções do PSA na patogênese do caP.....	25
1.2.6	Fatores que alteram a concentração do PSA.....	26
1.3	Triagem para o caP.....	29
1.3.1	PSA como teste de triagem para o caP.....	30
1.3.2	Estratégias para aumentar a especificidade e sensibilidade do PSA.....	31
1.3.2.1	Velocidade do PSA.....	31
1.3.2.2	Densidade do PSA.....	32
1.3.2.3	PSA ajustado para a idade.....	32
1.3.2.4	Relação entre PSA livre e PSA total.....	33
1.4	Novos marcadores para o caP.....	35
1.4.1	Cromogranina A (GRN-A).....	35
1.4.2	Glutathione S-transferase π 1(GSTP-1).....	36
1.4.3	Prostate Stem Cell Antigen (PSCA).....	36
1.4.4	Antígeno Prostático Específico de Membrana (PSMA).....	36
1.4.5	TERT (transcriptase reversa da telomerase).....	37
1.4.6	Calicreína humana tipo 2 (hK2).....	37
1.4.7	Antígeno Prostático Específico Precoce (EPCA).....	38
1.4.8	Auto-anticorpos.....	38
1.4.8.1	Auto-anticorpos como preditores de doença.....	38
1.4.8.2	Auto-anticorpos anti-prostassoma.....	40
1.4.8.3	Auto-anticorpos anti-PSA.....	40
2	Objetivos.....	43
3	Referências Bibliográficas	44

4	Artigo (versão em português).....	51
5	Artigo (versão em inglês).....	66
6	Considerações Finais e Perspectivas.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

Aac anti-PSA	Auto-anticorpos anti-PSA
ACP	American College of Physicians
ACS	American Cancer Society
ACT	Alfa-1-Antiquimotripsina
API	Alfa-1-antitripsina
AUA	American Urological Association
BSA	Soro Albumina Bovina
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
caP	Câncer de Próstata
DRE	Exame Digital Retal
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPCA	Antígeno Prostático Específico Precoce
FGF-2	Fibroblast Growth Factor-2
GRN-A	Cromogranina-A
GSTP-1	Glutathione-S-transferase π 1
hK1	Caliceína humana tipo 1
hK2	Caliceína humana tipo 2
hK3	Caliceína humana tipo 3
hK4	Caliceína humana tipo 4
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna
IGF-1	Insulin Growth Factor-1
IGFBP-3	Insulin Growth Factor Binding Protein-3
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LNCaP	Células proliferativas do caP
MG	Alfa-2-macroglobulina
NACB	National Academy of Clinical Biochemistry
NCI	Nacional Cancer Institute
PCI	Inibidor da Proteína C
PBS	Phosphate Saline Buffer
PSA	Antígeno Prostático Específico
PSA L	Antígeno Prostático Específico Livre

PSCA	Prostate Stem Cell Antigen
PSMA	Antígeno Prostático Específico de Membrana
PTHrP	Fator liberador do hormônio paratireóideo
RTU	Ressecção Transuretral
SBU	Sociedade Brasileira de Urologia
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamida gel electrophoresis
TERT	Transcriptase reversa da telomerase
TMB	3,3',5,5' tetramethyl-benzidine
TGF- β	Transforming Growth Factor-Beta
USPTF	U.S. Preventive Service Task Force
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vWF	Fator de von Willebrand

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estimativas para o ano de 2006 e 2008 das taxas brutas de incidência por 100.000 homens e de número de casos novos de câncer de próstata..... 15

Tabela 2 – Complexos do PSA..... 23

Tabela 3 – Valores de referência para o PSA total em diferentes faixas etárias e grupos étnicos..... 33

Tabela 4 – Sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e eficiência diagnóstica com diferentes níveis de relação entre PSA livre e PSA total.. 34

LISTA DE FIGURAS

Fig.1. Estrutura tridimensional do PSA..... 25

RESUMO

O antígeno prostático específico é o marcador sérico utilizado para o diagnóstico do câncer de próstata, porém, sua sensibilidade e especificidade ainda deixam a desejar na detecção precoce do câncer. Os auto-anticorpos anti-PSA já foram observados em pacientes com hiperplasia benigna e com câncer de próstata, porém seu significado clínico ainda não foi completamente estabelecido. Nosso objetivo foi detectar auto-anticorpos anti-PSA em pacientes atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e correlacionar com o estágio patológico.

Os auto-anticorpos anti-PSA foram detectados através de um ensaio imunoenzimático no soro de 98 pacientes. Destes, 77 pacientes com neoplasia da próstata e 21 pacientes sem neoplasia aparente de acordo com o exame anátomo-patológico.

Considerando o valor arbitrário 1,0 como ponto de corte, observou-se que pacientes sem neoplasia aparente apresentaram níveis de auto-anticorpos anti-PSA mais elevados do que pacientes com câncer (85,7% e 53,2% respectivamente) ($p = 0,015$).

Analisando apenas os pacientes com câncer, porém estratificando-os em quatro subgrupos: presença de metástase óssea, ausência de metástase óssea, presença de metástase linfonodal e câncer localmente avançado, observou-se que pacientes com metástase óssea e com câncer localmente avançado apresentam níveis mais elevados de auto-anticorpos anti-PSA, porém não estatisticamente significativos ($p = 0,591$).

Embora mais estudos sejam necessários para avaliar o verdadeiro significado dos auto-anticorpos anti-PSA, este estudo sugere que os auto-anticorpos anti-PSA podem ser um teste auxiliar ao PSA para o diagnóstico e prognóstico do câncer de próstata, aumentando sua especificidade e sensibilidade.

ABSTRACT

The prostate specific antigen is a serum marker used to diagnose prostate cancer, however, its sensitivity and specificity is still far from perfect in early cancer detection. Anti-PSA autoantibodies were observed in patients with benign hyperplasia and with prostate cancer, however, their clinical significance has not yet been fully established. Our objective was to detect anti-PSA autoantibodies in patients under treatment at Hospital de Clínicas de Porto Alegre and to correlate with the pathological stage.

Anti-PSA autoantibodies were detected by means of an enzyme immunoassay in the serum of 98 patients. Out of these, 77 patients with prostate neoplasia and 21 patients without apparent neoplasia, according to the anatomopathological exam.

Considering the arbitrary value 1.0 as cutoff, we noticed that patients without apparent neoplasia had higher anti-PSA antibody levels than patients with cancer (85.7% and 53.2% respectively) ($p=0.015$).

Analyzing only patients with cancer and stratifying them in four subgroups: presence of bone metastasis, absence of bone metastasis, presence of lymph node metastases and locally advanced cancer, we noticed that patients with bone metastases and with locally advanced cancer had higher levels of anti-PSA antibodies, however not statistically significant ($p=0.591$).

Although more studies are needed to evaluate the real significance of anti-PSA autoantibodies, this study creates the hypothesis that anti-PSA antibodies can be an auxiliary text to PSA in the diagnosis and prognosis prostate cancer, increasing its specificity and sensitivity.

INTRODUÇÃO

A incidência do câncer no Brasil, como em todo o mundo, cresce num ritmo que acompanha o envelhecimento populacional decorrente do aumento da expectativa de vida. É um resultado direto das grandes transformações globais das últimas décadas, que alteraram a situação de saúde dos povos, pela urbanização acelerada, novos modos de vida e novos padrões de consumo.

O câncer de próstata é um importante problema de saúde pública especialmente em países ocidentais. O aumento acentuado de sua incidência é atribuído, em parte, a melhora na qualidade de vida dos homens, os quais ficam expostos às doenças que predominam numa faixa etária mais avançada e ao intensivo rastreamento com o teste do antígeno prostático específico (PSA).

O PSA, uma proteína produzida principalmente pelas células epiteliais prostáticas, é amplamente utilizada na detecção, prognóstico e monitorização do câncer de próstata. Entretanto, um nível elevado de PSA nem sempre indica câncer, e um valor dentro da faixa de referência não afasta esta hipótese diagnóstica. Valores elevados de PSA podem ser observados em câncer de próstata, em doenças prostáticas benignas, como a hiperplasia prostática benigna e as prostatites, e em diferentes condições não relacionadas à doença prostática.

O papel do PSA no estadiamento e na triagem do câncer de próstata continua limitado devido às faixas amplas e sobrepostas dos níveis de PSA no sangue em muitos pacientes com doença localizada ou doença metastática avançada.

O desafio está em identificar marcadores que possam prever o potencial de progressão e o comportamento clínico desta doença.

Auto-anticorpos podem ser utilizados como ferramentas sorológicas para o diagnóstico precoce e manejo do câncer. Os auto-anticorpos anti-PSA pesquisados neste trabalho poderão ser mais uma ferramenta para melhorar a especificidade e a sensibilidade do diagnóstico do câncer de próstata, tornando-se um teste auxiliar no prognóstico, acompanhamento e tratamento desta doença.

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Câncer de Próstata (caP)

O câncer de próstata é um importante problema de saúde pública especialmente em países ocidentais. Está em sexto lugar entre os tumores malignos mais comuns no mundo, porém é o mais freqüente nos Estados Unidos, excetuando-se o câncer de pele não melanoma, representando cerca de 29% de todos os tumores diagnosticados em homens a cada ano. Nos Estados Unidos, aproximadamente 218.890 casos são diagnosticados anualmente, e ocorrem, aproximadamente, 27.050 mortes (1).

Em 2004, no Brasil, a mortalidade por câncer representou 13,7% de todos os óbitos registrados no país, ficando atrás apenas das doenças do aparelho circulatório, cujo percentual chegou a 27,9. As mortes por causas externas aparecem em seguida, com 12,4% (2).

Em 2004, os cânceres de pulmão e de próstata foram os responsáveis pela 10^o e 11^o causa de morte entre as mais importantes nos homens no país, enquanto nas mulheres os tumores de mama e pulmão aparecem como a 7^o e a 11^o causa isolada de morte, entre as mais importantes (2).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2006 apontaram 472.050 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção ao de pele não melanoma, são os de próstata e pulmão no sexo masculino e mama e colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo (2).

Em 2006, estimou-se a ocorrência de 47.280 casos novos para o câncer de próstata no Brasil. Na região Sul, entre os homens, excluindo câncer de pele não melanoma, o caP foi o primeiro em incidência (68,13 casos/ 100.000 hab.). No Rio Grande do Sul, o caP teve uma taxa bruta de incidência de 81,92 casos/ 100.000 hab. e, em Porto Alegre, 108,22 casos/100.000 hab., superando o câncer de pele não melanoma (2).

Em 2008, estima-se a ocorrência de 466.730 casos novos de câncer no Brasil, sendo que metade destes casos atinge o sexo masculino. Em homens, excetuando-se o câncer de pele não melanoma, o câncer de próstata permanece como o mais incidente em todas as regiões do Brasil com 49.530 casos. Na região Sul estima-se a ocorrência de 9500 casos

novos de caP (68,72/100.000 hab.). Destes, 4430 casos novos no RS (80,63/100.000 hab.) e 730 casos novos em Porto Alegre (103,95/100.000 hab.)(3).

Tabela 1 – Estimativas para o ano de 2006 e 2008 das taxas brutas de incidência por 100.000 homens e de número de casos novos de câncer de próstata.

Local	Taxa bruta de incidência		Casos Novos	
	2006	2008	2006	2008
Região Norte	22,04	22,09	1.680	1.750
Região Nordeste	34,53	37,97	8.730	9.820
Região Centro-Oeste	46,00	46,60	3.050	3.200
Região Sudeste	63,26	63,17	24.620	25.260
Região Sul	68,13	68,72	9.200	9.500
Rio Grande do Sul	81,92	80,63	4.410	4.430
Porto Alegre	108,22	103,95	740	730
Brasil	51,41	52,43	47.280	49.530

Fonte: BRASIL, Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer. Estimativa: Incidência de Câncer no Brasil 2006 e 2008 (2, 3).

O aumento observado nas taxas de incidência pode estar relacionado aos programas de rastreamento, amplo emprego do antígeno prostático específico, redução da taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares (permitindo que os indivíduos atinjam idades mais avançadas) e, talvez, a influência de fatores ambientais, dietéticos ou outros ainda não identificados que possam estar exercendo importante influência (4).

1.1.1 Fatores de Risco para o caP

1.1.1.1 Dieta

Um grande número de estudos indica que a dieta do mundo Ocidental possui poucos fatores protetores, isto é, micronutrientes como Selênio, vitaminas E, D e folato, fitoestrógenos e antioxidantes como o licopeno. Inversamente, o grande consumo de gorduras, laticínios e carne vermelha é considerado fator de risco em estudos epidemiológicos (5, 6).

Fitoestrógenos como os encontrados em alimentos a base de soja podem reduzir o risco de caP, seja pelas suas propriedades estrogênicas inerentes ou pela inibição da enzima 5 - alfa redutase, a qual diminui as concentrações do andrógeno mais ativo da próstata, a diidrotestosterona. O alto consumo de produtos a base de soja entre os homens asiáticos pode ser uma razão pela qual os mesmos possuem uma baixa incidência de caP (1).

1.1.1.2 Hereditariedade

O câncer hereditário é distinguível dos demais pela herança autossômica-dominante, multifocalidade e início precoce. A maioria dos casos é explicada pela mutação em um alelo do gene supressor de tumor. Alterações nos genes do cromossomo 1 e X foram encontrados em alguns pacientes com história familiar de caP (5).

Em 2006, dois estudos demonstraram que uma região no cromossomo 8q24 confere um alto risco de desenvolvimento de caP em homens com descendência africana e européia. O alelo no cromossomo 8q24 ainda não foi identificado, porém parece ser o primeiro e único *locus* genético de risco responsável por uma considerável fração dos tumores de próstata na população em geral, particularmente em afro-americanos (1).

Homens que têm parentesco de primeiro grau com portador de carcinoma de próstata têm um risco duas vezes maior de desenvolver a doença(1).

A forma hereditária do caP é responsável por 5% a 6% de todos os casos de caP e, usualmente, ocorre dez anos antes que o câncer esporádico. Um terço dos casos de caP diagnosticados antes dos 60 anos são hereditários e metade destes são diagnosticados antes dos 55 anos de idade (4).

1.1.1.3 Raça

Afro-americanos desenvolvem caP 50% mais frequentemente que seus conterrâneos brancos da mesma idade. Comparado com americanos brancos, os negros são mais jovens no momento do diagnóstico e seus tumores são mais agressivos. As razões para a maior incidência de caP em americanos negros não são conhecidas, mas provavelmente são multifatoriais, combinando fatores genéticos e ambientais (4).

1.1.1.4 Idade

O diagnóstico do caP é raro antes dos 50 anos, porém, depois desta idade a incidência aumenta exponencialmente (4). A idade média na qual o caP mais comumente ocorre é em torno dos 72-74 anos (7).

1.1.1.5 Outros fatores

Estudos revelam associação entre caP e câncer de bexiga. De acordo com Chun, pacientes com câncer de bexiga têm dezenove vezes mais chance de desenvolver caP que pacientes saudáveis e, pacientes com caP têm probabilidade dezoito vezes maior de desenvolver câncer de bexiga que a população controle (8).

Estudos reportam uma correlação entre índice de massa corporal e agressividade e mortalidade pelo caP. O maior estudo analisou 3162 homens tratados com prostatectomia radical. Dezenove por cento eram obesos e apresentavam caP de alto grau e alto risco de

recorrência. Os autores concluíram que a obesidade pode representar um fator de risco maior para a progressão da doença do que para seu início (1).

1.1.2 Diagnóstico do Câncer de Próstata

A história médica contribui pouco para o diagnóstico do caP em estágios iniciais, pois a maior parte (60 – 70%) dos carcinomas encontram-se na zona periférica da glândula, não aparecendo sintomas clínicos. Somente após um longo período de evolução, os tumores apresentam-se sintomáticos (5).

O exame físico deve obrigatoriamente envolver o exame digital transretal da próstata (DRE), porém, isoladamente, possui limitações. Achados anormais na próstata pelo DRE incluem nódulos, assimetria ou endurecimento. O DRE pode detectar tumores nas partes posterior e lateral da glândula prostática; uma limitação inerente do toque retal é que somente 85% dos tumores crescem periféricamente e podem ser detectados por este exame (9, 10).

Uma metanálise de DRE estimou uma sensibilidade de 59% e uma especificidade de 94 % para a detecção de caP. O valor preditivo positivo de um exame de toque anormal varia de 5 a 30% (10).

O toque retal, de forma isolada, detecta menos de 60% dos caP e a associação com o PSA aumenta em 26% a taxa de detecção, mas também com aumento de falsos-positivos (11). Apesar disto, o exame digital é sempre recomendado porque aproximadamente 25% dos pacientes com tumores prostáticos apresentam-se com níveis de PSA abaixo de 4,0 ng/mL (7).

A Associação Americana de Urologia (AUA), a Sociedade Brasileira de Urologia (SBU) e a Sociedade Americana de Câncer (ACS) recomendam a triagem anual com exame digital da próstata e PSA sérico em pacientes com mais de 50 anos e com expectativa de vida acima de 10 anos. O screening para homens a partir dos 40 anos refere-se aqueles com história familiar de caP (dois ou mais parentes de primeiro grau) e indivíduos da raça negra (advindos da população negra norte-americana) (12).

O diagnóstico do caP é realizado pelo estudo histopatológico do tecido obtido pela biópsia da próstata, que deve ser considerada sempre que houver anormalidades no toque

retal, na dosagem do PSA ou em ambos. O laudo anatomopatológico deve fornecer o número de fragmentos positivos, sua localização, a porcentagem de tumor em cada um e a graduação histológica do sistema de Gleason, cujo objetivo é informar sobre a provável taxa de crescimento do tumor e sua tendência à disseminação, além de auxiliar na determinação do tratamento ideal para o paciente (9).

Embora o PSA não seja câncer específico, podendo estar aumentado em outras doenças prostáticas, é considerado um dos melhores marcadores tumorais disponíveis atualmente (13, 14).

1.2 Antígeno Prostático Específico (PSA)

1.2.1 História do Descobrimento

O antígeno prostático específico foi descoberto simultaneamente por vários grupos de pesquisadores. A primeira descrição do PSA foi feita no Japão em 1971 e o nome atribuído foi gama-seminoproteína (15). Em 1973, Li and Beling isolaram e purificaram uma proteína de 31 KDa e a chamaram de antígeno E1 com base na sua mobilidade na eletroforese convencional (16). Em 1978, Sensabaught *et al* isolaram uma proteína altamente imunogênica, específica do sêmen, com vários resíduos de açúcar e denominaram-na de p30, baseado em seu peso molecular (17). Em 1979, Wang *et al* purificaram e caracterizaram uma proteína, a qual chamaram de antígeno prostático específico (18). Papsidero *et al* desenvolveram o primeiro teste sorológico para PSA utilizando anticorpos policlonais e propuseram o seu uso como marcador tumoral da próstata (19). Graves *et al* desenvolveram um teste de aglutinação com partículas de látex para a detecção do PSA e propuseram usá-lo como marcador forense para casos de estupro (20). Após o isolamento do gene que codifica o PSA, verificou-se que todos os pesquisadores estavam estudando a mesma proteína, atualmente chamada de antígeno prostático específico.

1.2.2 Bioquímica do PSA

O PSA é uma glicoproteína de cadeia simples de 240 resíduos de aminoácidos e quatro cadeias laterais de carboidratos. Noventa e três por cento da sua composição são peptídeos e 7% são carboidratos, sendo que 4,84% hexose, 2,87% hexosamina e 0,25% ácido siálico (21, 22).

É homólogo às proteases da família das calicreínas. É considerado uma serino-protease devido ao mecanismo de clivagem proteolítica envolvendo um resíduo de serina no sítio ativo (21).

Até recentemente, apenas três calicreínas tissulares haviam sido identificadas: hK1 (calicreína humana renal/pancreática), hK2 (calicreína glandular) e hK3 (PSA). No entanto, a clonagem e sequenciamento do cDNA do genoma humano revelaram um total de quinze genes de calicreínas tissulares no cromossomo 19q 13.3-q13.4, que são codificados por cinco éxons de tamanho similar e possuem 40% a 80% de homologia no sequenciamento (23).

Inicialmente, acreditava-se que o PSA era produzido exclusivamente pelo epitélio prostático, porém estudos indicaram que a expressão do PSA não é tecido específica. O PSA foi detectado por imunohistoquímica no endométrio, glândulas sudoríparas, glândulas uretrais, periuretrais e anais masculinas, tumores de mama, adenocarcinoma de pulmão, neoplasma de glândulas salivares entre outros tumores (24).

O PSA é secretado no líquido seminal em altas concentrações. No fluido seminal a concentração varia de 0,5 a 5 mg/mL e no soro de 0 a 4 ng/mL (17). No sêmen, sua principal função é liquefazer o coágulo seminal após a ejaculação e permitir o movimento dos espermatozoides no trato genital feminino.

Qualquer alteração na arquitetura da glândula prostática permite que maiores concentrações de PSA entrem na circulação (25, 26). Estudo realizado por Stamey *et al* mostrou que o tecido prostático canceroso libera 30 vezes mais PSA na circulação que o tecido normal (27). Infelizmente, outras doenças da próstata como a hiperplasia prostática benigna e inflamação crônica também causam aumento do PSA liberado na circulação, diminuindo a utilidade do PSA como teste diagnóstico (26).

Além do PSA, hK2 e hK4 parecem ser expressos primariamente na próstata e são regulados por andrógenos. Estudos indicam que hK2 e, possivelmente hK4, embora hK4 seja expressa em muitos baixos níveis, podem ser úteis como marcadores de câncer de próstata (23).

Anticorpos monoclonais anti-PSA utilizados em imunoenaios podem reagir cruzadamente com a hK2, por esta ter um alto grau de homologia com o PSA e estar presente em altas concentrações. Desta forma, estes ensaios podem superestimar os níveis de PSA presentes no soro (28).

1.2.3 Formas moleculares do PSA

Molecularmente, o PSA é um gene de 6 Kb produzido no cromossomo 19 com massa molecular de 30 KDa por imunoeletroforese ou 32 a 34 KDa por gel filtração e gel eletroforese. Embora publicações iniciais sugerissem uma seqüência de 240 aminoácidos, análises mais recentes citam 237 aminoácidos com múltiplas pontes dissulfeto em sua forma nativa, semelhante às presentes na molécula da quimotripsina. A molécula de PSA é formada por 8% de carboidratos composta de três cadeias O e uma cadeia N oligossacarídicas. Existe uma considerável micro heterogeneidade na glicosilação do PSA, resultando, no mínimo, em cinco pontos isoelétricos variando de 6,8 a 8,0. A maior isoforma tem ponto isoelétrico de 6,9 (29, 30). Acredita-se que esta heterogeneidade pode ser causada pelo diferente conteúdo de ácido siálico contido nas cadeias de carboidratos e não pela variabilidade no conteúdo de aminoácidos da molécula (30).

Isono *et al* pesquisaram a heterogeneidade do PSA em amostras com presença e ausência de neoplasia através de análise de massa molecular, sequenciamento de aminoácidos, glicosilação e ponto isoelétrico, estabelecendo um catálogo de formas moleculares de PSA. Os seguintes grupos foram descritos: grupo gp28: contém a proteína inteira do PSA (resíduos de aminoácidos 1 – 237), mais um resíduo de carboidrato; grupo p26: contém a proteína total do PSA, sem qualquer resíduo de carboidrato; grupo gp22: contém os resíduos de PSA 1 – 182, mais um resíduo de carboidrato; grupo gp18: contém os resíduos de PSA 1 – 145 mais um resíduo de carboidrato; grupo gp12: contém os resíduos de PSA 1 -85 mais um resíduo de carboidrato; os peptídeos p16, p10 e p6 têm os aminoácidos N-terminais, que correspondem às posições 86, 146 e 183, na seqüência do PSA, respectivamente; e o grupo p 20: contém peptídeos que começam com resíduos entre

as posições 56 e 61 na seqüência do PSA. Este grupo representa novas formas de peptídeos que não haviam sido descritas anteriormente. Esta extensiva e sistemática análise das proteínas e fragmentos do PSA demonstrou a existência de muitas formas peptídicas, incluindo variações na glicosilação e identificando novos produtos de digestão do PSA, que correspondem a novos sítios de clivagem (31).

Diferenças significativas foram encontradas nos padrões de glicosilação entre o PSA derivado de tumores e de tecidos normais. Os fragmentos de PSA que têm aminoácidos N terminais correspondendo às posições 55 e 58 foram relacionados ao PSA derivado de HPB; além disso, formas de PSA de pequena massa molecular não são detectáveis em materiais relacionados ao caP, em especial as formas de PSA p16 e gp12, que são produzidas pela clivagem entre os resíduos dos aminoácidos 85 e 86. É possível que estes resultados devam ser usados para melhorar o diagnóstico de câncer de próstata (31).

Durante a biossíntese e processamento do PSA, várias isoformas de PSA são formadas. O PSA é sintetizado como pré-pró-PSA com uma seqüência líder de 17 aminoácidos que é clivada, formando o pró-PSA enzimaticamente inativo. O pró-PSA é secretado no lúmen dos ductos prostáticos e o pró-peptídeo é removido pela calicreína humana 2 ativada. O PSA inteiro de 237 aminoácidos é enzimaticamente ativo e, após a difusão na corrente circulatória, ele, rapidamente, liga-se à α 1 antiqumotripsina, formando os complexos do PSA (32).

A maioria do PSA sérico é complexado com inibidores de proteases, como α 1 antiqumotripsina e α 2 macroglobulina. Entretanto, formas de PSA não complexadas ou livres existem no soro e representam uma distribuição bastante heterogênea de isoformas moleculares, incluindo o PSA clivado internamente (nicked), pró-PSA e várias variantes glicosiladas (33).

O PSA clivado internamente (nicked), também chamado de antígeno prostático específico benigno (BPSA) representa uma subpopulação de PSA livre presente no soro de homens com PSA aumentado, mas sem diagnóstico de câncer de próstata (34). Já, o pró-PSA tende a ser maior em pacientes com câncer comparado com pacientes sem neoplasia (32).

O PSA purificado do plasma seminal consiste de 60 a 70% de enzima ativa. A clivagem do PSA entre os resíduos 145 e 146 leva a inativação da enzima. Esta forma inativa continua ligada por pontes dissulfeto e migra juntamente com o PSA intacto na eletroforese (SDS- PAGE). Sob condições redutoras na eletroforese, os fragmentos de PSA separam-se, e formas de baixo peso molecular são reveladas. Devido a este fato, na

preparação de um padrão de PSA purificado, a identificação e análise da forma clivada e outras formas menores da molécula de PSA são importantes, porque provavelmente serão enzimaticamente inativas e não se ligarão aos inibidores de proteases (29, 33).

Tanto a forma enzimaticamente ativa quanto a forma clivada do PSA são referidas como PSA livre. Presume-se que o PSA livre no soro é a forma inativa que não se complexa com inibidores de protease, como α 1 antiqumotripsina, α 2 macroglobulina ou inibidor da proteína C. Também é possível que o PSA não complexado possa ser a calicreína humana 2 (35).

1.2.4 Complexos do PSA

O PSA forma diferentes complexos no plasma seminal e no soro, como visto na tabela 2. A formação desses complexos irá afetar os níveis de PSA determinados pelos imunoensaios.

Tabela 2 – Complexos do PSA.

Complexo	Descrição
PSA total	Todas as formas imunodetectáveis no soro, principalmente PSA livre e PSA-ACT
PSA livre	PSA não-complexado; pode ser proteoliticamente ativo ou inativo no plasma seminal, no soro somente inativo
PSA-ACT	PSA covalentemente ligado a α 1 antiqumotripsina, sinônimo de PSA complexado
PSA-MG	PSA covalentemente ligado e encapsulado pela α 2 macroglobulina; não detectado em imunoensaios
PSA-PCI	PSA covalentemente ligado ao inibidor da proteína C; menor componente do plasma seminal, não detectado no soro
PSA-AT	PSA covalentemente ligado a α 1 antitripsina; apenas vestígios no soro
PSA-IT	PSA covalentemente ligado o inibidor inter- α tripsina; apenas vestígios no soro

O PSA forma um complexo com o inibidor da proteína C (PCI), uma glicoproteína de cadeia simples com 57 KDa, presente em altas concentrações no plasma seminal e não detectado no soro (35, 36).

No soro, o PSA pode formar complexos estáveis com dois inibidores de proteases, a α 2 macroglobulina (MG) e a α 1 antitripsina (ACT) (37-39). Quando o PSA é complexado com a MG, sua molécula fica completamente encapsulada, sem epítomos acessíveis para imunodeteção (40).

O PSA liga-se covalentemente a α 1 antitripsina numa proporção 1:1. A taxa de complexação da ACT no soro é baixa quando comparada a outras proteases. O complexo PSA-ACT é muito estável, mas a taxa de renovação no sangue é mais baixa do que a do complexo PSA-MG. A meia-vida do complexo PSA-ACT no soro é de 2 a 3 dias. Ao contrário do PSA, o *clearance* do complexo PSA-ACT não é renal. Receptores de enzimas hepáticas podem eliminar os complexos de ACT e este é um possível mecanismo de *clearance* do PSA-ACT. Foi reportado que a proporção de PSA-ACT em pacientes com câncer de próstata é maior do que em pacientes com HPB (37, 39, 41). Isto pode ser devido ao fato que as células epiteliais prostáticas que produzem PSA também produzem ACT (42). ACT é normalmente excretada do fígado para o soro. Células cancerosas podem produzir ACT, enquanto células hiperplásicas não. A proporção de PSA livre é maior na HPB do que no caP, apesar de ter excesso de ACT e MG no soro. A forma livre é enzimaticamente inativa e não reage com inibidores de proteases. Quando o PSA é complexado com ACT, alguns epítomos próximos ao sítio ativo são mascarados, enquanto outros ficam disponíveis para a ligação de anticorpos anti-PSA. Imunoensaios envolvendo anticorpos dirigidos contra estes epítomos mascarados falham na detecção do complexo PSA-ACT (43, 44).

Um estudo realizando o mapeamento de epítomos lineares indicou a presença de seis grandes regiões antigênicas na molécula do PSA (44).

Informação sobre as localizações dos maiores epítomos na superfície do PSA, podem esclarecer as propriedades antigênicas da proteína e detalhes específicos das interações do PSA com anticorpos, levando ao desenvolvimento de anticorpos com características desejáveis para testes diagnósticos, como maior especificidade, ligação equimolar do PSA e α 1 antitripsina e associação específica apenas com o PSA livre (44).

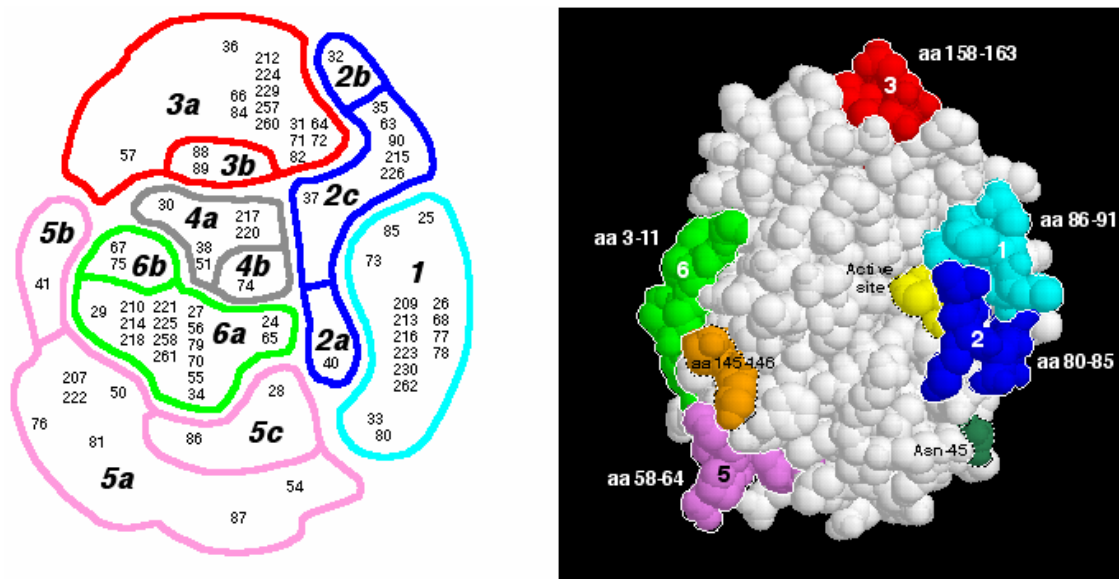


Fig.1. Estrutura tridimensional do PSA. Números indicam os códigos e os seis grupos de anticorpos.

Fonte: <http://isobm.org/TDhome.htm>.

1.2.5 Possíveis funções do PSA na patogênese do câncer de próstata

O PSA possui capacidade proteolítica no micro-ambiente tumoral, podendo clivar proteínas que podem influenciar o desenvolvimento ou a progressão do caP. Uma proteína que pode ser clivada pelo PSA é a IGFBP-3 (insulin-like growth factor binding protein-3), que é produzida por células epiteliais das próstata. A IGFBP-3 é a maior proteína sérica transportadora da IGF-1 (insulin-like growth factor-1). O IGF-1 é um fator de crescimento para o caP e o aumento dos seus níveis plasmáticos tem se mostrado um fator de risco para o caP (23, 45, 46).

O PSA também pode clivar proteínas que interferem na migração celular e metástases. Por exemplo, o PSA possui a capacidade de clivar glicoproteínas da matriz extracelular, como a fibronectina e a laminina e, estudos *in vitro* têm mostrado que a micro invasão de células LNCaP (células proliferativas de caP) podem ser inibidas por anticorpos neutralizantes de PSA. A própria matriz extracelular pode ter efeitos na produção de PSA, uma vez que as células de caP cultivadas sobre a matriz extracelular secretam mais PSA do que células que crescem em frascos de culturas. O PSA e a hK2 podem clivar e ativar o

ativador de plasminogênio tipo uroquinase, o qual pode aumentar a invasão das células tumorais, embora a hK2 pareça ter maior capacidade para esta atividade que o PSA (23, 47).

O PSA tem uma potente atividade mitogênica *in vitro* para os osteoblastos, a qual pode ser mediada pela ativação do TGF- β (Transforming Growth Factor- β) ou por modulação proteolítica dos receptores de superfície dos osteoblastos. Estes achados sugerem o papel do PSA nas metástases ósseas e nas respostas osteoblásticas. Entretanto, o PSA também pode degradar o PTHrP, o que anula os efeitos mitogênicos desta proteína sobre os osteoblastos (23, 48, 49).

Em contraste às atividades promotoras de tumor, o PSA pode ter efeitos antiangiogênicos pela clivagem do plasminogênio gerando peptídeos com atividade semelhante à angiostatina, ou por inativação dos indutores angiogênicos FGF-2 (Fibroblast growth factor 2) e VEGF (Vascular Endothelial growth factor) (23).

Estes estudos indicam mecanismos pelos quais o PSA pode ter efeitos promotor ou inibidor de tumor. Entretanto, *in vivo*, estes mecanismos ainda precisam ser estabelecidos, esclarecendo se o PSA é um simples marcador tumoral ou se tem alguma habilidade intrínseca de alterar a progressão do tumor (23).

1.2.6 Fatores que alteram a concentração do PSA

Vários fatores clínicos e analíticos podem influenciar a concentração do PSA total (50).

A ressecção transuretral da próstata para HPB eleva acentuadamente os níveis séricos de PSA no pós-operatório, e sua concentração gradualmente retorna ao valor basal em 30 dias. Ao contrário, a ressecção de tecidos malignos possui pouco efeito na concentração do PSA (21).

A resposta inflamatória a infecções bacterianas (prostatite) pode causar aumento transitório na concentração sérica do PSA. Potts, avaliando a incidência da inflamação prostática assintomática em homens com PSA elevado, descreveu que entre 122 pacientes assintomáticos com idade média de 63 anos e PSA entre 4,1 e 29 ng/mL, 51 (42%) tinham

sinais laboratoriais de prostatite (leucócitos em secreção prostática após massagem). Após o tratamento da prostatite, 42% apresentaram PSA normal (51).

A HPB é responsável por grande parte das elevações do PSA. Aos 40 anos de idade, a HPB está presente em 8% dos homens, aumentando para 60% aos 70 anos e para 90% em homens acima dos 80 anos. O PSA aumenta paralelamente com o aumento do volume da próstata e a idade (3,2% por ano) (52).

A variação nos níveis de PSA causada pela ejaculação é controversa, porém estudo realizado em homens com idade entre 49 e 79 anos, mostrou um aumento de 1,3 ng/mL nos níveis de PSA uma hora após a ejaculação, com retorno gradual ao basal dentro de 24 a 48 horas (50, 53).

O peso corpóreo pode estar associado aos níveis de PSA. Em um estudo de corte, o aumento do índice de massa corporal está associado com valores mais baixos de PSA. A implicação clínica desta observação é incerta (54).

O toque retal parece não influenciar a concentração do PSA total de forma clinicamente significativa na maioria dos estudos, mas a concentração sérica do PSA livre pode aumentar pela manipulação prostática ao toque (12, 21). É sugerido um intervalo de 48 horas entre o toque retal e a coleta (21, 53). A biópsia prostática e a cistoscopia podem causar importantes elevações no PSA, e este deve ser realizado ou repetido com o intervalo mínimo de 4 semanas (21, 25).

Atividades físicas intensas e certos exercícios (bicicleta, cavalgadas) podem determinar elevações nos valores de PSA, embora o real impacto destas atividades seja de difícil interpretação. Sugere-se intervalo de 24 horas entre a realização destas atividades e a coleta da amostra (25).

O nível plasmático do PSA pode ser alterado por algumas terapias farmacológicas. A finasterida é um inibidor da 5-alfa-redutase utilizada para o tratamento de próstatas volumosas. Impede a conversão da testosterona à dihidrotestosterona (DHT), reduzindo o nível do último em 80% a 90%, com redução de 20% no tamanho da próstata. Após seis meses de uso, a finasterida provoca redução média de 50% nos valores de PSA, sendo que para fins de triagem deve-se multiplicar o resultado do PSA por dois em pacientes em uso deste medicamento (55, 56).

O uso de testosterona aumenta o PSA total em aproximadamente 0,3 a 0,43 ng/mL. Está bem estabelecido que o desenvolvimento da HPB requer a presença de andrógenos e

que a diminuição da testosterona química ou por castração reduz o volume prostático. Estudos demonstram baixa frequência de caP em associação com a terapia de reposição com testosterona. Apesar da controvérsia, não existem evidências de que a testosterona tenha papel causador no caP (57).

Variações metodológicas na determinação do PSA sérico também podem causar variações na sua concentração. Embora o uso de padrões internacionais vise à padronização dos ensaios equimolares de PSA total, diferenças decorrentes de métodos diversos devem ser ponderadas na avaliação da causa de variação nos níveis de PSA (58). Estas variações podem ser devido à diferença no design do teste (por exemplo: a utilização de anticorpos monoclonais e policlonais, o tipo de fase sólida utilizada, se o teste é tipo sanduíche ou competitivo, pH e tempos de incubação), as diferentes isoformas de PSA usadas para a produção de anticorpos anti-PSA, a especificidade dos anticorpos, a composição do calibrador, os valores de PSA estabelecidos para o calibrador ou a composição do diluente utilizado (24, 59).

A variação biológica do PSA possui implicações no screening, diagnóstico e monitoramento do caP. Medidas isoladas podem não ser suficientemente precisas para o screening e diagnóstico. Amostras em replicata e o cálculo da concentração média podem melhorar a precisão do teste (50).

Um estudo de resultados prévios de PSA em 3568 homens com concentração sérica de PSA abaixo de 2 ng/mL durante um quarto round de screening, estimou que a média da variação analítica foi aproximadamente de 6% e a média da variação biológica foi menor que 14%. Uma mudança na concentração do PSA maior que 30% em homens com PSA inicialmente abaixo de 2 ng/mL é indicativo de uma verdadeira alteração que não a biológica (54).

Apesar de infreqüentes, os anticorpos heterófilos, imunoglobulinas que ocorrem naturalmente em certos pacientes, podem interferir nos imunoensaios, incluindo a determinação do PSA (59, 60).

Baseado nos aspectos acima revisados, a elevação isolada do PSA deve ser confirmada quatro a seis semanas após o primeiro teste antes da indicação de biópsia prostática (61).

1.3 Rastreamento para o câncer de próstata

As justificativas que norteiam a detecção precoce do caP, assim como de qualquer outra topografia, é que quanto mais inicialmente a doença for diagnosticada, maiores serão as chances de cura, além de permitir um tratamento menos agressivo e mutilante. A detecção precoce do caP poderia reduzir os altos custos decorrentes do tratamento do câncer em estágios avançados ou da doença metastática (9).

Entretanto, ainda há controvérsias sobre os méritos da detecção precoce do caP. Enquanto a AUA (American Urological Association) e a NACB (National Academy of Clinical Biochemistry) concordam com a ACS (American Cancer Society) sobre a detecção precoce do caP, outras organizações (USPTF - United States Preventive Task Force; ACP - American College of Physicians; NCI - National Cancer Institute) discordam sobre os benefícios do rastreamento para o caP. Argumentos contra o rastreamento são baseados no fato de não haver evidências conclusivas que a detecção e tratamento precoces influenciam na mortalidade, enquanto os tratamentos padrão para caP órgão confinado são associados com efeitos adversos significativos e frequentes. A maior preocupação é que a triagem irá resultar em excesso de diagnósticos e tratamento de estágios precoces da doença que podem não ser clinicamente significativos (10, 12).

O rastreamento de homens assintomáticos para o caP está associado a danos importantes, como os resultados falso-positivos, a ansiedade gerada por estes resultados, o número de biópsias desnecessárias e as complicações potenciais (9).

Ford *et al* demonstrou em seu estudo que resultados falsos-positivos de triagem para caP reduzem em quase duas vezes as chances do paciente retornar para posterior acompanhamento, quando comparado com homens com rastreamento prévio negativo (62).

A ACS, a AUA e a SBU (Sociedade Brasileira de Urologia) recomendam o exame anual com o toque retal e a dosagem do PSA sérico em homens com 50 anos ou mais e com uma expectativa de vida de ao menos 10 anos. Para homens com descendência afro-americana e com história familiar de caP, a recomendação é iniciar o exame aos 40 anos.

1.3.1 PSA como teste de triagem para câncer de próstata

Um marcador tumoral ideal deve apresentar as seguintes características: deve ser específico para um tecido em particular, ou tumor ou ambos; deve ser liberado do tumor para o sangue ou urina; sua concentração no soro deve ser proporcional ao impacto do tumor ou potencial de malignidade; deve ter potencial para detecção precoce e monitoramento do câncer; deve ter uma meia-vida curta, de modo que sua concentração altere rapidamente em resposta a terapia; deve ter habilidade para indicar a presença do tumor antes que a detecção clínica seja possível e, deve ter 100% de sensibilidade e 100% de especificidade (22). O PSA preenche alguns, mas não todos estes critérios.

A falta de especificidade e a inabilidade do PSA para determinar a agressividade do tumor representam as mais sérias limitações do PSA na detecção do caP. O valor de referência convencional para o PSA é de 0 a 4 ng/mL, mas não há um valor de corte normal aplicável a todos os homens ou a todos os testes de PSA. Aproximadamente 25% dos homens com caP possuem valores de PSA abaixo de 4 ng/mL, enquanto mais de 50% dos homens com HPB terão valores de PSA acima deste limite (12).

O PSA difunde-se para a circulação sistêmica em elevadas concentrações somente depois de mudanças significativas na arquitetura da glândula prostática. A menos que estas mudanças ocorram, um paciente com caP não terá seu PSA sérico aumentado. É estimado que 38 a 48 % dos pacientes com doença órgão-confinada, os candidatos ideais para terapia com melhores chances de cura, possuem PSA dentro dos valores de referência (22).

O ponto de corte tradicionalmente utilizado para o teste PSA é de 4 ng/mL. Nesta concentração, estima-se que a sensibilidade do teste PSA gira em torno de 70 a 80%, enquanto a especificidade em torno de 60 a 70% (10).

Utilizando o ponto de corte convencional de 4 ng/mL para identificar pacientes que deverão fazer biópsia, foi estimada uma perda de 82% dos caP em homens jovens e 65% em homens idosos (63).

Catalona *et al* defendem, para homens de todas as idades, o uso de um ponto de corte de 2,5 ng/mL, devido ao aumento na detecção de cânceres curáveis, sem aumentar a proporção de detecção de caP inofensivo (64).

Desta forma, não existe um ponto de corte claro para o teste PSA que diferencie entre normal e anormal. Um estudo demonstrou que, mesmo utilizando um valor de corte de

1,1 ng/mL, perder-se-ia 17% dos tumores, sendo que 5% destes eram pouco diferenciados (10).

Diminuindo o ponto de corte do teste, aumenta-se a sensibilidade, porém se perde em especificidade, ocasionando um maior número de resultados falso-positivos e biópsias desnecessárias. Além disso, muitos cânceres detectados com a utilização de pontos de corte mais baixos podem nunca tornarem-se clinicamente evidentes, levando ao sobre diagnóstico e sobre tratamento (10).

1.3.2 Estratégias para aumentar a especificidade e sensibilidade do PSA

Cerca de 80% dos pacientes com caP apresentam, quando do diagnóstico, PSA sérico total acima de 4 ng/mL, considerado valor de corte. Por outro lado, cerca de 85% dos pacientes com HPB também terão valores acima de 4 ng/mL. Estes dados evidenciam, claramente, que o PSA total não possui acurácia diagnóstica suficiente para ser utilizado isoladamente, fornecendo um valor preditivo positivo da ordem de 50% (65).

É importante ressaltar também, que 65% a 75% dos homens com moderada elevação do PSA total não desenvolverão a doença e que aproximadamente 15% dos pacientes com caP manterão níveis normais, independente da evolução fatal (65). A partir destas constatações, várias abordagens têm sido sugeridas com a finalidade de aumentar o desempenho diagnóstico da determinação do PSA como marcador de caP e reduzir o número de biópsias desnecessárias, entre elas os cálculos da densidade e velocidade do PSA, a relação entre o PSA livre e PSA total e a adoção de valores de referência específicos para diferentes faixas etárias.

1.3.2.1 Velocidade do PSA

Consiste na medida da variação da concentração do PSA total num intervalo de tempo, em geral um ano. Possui o inconveniente da necessidade de dosagens seriadas ao longo do tempo. O seguimento deve ser realizado em um mesmo laboratório e sempre com

o mesmo método. Homens com velocidade de PSA superiores a 0,75 ng/mL/ano têm probabilidade aumentada de desenvolver caP (23, 26).

A velocidade do PSA pode ser útil no monitoramento de homens com biópsia inicial negativa, e tem sido sugerido que um ponto de corte de 0,4 ng/mL/ano seja usado para rebiopsiar estes pacientes. Também pode ser uma medida útil naqueles pacientes com PSA inicial menor que 4 ng/mL (26).

1.3.2.2 Densidade do PSA

A medida da densidade do PSA é baseada na observação que o caP pode produzir aproximadamente dez vezes mais PSA por volume de tecido prostático que condições benignas (10).

A densidade do PSA é obtida pelo cálculo da relação entre o valor numérico da concentração sérica do PSA total e o valor numérico do volume prostático, avaliado por ultra-som transretal. Tem sido considerado valor de corte 0,15 ou 15%, sendo que relações abaixo deste limite são compatíveis com HPB, e relações superiores com caP. Entretanto, a utilidade deste método como triagem é limitado devido às variações nos formatos da próstata e na razão epitélio-estroma, além do ultra-som transretal ser operador dependente.

Um estudo multicêntrico que comparou a utilidade da densidade do PSA x PSA para a detecção precoce de caP, encontrou que quase metade dos casos de caP seriam perdidos se fosse utilizado o ponto de corte de 0,15 para a realização de biópsia (23).

Outro estudo sugeriu que medir o volume da zona de transição da próstata, a área mais afetada pela HPB, pode melhorar a exatidão da densidade do PSA em homens com PSA entre 4 e 10 ng/mL. Foi demonstrado que se o ponto de corte for ajustado, 95% dos caP seriam detectados (26).

1.3.2.3 PSA ajustado para a idade

Considerando que o PSA sérico normalmente aumenta com a idade e é influenciado pela raça, valores normalizados para idade e raça foram propostos. O uso de valores de

referência idade específicos sugere um aumento na sensibilidade do PSA em homens jovens e um aumento na especificidade em homens idosos, resultando em um aumento na detecção de cânceres curáveis na população mais jovem e uma diminuição na detecção de cânceres clinicamente insignificantes em homens mais velhos, diminuindo o número de biópsias (23, 26).

O PSA ajustado para a idade mostrou aumentar a detecção de caP em homens jovens (50 – 59 anos) em 15%, embora com um aumento de 45 % no número de biópsias realizadas. Já em homens com mais de 70 anos, devido a redução de 44% no número de biópsias, quase metade dos caP órgão confinados deixaram de ser diagnosticados (26).

Tabela 3 – Valores de referência para o PSA total em diferentes faixas etárias e grupos étnicos.

Idade (anos)	Oesterling (66) (brancos) ng/mL	Morgan (67) (brancos) ng/mL	Morgan (67) (negros) ng/mL
40 – 49	0 – 2,5	0 – 2,5	0 – 2,0
50 – 59	0 – 3,5	0 – 3,5	0 – 4,0
60 – 69	0 – 4,5	0 – 4,5	0 – 4,5
70 – 79	0 – 6,5	0 – 6,5	0 – 5,5

1.3.2.4 Relação entre PSA livre e PSA total

A relação entre PSA livre e o PSA total é útil na diferenciação entre pacientes com caP e HPB e como critério de necessidade de biópsia. Frequentemente, utiliza-se 15 % como ponto de corte, mas este valor é controverso, dadas as implicações sobre a sensibilidade e a especificidade, como pode ser visto a seguir (65).

Tabela 4 - Sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e eficiência diagnóstica com diferentes níveis de relação entre PSA livre e PSA total.

Parâmetro	Relação entre PSA livre e PSA total			
	15%	17%	19%	21%
Sensibilidade	72%	76%	90%	93%
Especificidade	83%	67%	50%	50%
VPP	91%	85%	81%	81%
VPN	56%	53%	67%	75%
Eficiência	76%	73%	78%	80%

Fonte: Câncer de Próstata: recursos diagnósticos atuais. J Bras Patol. 2001 (65).

Homens com caP possuem uma menor proporção de PSA livre e isto é expresso com uma diminuição na relação PSA livre/PSA total. Estudos demonstraram que existe uma alta proporção de PSA ligado a ACT no caP e isto devido a um aumento na produção de ACT pelas células cancerosas da próstata. Outra teoria é que o PSA da HPB tem uma isoforma diferente, com múltiplas clivagens internas, originando uma estrutura tridimensional alterada que se liga, preferencialmente, a MG, não sendo detectado pelos testes convencionais(26).

Um ensaio multicêntrico prospectivo designado para investigar a utilidade da relação PSA livre/PSA total em pacientes com PSA entre 4 e 10 ng/mL demonstrou que usando uma relação PSA livre/PSA total maior que 25% para determinar biópsias, 95% dos cânceres foram detectados e 20% de biópsias desnecessárias evitadas. Já, utilizando um *cut-off* de 22%, a sensibilidade para a detecção de caP baixou para 90%, mas houve uma redução de 29% na realização de biópsias desnecessárias. Estes resultados determinaram a aprovação pelo FDA da relação PSA livre/PSA total para uso em homens com PSA entre 4 e 10 ng/mL (26).

Entretanto, um estudo demonstrou que a utilização do teste PSA livre está sendo usada de forma inconsistente. Trinta e oito por cento dos testes de PSA livre foram realizados em pacientes com PSA menor que 2,5 ng/mL ou maior que 10 ng/mL, gerando preocupação com diagnósticos errôneos e custos desnecessários (68).

1.4 Novos marcadores para o câncer de próstata

Apesar do uso do PSA como marcador para o caP, existe a necessidade de aumentar a sensibilidade e a especificidade deste antígeno, agregando novos métodos para diagnóstico, evolução e prognóstico dos pacientes com esta neoplasia.

Vários genes e suas proteínas codificadoras que possuem papel na carcinogênese e/ou progressão do caP estão sendo estudados (69). Alguns destes marcadores, que possuem potencial utilidade clínica, serão mencionados a seguir.

1.4.1 Cromogranina A (GRN-A)

GRN-A é um membro da família granina de proteínas e age como um pró-hormônio que, após proteólise, resulta na geração de múltiplos peptídeos com atividade biológica. GRN-A é estocada na maioria das células endócrinas e neuroendócrinas e é um marcador de diferenciação neuroendócrina. Os níveis séricos da GRN-A não distinguem com exatidão HPB de caP, porém se correlacionam com o estágio e grau tumoral. Além disso, este marcador é capaz de detectar células neuroendócrinas e, desta forma, identificar doenças andrógeno-independentes(69-71).

Níveis séricos elevados de GRN-A parecem predizer pobre prognóstico nos casos de caP andrógeno-independente após terapia hormonal e pode ser um marcador intermediário de progressão precoce para esta forma de doença e um possível preditor de morte precoce (69-71).

Duas fraquezas da GRN-A como marcador são que nem todos os tumores de próstata contêm células neuroendócrinas, além de ser incapaz de detectar estágios precoces da doença. Entretanto, estudos sugerem que a GRN-A é capaz de monitorar o sucesso do tratamento, predizer o desfecho da doença e predizer o prognóstico de caP andrógeno-independente. Quando combinada com o PSA, níveis elevados de GRN-A podem efetivamente predizer um pobre prognóstico após terapia hormonal (69-71).

1.4.2 Glutathione S-transferase π 1 (GSTP1)

GSTP1 é um membro da família das glutathionas transferases cuja função é proteger as células dos danos oxidativos pela neutralização dos radicais livres. Estudos demonstram uma alta sensibilidade deste marcador para detectar a presença de neoplasia intraepitelial prostática e câncer de próstata, além da capacidade de distingui-las da HPB (69, 72, 73).

1.4.3 Prostate Stem Cell Antigen (PSCA)

PSCA é um antígeno glicosilfosfatidilinositol de superfície celular encontrado predominantemente na próstata e possui funções como proliferação ou transdução de sinal. O papel biológico do PSCA no caP não é claro, porém este marcador é expresso predominantemente na próstata e apresenta potencial como alvo terapêutico. Outros pontos fortes do PSCA como marcador para caP incluem níveis elevados na maioria dos tumores de próstata e uma correlação entre sua elevação e a elevação do score de Gleason e tumores em estágio avançado. A expressão do PSCA é mantida no caP andrógeno-independente e é fortemente expresso na doença metastática. Este marcador apresenta como pontos fracos poucos estudos apoiando seu valor como marcador clínico, a necessidade de métodos melhores de quantificação e a incerteza de que sua dosagem acrescenta informação ao teste de PSA (69, 74).

1.4.4 Antígeno prostático específico de membrana (PSMA)

Descoberto em 1987, PSMA é uma glicoproteína transmembrana expressa na superfície das células epiteliais prostáticas que possui várias atividades enzimáticas. Na próstata normal, a proteína encontra-se no citosol e se desloca para a membrana plasmática nos casos de caP (75, 76).

Numerosos estudos têm demonstrado que os níveis séricos do PSMA estão elevados no câncer primário de próstata e na doença metastática, com uma prevalência de mais de 90%; também que seus níveis podem ser detectados no tecido tumoral e no soro com a utilização de vários anticorpos. Todavia, níveis séricos elevados do PSMA são

encontrados em homens e mulheres saudáveis e em pacientes com câncer de mama, questionando sua utilidade como marcador clínico para o diagnóstico precoce do caP. Outro ponto fraco é que níveis séricos do PSMA aumentam com o avanço da idade, o que pode ser um fator de confusão nesta doença que frequentemente ocorre em idades mais avançadas (26, 69, 75, 76).

1.4.5 TERT (transcriptase reversa da telomerase)

O gene TERT codifica a transcriptase reversa da telomerase que mantém os finais teloméricos dos cromossomos e tem sido associado à senescência e câncer. A maioria dos estudos refere ausência deste marcador na próstata normal e hiperplásica. A maior atividade do gene TERT parece estar correlacionada com doença pouco diferenciada e existem evidências para uma correlação com grau e estágio tumoral e mortalidade e doença recorrente (69, 77).

Um ponto fraco deste marcador é que ele não é próstata específico e, na maioria dos estudos, os testes foram conduzidos no tecido prostático, requerendo o material da biópsia para a realização do teste (69, 77).

1.4.6 Calicreína humana tipo 2 (hK2)

HK2 pertence à família das calicreínas humanas e assim como o PSA é encontrado na próstata. Sua seqüência de aminoácidos possui 80% de homologia com o PSA (26) .

A hK2 possui atividade de protease e pode estar envolvida na ativação do PSA. Estudos iniciais imunohistoquímicos demonstraram que a expressão da hK2 nas células do câncer de próstata está aumentada quando comparado com o tecido benigno, além de se correlacionar com maiores graus de Gleason (26).

A concentração sérica da hK2 é aproximadamente 100 vezes menor que a do PSA e, ao contrário deste, 81 % a 96 % está na forma livre. Estudos iniciais mostraram um aumento da hK2 em pacientes com caP, mas a determinação isolada da hK2 não é mais discriminatória que o uso do PSA (26).

1.4.7 Antígeno Prostático Específico Precoce (EPCA)

Um imunoensaio desenvolvido por Paul *et al* para determinar se anticorpos anti-EPCA poderiam ser utilizados clinicamente para a detecção de caP demonstrou uma diferença estatisticamente significativa entre pacientes com caP e doadores saudáveis. Estudos prévios demonstraram que anticorpos dirigidos contra o EPCA coram positivamente as biópsias negativas de homens que, 5 anos mais tarde, foram diagnosticados com caP. Este marcador parece ser mais uma ferramenta para o diagnóstico precoce do caP, porém estudos maiores são necessários para conclusões definitivas (78).

1.4.8 Auto-anticorpos

1.4.8.1 Auto-anticorpos como preditores de doença

Anticorpos podem refletir a presença, a natureza e a intensidade da resposta imune. Desde que nas doenças auto-imunes a resposta auto-imune é por si só, parte da doença, é possível a utilização de auto-anticorpos como marcadores da sua atividade. Auto-anticorpos podem ser detectados em doenças com um longo período pré-clínico. Enquanto seu valor prático é compreendido em algumas condições clínicas, ainda são subutilizados na maioria das doenças. O reconhecimento dos potenciais clínicos dos auto-anticorpos e a identificação de populações apropriadas para a utilização dos mesmos como teste de triagem, podem engrandecer a prática clínica (79).

O reconhecimento que tumores estimulam a produção de auto-anticorpos contra proteínas celulares autólogas denominadas antígenos associados ao tumor (TAAs) abriu as portas para a possibilidade de que auto-anticorpos podem ser utilizados como ferramentas sorológicas para o diagnóstico precoce e manejo do câncer. Evidências sugerem que cada tipo de câncer possui uma assinatura de auto-anticorpos que reflete a natureza do processo maligno no órgão afetado (80).

A utilização de auto-anticorpos na prática clínica já está bem estabelecida em pacientes com doenças auto-imunes como lúpus eritematoso sistêmico, escleroderma,

artrite reumatóide, síndrome de Sjögren, diabetes tipo I, tireoidites, adrenalites, doença celíaca entre outras (79, 81, 82).

Recentemente, tornou-se claro que auto-anticorpos séricos circulantes reagentes contra proteínas intracelulares não são uma característica única das doenças sistêmicas auto-imunes ou reumáticas, mas também estão presentes em uma variedade de doenças onde o sistema imune esteja envolvido, incluindo dermatite atópica, síndrome da fadiga crônica, cistite intersticial, doença inflamatória ocular e câncer (82).

A natureza oncoprotéica da maioria dos antígenos associados a tumores levou a hipótese que auto-anticorpos associados ao câncer são repórteres ou sentinelas imunológicos que identificam mecanismos celulares aberrantes associados com a tumorigênese. Isto foi primeiramente sugerido pela observação de que estes auto-anticorpos frequentemente aumentam durante a transição entre condições que possuem um alto risco para o câncer e o real desenvolvimento da malignidade. Como exemplo, cita-se a transição da doença crônica hepática ao carcinoma hepatocelular que está associada ao aparecimento de auto-anticorpos anti-proteínas ligadas à sobrevivência e proliferação celular, que também são altamente expressas em tumores. Esta transição também está associada com o aumento dos títulos e mudanças na especificidade dos anticorpos contra proteínas nucleares específicas (82).

Ao contrário das doenças auto-imunes sistêmicas, onde a presença de um auto-anticorpo particular pode ter valor diagnóstico, auto-anticorpos associados ao câncer, quando avaliados individualmente, têm valor diagnóstico limitado por várias razões. Primeiro, a frequência de auto-anticorpos específicos para um antígeno em particular, numa dada população com câncer, é relativamente baixa, entre 10 a 30% . Outra razão citada, é que certos auto-anticorpos têm baixa especificidade porque aumentam como consequência de eventos moleculares que são comumente associados com câncer e outras doenças. Entretanto, a utilização da resposta imune aos tumores provê uma oportunidade única para o desenvolvimento de novas ferramentas para a detecção sorológica do câncer (82).

1.4.8.2 Auto-anticorpos anti-prostassoma

Prostassomas são grânulos secretores sintetizados, estocados e secretados pelas células do epitélio prostático normal ou neoplásico liberados no plasma seminal. Larsson *et al* demonstraram que auto-anticorpos anti-prostassoma podem ser marcadores para caP . O estudo demonstrou que altos títulos de auto-anticorpos anti-prostassoma são compatíveis com menor agressividade do tumor, podendo ser interpretado como um efeito protetor da resposta imune. Outro achado é que estes anticorpos não se correlacionam com os valores séricos do PSA (83).

1.4.8.3 Auto-anticorpos anti-PSA

Os auto-anticorpos no câncer de próstata podem refletir a ativação de genes e seus produtos protéicos que possuem um importante papel na tumorigênese da próstata, incluindo várias proteínas que participam na resposta celular ao stress oxidativo. Existem evidências que o aumento do stress oxidativo celular, associado com um ambiente pró-inflamatório, possuem um importante papel na carcinogênese da próstata. Esta evidência tem origem em observações de ensaios clínicos com anti-oxidantes como o licopeno, a vitamina E e o selênio que sugerem que os anti-oxidantes podem limitar a progressão do caP; também na observação de que os andrógenos estimulam o crescimento das células da próstata pelo aumento do stress oxidativo e que o tecido do caP manifesta stress oxidativo aumentado e o desenvolvimento do caP está associado com a perda precoce da enzima antioxidante glutathione S-transferase 1 (GSTP1), deixando as células da próstata vulneráveis ou tolerantes ao dano oxidativo(82).

Células tumorais parecem desenvolver uma alta resistência à morte celular induzida pelo stress oxidativo, como evidenciado pela sua habilidade de sobreviver sob estas condições e a outros fatores como hipóxia, calor e ausência de fatores de crescimento. Esta resistência está associada com a super expressão de proteínas de sobrevivência e antioxidantes em tumores, o que pode acarretar a perda da tolerância imune e provocar a resposta dos auto-anticorpos (82).

Considerando que os auto-anticorpos associados ao tumor são considerados sentinelas ou repórteres da resposta imune ao desenvolvimento do tumor, eles são

excelentes candidatos a biomarcadores para o câncer. Sua persistência e estabilidade no soro de pacientes com câncer é uma vantagem sobre outros marcadores, incluindo os próprios antígenos associados ao tumor, que são liberados pelo tumor, porém rapidamente degradados (82).

Estudos iniciais demonstraram a presença de auto-anticorpos em pacientes com caP, porém devido ao desconhecimento do significado destes auto-anticorpos, estes foram considerados como uma resposta imune inespecífica. Entretanto, nos últimos anos, reapareceu um novo interesse na caracterização dos auto-anticorpos no câncer de próstata.

Este interesse levou a identificação e caracterização de inúmeros candidatos a antígenos associados ao tumor. Entre estes antígenos, estão proteínas que participam das vias de stress e sobrevivência e são altamente expressas nos tumores da próstata, entre eles, o PSA, 5 α -redutase, p53, vWF entre outros (82).

A frequência de muitos destes auto-anticorpos no caP, em outras condições benignas e mesmo em indivíduos saudáveis não foram determinadas (82).

Zisman e colaboradores descreveram a presença de auto-anticorpos anti-PSA no soro de pacientes com HPB, sugerindo que um processo auto-imune pode ter papel no seu desenvolvimento. Outras hiperplasias como a da tireóide (doença de Graves), timo (miastenia gravis), e desordens linfóides benignas no pulmão já demonstraram ser induzidas por um processo auto-imune (84).

Auto-anticorpos para outras serino-proteases foram relatados em algumas doenças auto-imunes como granulomatose de Wegener, poliartrite nodosa, síndrome de Churg-Strauss e doença inflamatória intestinal (85, 86).

Auto-anticorpos anti-PSA já foram encontrados em pacientes com câncer de próstata e foi constatado que estes anticorpos podem interferir nos imunoenaios para o PSA, dependendo do desenho do ensaio. Um estudo apresentou uma amostra de paciente com HPB que mostrou discordância entre valores de PSA detectados por diferentes ensaios. No soro deste paciente foi detectado um complexo PSA-IgG-PSA o qual pode ter bloqueado os epítomos específicos do PSA, ocasionando resultados mais baixos que o esperado (24).

Stein *et al* demonstraram em estudo que os auto-anticorpos anti-PSA estão aumentados em pacientes com caP e HPB, porém o significado destes auto-anticorpos anti-PSA e sua interferência na função e avaliação dos níveis de PSA não foi estabelecido, sendo necessárias maiores investigações. A hipótese sugerida é que baixos níveis de PSA e altos níveis de auto-anticorpos anti-PSA poderiam ocultar um caP (87).

Os auto-anticorpos anti-PSA poderão ser mais uma ferramenta para melhorar a especificidade e a sensibilidade no diagnóstico do câncer de próstata, tornando-se um teste auxiliar no prognóstico, acompanhamento e tratamento desta doença.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar auto-anticorpos anti-PSA em pacientes com e sem neoplasia da próstata do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

2.2 Objetivos Específicos

- Otimizar enzimaímunoensaio para detecção de auto-anticorpos anti-PSA em soro humano;

- Verificar a presença de auto-anticorpos anti-PSA em diferentes estágios patológicos;

- Verificar associação entre auto-anticorpos anti-PSA e as variáveis laboratoriais e clínicas dos pacientes.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sartor AO. Risk factors for prostate cancer. [base de dados na internet]. Wellesley, Mass.: BDR-Up to date. Disponível em: <www.uptodate.com>. [atualizada em 04 abr.2007; acesso em 29 ago. 2007].
2. BRASIL, Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer. Estimativa: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2006. Disponível em: <<http://www.inca.org.br>>. Acesso em 02 jul. 2007.
3. BRASIL, Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2007. Disponível em: <<http://www.inca.org.br>>. Acesso em 28 nov. 2007.
4. Delongchamps NB, Singh A, Haas GP. The role of prevalence in the diagnosis of prostate cancer. *Cancer Control*. 2006 Jul;13(3):158-68.
5. Schulz WA, Burchardt M, Cronauer MV. Molecular biology of prostate cancer. *Mol Hum Reprod*. 2003 Aug;9(8):437-48.
6. Mazhar D, Waxman J. Prostate cancer. *Postgrad Med J*. 2002 Oct;78(924):590-5.
7. Rhoden EL, Graziottin TM, Souto CAV. Câncer de Próstata: Epidemiologia, Etiologia, História Natural, Quadro Clínico, Diagnóstico, Estadiamento Urologia Oncológica. Rio de Janeiro; 2004. p. 291-307.
8. Chun TY. Coincidence of bladder and prostate cancer. *J Urol*. 1997 Jan;157(1):65-7.
9. BRASIL, Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer. Câncer de Próstata: consenso. Rio de Janeiro: INCA, 2002. Disponível em: <<http://www.inca.org.br>>. Acesso em 02 jul. 2007.
10. Hoffman RM. Viewpoint: limiting prostate cancer screening. *Ann Intern Med*. 2006 Mar 21;144(6):438-40.
11. Screening for prostate cancer: recommendation and rationale. *Ann Intern Med*. 2002 Dec 3;137(11):915-6.
12. Fleisher M, Dnistrian AM, Sturgeon CM, Lamerz R, Wittliff JL. Practice Guidelines and recommendations for use of tumor markers in the clinic. 2005.
13. Polascik TJ, Oesterling JE, Partin AW. Prostate specific antigen: a decade of discovery--what we have learned and where we are going. *J Urol*. 1999 Aug;162(2):293-306.
14. Williams RD. This month in Investigative Urology: prostate-specific antigen. *J Urol*. 1988 Nov;140(5):1030-1.
15. Hara M, Koyanagi Y, Inoue T, Fukuyama T. [Some physico-chemical characteristics of " -seminoprotein", an antigenic component specific for human seminal

plasma. Forensic immunological study of body fluids and secretion. VII]. *Nihon Hoigaku Zasshi*. 1971 Jul;25(4):322-4.

16. Li TS, Beling CG. Isolation and characterization of two specific antigens of human seminal plasma. *Fertil Steril*. 1973 Feb;24(2):134-44.

17. Sensabaugh GF. Isolation and characterization of a semen-specific protein from human seminal plasma: a potential new marker for semen identification. *J Forensic Sci*. 1978 Jan;23(1):106-15.

18. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol*. 1979 Sep;17(2):159-63.

19. Papsidero LD, Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. A prostate antigen in sera of prostatic cancer patients. *Cancer Res*. 1980 Jul;40(7):2428-32.

20. Graves HC, Sensabaugh GF, Blake ET. Postcoital detection of a male-specific semen protein. Application to the investigation of rape. *N Engl J Med*. 1985 Feb 7;312(6):338-43.

21. Schellhammer PF, Wright GL, Jr. Biomolecular and clinical characteristics of PSA and other candidate prostate tumor markers. *Urol Clin North Am*. 1993 Nov;20(4):597-606.

22. Armbruster DA. Prostate-specific antigen: biochemistry, analytical methods, and clinical application. *Clin Chem*. 1993 Feb;39(2):181-95.

23. Balk SP, Ko YJ, Bubley GJ. Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol*. 2003 Jan 15;21(2):383-91.

24. Van Duijnhoven HL, Pequeriaux NC, Van Zon JP, Blankenstein MA. Large discrepancy between prostate-specific antigen results from different assays during longitudinal follow-up of a prostate cancer patient. *Clin Chem*. 1996 Apr;42(4):637-41.

25. Prostate-specific antigen (PSA) best practice policy. American Urological Association (AUA). *Oncology (Williston Park)*. 2000 Feb;14(2):267-72, 77-8, 80 passim.

26. Jain S, Bhojwani AG, Mellon JK. Improving the utility of prostate specific antigen (PSA) in the diagnosis of prostate cancer: the use of PSA derivatives and novel markers. *Postgrad Med J*. 2002 Nov;78(925):646-50.

27. Stamey TA, Yemoto CE. Examination of the 3 molecular forms of serum prostate specific antigen for distinguishing negative from positive biopsy: relationship to transition zone volume. *J Urol*. 2000 Jan;163(1):119-26.

28. Saedi MS, Cass MM, Goel AS, Grauer L, Hogen KL, Okaneya T, et al. Overexpression of a human prostate-specific glandular kallikrein, hK2, in *E. coli* and generation of antibodies. *Mol Cell Endocrinol*. 1995 Apr 1;109(2):237-41.

29. Vessella RL, Lange PH. Issues in the assessment of PSA immunoassays. *Urol Clin North Am*. 1993 Nov;20(4):607-19.

30. van Dieijen-Visser MP, Delaere KP, Gijzen AH, Brombacher PJ. A comparative study on the diagnostic value of prostatic acid phosphatase (PAP) and prostatic

specific antigen (PSA) in patients with carcinoma of the prostate gland. *Clin Chim Acta*. 1988 May 31;174(2):131-40.

31. Isono T, Tanaka T, Kageyama S, Yoshiki T. Structural diversity of cancer-related and non-cancer-related prostate-specific antigen. *Clin Chem*. 2002 Dec;48(12):2187-94.

32. Jung K, Reiche J, Boehme A, Stephan C, Loening SA, Schnorr D, et al. Analysis of subforms of free prostate-specific antigen in serum by two-dimensional gel electrophoresis: potential to improve diagnosis of prostate cancer. *Clin Chem*. 2004 Dec;50(12):2292-301.

33. Chu LF, Chen Z, Stamey TA. Different molecular forms of uncomplexed prostate specific antigen (PSA) show similar immunoreactivities. *J Urol*. 1999 Jun;161(6):2009-12.

34. Linton HJ, Marks LS, Millar LS, Knott CL, Rittenhouse HG, Mikolajczyk SD. Benign prostate-specific antigen (BPSA) in serum is increased in benign prostate disease. *Clin Chem*. 2003 Feb;49(2):253-9.

35. Christensson A, Laurell CB, Lilja H. Enzymatic activity of prostate-specific antigen and its reactions with extracellular serine proteinase inhibitors. *Eur J Biochem*. 1990 Dec 27;194(3):755-63.

36. Espana F, Sanchez-Cuenca J, Vera CD, Estelles A, Gilabert J. A quantitative ELISA for the measurement of complexes of prostate-specific antigen with protein C inhibitor when using a purified standard. *J Lab Clin Med*. 1993 Dec;122(6):711-9.

37. Stenman UH, Leinonen J, Alfthan H, Rannikko S, Tuhkanen K, Alfthan O. A complex between prostate-specific antigen and alpha 1-antichymotrypsin is the major form of prostate-specific antigen in serum of patients with prostatic cancer: assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer. *Cancer Res*. 1991 Jan 1;51(1):222-6.

38. Lilja H, Christensson A, Dahlen U, Matikainen MT, Nilsson O, Pettersson K, et al. Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with alpha 1-antichymotrypsin. *Clin Chem*. 1991 Sep;37(9):1618-25.

39. Christensson A, Bjork T, Nilsson O, Dahlen U, Matikainen MT, Cockett AT, et al. Serum prostate specific antigen complexed to alpha 1-antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. *J Urol*. 1993 Jul;150(1):100-5.

40. Kreutz FT, Suresh MR. Novel bispecific immunoprobe for rapid and sensitive detection of prostate-specific antigen. *Clin Chem*. 1997 Apr;43(4):649-56.

41. Stenman UH, Hakama M, Knekt P, Aromaa A, Teppo L, Leinonen J. Serum concentrations of prostate specific antigen and its complex with alpha 1-antichymotrypsin before diagnosis of prostate cancer. *Lancet*. 1994 Dec 10;344(8937):1594-8.

42. Bjartell A, Bjork T, Matikainen MT, Abrahamsson PA, di Sant'Agnese A, Lilja H. Production of alpha-1-antichymotrypsin by PSA-containing cells of human prostate epithelium. *Urology*. 1993 Nov;42(5):502-10.

43. Jette DC, Kreutz FT, Malcolm BA, Wishart DS, Noujaim AA, Suresh MR. Epitope mapping of prostate-specific antigen with monoclonal antibodies. *Clin Chem*. 1996 Dec;42(12):1961-9.

44. Corey E, Wegner SK, Corey MJ, Vessella RL. Prostate-specific antigen: characterization of epitopes by synthetic peptide mapping and inhibition studies. *Clin Chem*. 1997 Apr;43(4):575-84.
45. Mantzoros CS, Tzonou A, Signorello LB, Stampfer M, Trichopoulos D, Adami HO. Insulin-like growth factor 1 in relation to prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Br J Cancer*. 1997;76(9):1115-8.
46. Chan JM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Gann PH, Ma J, Wilkinson P, et al. Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science*. 1998 Jan 23;279(5350):563-6.
47. Yoshida E, Ohmura S, Sugiki M, Maruyama M, Mihara H. Prostate-specific antigen activates single-chain urokinase-type plasminogen activator. *Int J Cancer*. 1995 Dec 11;63(6):863-5.
48. Cramer SD, Chen Z, Peehl DM. Prostate specific antigen cleaves parathyroid hormone-related protein in the PTH-like domain: inactivation of PTHrP-stimulated cAMP accumulation in mouse osteoblasts. *J Urol*. 1996 Aug;156(2 Pt 1):526-31.
49. Iwamura M, Hellman J, Cockett AT, Lilja H, Gershagen S. Alteration of the hormonal bioactivity of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) as a result of limited proteolysis by prostate-specific antigen. *Urology*. 1996 Aug;48(2):317-25.
50. Soletormos G, Semjonow A, Sibley PE, Lamerz R, Petersen PH, Albrecht W, et al. Biological variation of total prostate-specific antigen: a survey of published estimates and consequences for clinical practice. *Clin Chem*. 2005 Aug;51(8):1342-51.
51. Potts JM. Prospective identification of National Institutes of Health category IV prostatitis in men with elevated prostate specific antigen. *J Urol*. 2000 Nov;164(5):1550-3.
52. Lorente JA, Arango O, Bielsa O, Cortadellas R, Gelabert-Mas A. Effect of antibiotic treatment on serum PSA and percent free PSA levels in patients with biochemical criteria for prostate biopsy and previous lower urinary tract infections. *Int J Biol Markers*. 2002 Apr-Jun;17(2):84-9.
53. Stenman UH. Prostate-specific antigen, clinical use and staging: an overview. *Br J Urol*. 1997 Mar;79 Suppl 1:53-60.
54. Brawer M. Measurement of prostate specific antigen. [base de dados na internet]. Wellesley, Mass.: BDR-Up to date. Disponível em: <www.uptodate.com>. [atualizada em 13 abr.2007; acesso em 29 ago. 2007].
55. Andriole GL, Guess HA, Epstein JI, Wise H, Kadmon D, Crawford ED, et al. Treatment with finasteride preserves usefulness of prostate-specific antigen in the detection of prostate cancer: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. PLESS Study Group. Proscar Long-term Efficacy and Safety Study. *Urology*. 1998 Aug;52(2):195-201; discussion -2.
56. Thompson IM, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Miller GJ, Ford LG, et al. The influence of finasteride on the development of prostate cancer. *N Engl J Med*. 2003 Jul 17;349(3):215-24.

57. Rhoden EL, Morgentaler A. Risks of testosterone-replacement therapy and recommendations for monitoring. *N Engl J Med*. 2004 Jan 29;350(5):482-92.
58. Barry MJ. Clinical practice. Prostate-specific-antigen testing for early diagnosis of prostate cancer. *N Engl J Med*. 2001 May 3;344(18):1373-7.
59. Bidart JM, Thuillier F, Augereau C, Chalas J, Daver A, Jacob N, et al. Kinetics of serum tumor marker concentrations and usefulness in clinical monitoring. *Clin Chem*. 1999 Oct;45(10):1695-707.
60. Morgan BR, Tarter TH. Serum heterophile antibodies interfere with prostate specific antigen test and result in over treatment in a patient with prostate cancer. *J Urol*. 2001 Dec;166(6):2311-2.
61. Eastham JA, Riedel E, Scardino PT, Shike M, Fleisher M, Schatzkin A, et al. Variation of serum prostate-specific antigen levels: an evaluation of year-to-year fluctuations. *Jama*. 2003 May 28;289(20):2695-700.
62. Ford ME, Havstad SL, Demers R, Cole Johnson C. Effects of false-positive prostate cancer screening results on subsequent prostate cancer screening behavior. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 Jan;14(1):190-4.
63. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, 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 May 27;350(22):2239-46.
64. Catalona WJ, Loeb S, Han M. Viewpoint: expanding prostate cancer screening. *Ann Intern Med*. 2006 Mar 21;144(6):441-3.
65. Schwarzschild MMAS, Ferraz MLCG, Oliveira JMA, Andriolo A. Câncer de Próstata: recursos diagnósticos atuais. *J Bras Patol*. 2001;37(1):35-42.
66. Oesterling JE, Jacobsen SJ, Chute CG, Guess HA, Girman CJ, Panser LA, et al. Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men. Establishment of age-specific reference ranges. *Jama*. 1993 Aug 18;270(7):860-4.
67. Morgan TO, Jacobsen SJ, McCarthy WF, Jacobson DJ, McLeod DG, Moul JW. Age-specific reference ranges for prostate-specific antigen in black men. *N Engl J Med*. 1996 Aug 1;335(5):304-10.
68. Jackson BR, Roberts WL. Brief report: Free prostate-specific antigen test utilization. Consistency with guidelines. *J Gen Intern Med*. 2005 Sep;20(9):859-61.
69. Tricoli JV, Schoenfeldt M, Conley BA. Detection of prostate cancer and predicting progression: current and future diagnostic markers. *Clin Cancer Res*. 2004 Jun 15;10(12 Pt 1):3943-53.
70. Kimura N, Hoshi S, Takahashi M, Takeha S, Shizawa S, Nagura H. Plasma chromogranin A in prostatic carcinoma and neuroendocrine tumors. *J Urol*. 1997 Feb;157(2):565-8.
71. Berruti A, Dogliotti L, Mosca A, Gorzegno G, Bollito E, Mari M, et al. Potential clinical value of circulating chromogranin A in patients with prostate carcinoma. *Ann Oncol*. 2001;12 Suppl 2:S153-7.

72. Jeronimo C, Usadel H, Henrique R, Oliveira J, Lopes C, Nelson WG, et al. Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2001 Nov 21;93(22):1747-52.
73. Lee WH, Isaacs WB, Bova GS, Nelson WG. CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic carcinoma cells detected using the polymerase chain reaction: a new prostate cancer biomarker. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997 Jun;6(6):443-50.
74. Gu Z, Thomas G, Yamashiro J, Shintaku IP, Dorey F, Raitano A, et al. Prostate stem cell antigen (PSCA) expression increases with high gleason score, advanced stage and bone metastasis in prostate cancer. *Oncogene.* 2000 Mar 2;19(10):1288-96.
75. Silver DA, Pellicer I, Fair WR, Heston WD, Cordon-Cardo C. Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. *Clin Cancer Res.* 1997 Jan;3(1):81-5.
76. Murphy G, Ragde H, Kenny G, Barren R, 3rd, Erickson S, Tjoa B, et al. Comparison of prostate specific membrane antigen, and prostate specific antigen levels in prostatic cancer patients. *Anticancer Res.* 1995 Jul-Aug;15(4):1473-9.
77. Liu BC, LaRose I, Weinstein LJ, Ahn M, Weinstein MH, Richie JP. Expression of telomerase subunits in normal and neoplastic prostate epithelial cells isolated by laser capture microdissection. *Cancer.* 2001 Oct 1;92(7):1943-8.
78. Paul B, Dhir R, Landsittel D, Hitchens MR, Getzenberg RH. Detection of prostate cancer with a blood-based assay for early prostate cancer antigen. *Cancer Res.* 2005 May 15;65(10):4097-100.
79. Leslie D, Lipsky P, Notkins AL. Autoantibodies as predictors of disease. *J Clin Invest.* 2001 Nov;108(10):1417-22.
80. Wang X, Yu J, Sreekumar A, Varambally S, Shen R, Giacherio D, et al. Autoantibody signatures in prostate cancer. *N Engl J Med.* 2005 Sep 22;353(12):1224-35.
81. Scofield RH. Autoantibodies as predictors of disease. *Lancet.* 2004 May 8;363(9420):1544-6.
82. Casiano CA, Mediavilla-Varela M, Tan EM. Tumor-associated antigen arrays for the serological diagnosis of cancer. *Mol Cell Proteomics.* 2006 Oct;5(10):1745-59.
83. Larsson A, Ronquist G, Wulfing C, Eltze E, Bettendorf O, Carlsson L, et al. Antiprostate antibodies: possible serum markers for prostate cancer metastasizing liability. *Urol Oncol.* 2006 May-Jun;24(3):195-200.
84. Zisman A, Zisman E, Lindner A, Velikanov S, Siegel YI, Mozes E. Autoantibodies to prostate specific antigen in patients with benign prostatic hyperplasia. *J Urol.* 1995 Sep;154(3):1052-5.
85. Falk RJ, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med.* 1988 Jun 23;318(25):1651-7.

86. Saxon A, Shanahan F, Landers C, Ganz T, Targan S. A distinct subset of antineutrophil cytoplasmic antibodies is associated with inflammatory bowel disease. *J Allergy Clin Immunol.* 1990 Aug;86(2):202-10.

87. Stein AC. Detecção de auto-anticorpos anti-PSA em pacientes submetidos a um programa para rastreamento de câncer de próstata [Dissertação de Mestrado]. Poto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2003.

4. ARTIGO EM PORTUGUÊS

DETECÇÃO DE AUTO-ANTICORPOS ANTI-PSA EM PACIENTES COM E SEM NEOPLASIA DA PRÓSTATA

Melissa Helena Angeli ^{1*}, Walter José Koff ^{2**}, Fernando Thomé Kreutz ^{3***}

^{1*} Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

^{2**} Professor titular e chefe do Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

^{3***} Diretor da FK Biotecnologia

Endereço para correspondência:

Melissa Helena Angeli

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Serviço de Urologia

Rua Ramiro Barcelos, 2350

CEP 90035-903 Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail: mhangeli@hotmail.com

Telefone: + 55 51 21018286

Resumo

Introdução

O antígeno prostático específico é o marcador sérico utilizado para o diagnóstico do câncer de próstata, porém, sua sensibilidade e especificidade ainda deixam a desejar na detecção precoce do câncer. Os auto-anticorpos anti-PSA já foram observados em pacientes com hiperplasia benigna e com câncer de próstata, porém seu significado clínico ainda não foi completamente estabelecido. Nosso objetivo foi detectar auto-anticorpos anti-PSA em pacientes atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e correlacionar com o estágio patológico.

Métodos

Os auto-anticorpos anti-PSA foram detectados por ensaio imunoenzimático no soro de 98 pacientes. Destes, 77 pacientes com neoplasia da próstata e 21 pacientes sem neoplasia aparente de acordo com o exame anátomo-patológico.

Resultados

Considerando o valor arbitrário 1,0 como ponto de corte, observou-se que pacientes sem neoplasia aparente apresentaram níveis de auto-anticorpos anti-PSA mais elevados do que pacientes com câncer (85,7% e 53,2% respectivamente) ($p= 0,015$).

Analisando apenas os pacientes com câncer, estratificados em quatro subgrupos: presença de metástase óssea, ausência de metástase óssea, presença de metástase linfonodal e câncer localmente avançado, observou-se que pacientes com metástase óssea e com câncer localmente avançado apresentam níveis mais elevados de auto-anticorpos anti-PSA, porém não estatisticamente significativos ($p = 0,591$).

Conclusão

Embora mais estudos sejam necessários para avaliar o verdadeiro significado dos auto-anticorpos anti-PSA, este estudo cria a hipótese de que os auto-anticorpos anti-PSA podem ser um teste auxiliar ao PSA para o diagnóstico e prognóstico do câncer de próstata, aumentando sua especificidade e sensibilidade.

Introdução

O câncer de próstata é o sexto tipo de câncer mais comum no mundo e o mais prevalente em homens. As taxas de incidência desse tipo de câncer são cerca de seis vezes maiores nos países desenvolvidos, se comparadas às dos em desenvolvimento.

Em 2008, estima-se a ocorrência de 466.730 casos novos de câncer no Brasil, sendo que metade destes casos atinge o sexo masculino. Em homens, excetuando-se o câncer de pele não melanoma, o câncer de próstata permanece como o mais incidente em todas as regiões do Brasil com 49.530 casos (1).

O antígeno prostático específico (PSA), uma proteína produzida principalmente pelas células epiteliais prostáticas, é amplamente utilizado na detecção, prognóstico e monitorização do câncer de próstata, entretanto um nível de PSA elevado nem sempre indica câncer, e um valor dentro da faixa de referência não afasta esta hipótese diagnóstica. Valores elevados de PSA podem ser observados em câncer de próstata, em doenças prostáticas benignas, como a hiperplasia e a prostatite, e em diferentes condições não relacionadas à doença prostática (2-7).

Várias abordagens têm sido sugeridas com a finalidade de aumentar o desempenho diagnóstico da determinação do PSA como marcador de câncer de próstata, como o cálculo da velocidade e da densidade de PSA, a adequação do ponto de corte e a relação entre PSA livre e o PSA total (8-10).

Os auto-anticorpos anti-PSA já foram observados em pacientes com hiperplasia benigna de próstata e em pacientes com câncer de próstata, porém seu significado clínico ainda não foi estabelecido (11, 12). Estes auto-anticorpos podem ser mais uma ferramenta para auxiliar no prognóstico, acompanhamento e tratamento desta doença.

Este estudo visa detectar auto-anticorpos anti-PSA em pacientes atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e verificar possíveis associações entre pacientes em diferentes estágios da neoplasia da próstata e variáveis clínicas e/ou laboratoriais.

Métodos

Amostras:

Pacientes atendidos no ambulatório de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os soros dos pacientes foram coletados por punção venosa, aliqüotados e congelados a -70°C para posterior análise dos auto-anticorpos anti-PSA. Os participantes do estudo assinaram um Termo de Consentimento Informado que lhes assegurou o sigilo de identidade e das informações obtidas no estudo.

Foram estudados 98 pacientes, sendo que 77 pacientes com neoplasia da próstata e 21 sem neoplasia aparente de acordo com o exame anátomo-patológico. Dos 77 pacientes com câncer de próstata, 41 não apresentavam metástases, 19 apresentavam metástase óssea, 13 apresentavam câncer localmente avançado, neste caso, pacientes com invasões perineural, capsular e das vesículas seminais e 4 pacientes tinham metástase nos linfonodos.

Métodos:

Padronização do ensaio para detecção de auto-anticorpos anti-PSA:

A sensibilização das microplacas de poliestireno (Nunc®) foi realizada com PSA purificado (Scripps Laboratories®) em triplicata nas concentrações de 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 20 e 50 $\mu\text{g/mL}$ em tampão PBS pH 7,2, dispensando-se 50 μL em cada poço, sendo a placa

incubada a temperatura de 4°C por 18 horas. A placa foi lavada três vezes e bloqueada com 100µL/poço de BSA 3% durante duas horas, a temperatura ambiente, sob agitação. Novamente, foram realizadas três lavagens e, então, adicionado 50µL/poço de um anticorpo monoclonal de camundongo anti-PSA (FK Biotec®) na concentração de 10µg/mL, sendo incubado por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação. Seguiu-se outra etapa de lavagem e um segundo anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com a enzima peroxidase (Sigma®) foi adicionado na diluição de 1:1000 em BSA 1% e incubado a temperatura ambiente durante 1 hora (50µL/poço) sob agitação. Após outra etapa de lavagem, adicionou-se 50µL/poço do cromógeno TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, Sigma®), sendo 1mL de TMB 1mg/mL em DMSO (Sigma®) acrescido em 9 mL de tampão citrato fosfato, adicionando-se 30 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Merck®) . Após 15 minutos, foi adicionado 50µL/poço de solução de parada (ácido sulfúrico 1M). A leitura da densidade ótica foi realizada no equipamento SPECTRAmax através do software SOFTmaxPRO 3.0 no comprimento de onda de 450nm. Escolheu-se a concentração de PSA que apresentou maior densidade ótica sem apresentar saturação.

Detecção de Auto-anticorpos anti-PSA:

A presença de auto-anticorpos anti-PSA no soro dos pacientes foi determinada pelo ensaio acima descrito, com algumas modificações. Microplacas de poliestireno (Nunc®) foram sensibilizadas com PSA purificado (Scripps Laboratories®) na concentração de 5 µg/mL. Adicionou-se 50µL/poço e incubou-se a placa a 4°C por 18 horas. Após, as microplacas foram lavadas três vezes e bloqueadas com 100µL/poço de BSA 3% por 2 horas, a temperatura ambiente, sob agitação. Após nova etapa de lavagem, adicionou-se 50 µL das amostras (soro dos pacientes) diluídas 1:21 em BSA 1% e incubou-se por 18 horas a 4°C . As microplacas foram novamente lavadas três vezes e, em seguida, adicionou-se 50 µL/poço de anticorpos anti-IgG e anti-IgM humanos marcados com peroxidase (FK Biotec®). O tempo de incubação foi de 1 hora. Realizou-se outra etapa de lavagem e então se adicionou 50 µL/poço do cromógeno. Incubou-se 15 minutos e adicionou-se 50µL/poço de solução de parada (ácido sulfúrico 1M). A leitura foi realizada em comprimento de onda de 450 nm em espectrofotômetro de absorbância - equipamento SPECTRAmax através do software SOFTmaxPRO 3.0. Cada amostra foi testada três vezes em ensaios distintos. Como controle positivo utilizou-se um anticorpo monoclonal de camundongo anti-PSA (FKBiotec®) na concentração de 10 µg/mL diluído em BSA 1%.

Análise Estatística:

Os dados foram descritos como média e desvio padrão e, para o PSA, como mediana e amplitude interquartil devido à distribuição assimétrica.

Foram utilizados os testes qui-quadrado (χ^2) para avaliar associação entre variáveis categóricas e o teste t de Student para comparar médias em amostras independentes.

Para comparar médias entre três ou mais categorias utilizou-se a análise de variância.

Para comparar variáveis assimétricas entre os subgrupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e, para o PSA, foi realizada uma transformação ordenando por postos para realizar as comparações múltiplas entre os diferentes grupos.

As correlações foram avaliadas pelo coeficiente de correlação de Pearson, para variáveis com distribuição simétrica e coeficiente de correlação de Spearman quando a distribuição foi assimétrica.

O nível de significância adotado foi $\alpha = 0,05$. Os dados foram analisados nos programas SPSS versão 14.0 e Sigma Plot versão 8.0.

Resultados

Padronização da Concentração de PSA para a sensibilização das placas:

Através de um ensaio imunoenzimático, determinou-se que a concentração ideal para a sensibilização das microplacas de poliestireno para a determinação dos auto-anticorpos anti-PSA foi 5 $\mu\text{g/mL}$ como demonstrado na Figura 1.

Detecção de Auto-anticorpos anti-PSA:

Este estudo determinou a presença de auto-anticorpos anti-PSA classes IgG e IgM no soro de 77 pacientes com neoplasia da próstata e 21 pacientes sem neoplasia aparente de acordo com o exame anátomo-patológico. Dos 77 pacientes com câncer de próstata, 41 não apresentavam metástases, 19 apresentavam metástase óssea, 13 apresentavam câncer localmente avançado e 4 pacientes tinham metástase nos linfonodos.

As amostras foram testadas três vezes em simplicata. O coeficiente de variação inter-ensaio foi de 11%.

Para evitar possível interferência inter-ensaio, optou-se por normalizar os dados estabelecendo uma relação entre o valor da densidade ótica média do soro dos pacientes e o valor da densidade ótica média do controle positivo do ensaio.

O ponto de corte utilizado neste estudo foi 1,0, baseado em estudos prévios. Pacientes com índice de auto-anticorpos superior a 1,0, foram considerados positivos para a presença de auto-anticorpos anti-PSA.

Num primeiro momento, os pacientes foram estratificados em um grupo com câncer e um grupo sem câncer aparente, de acordo com o anátomo-patológico, como visto na Tabela 1 e Figura 2.

Considerando o valor 1,0 como ponto de corte, observou-se que pacientes sem neoplasia aparente apresentaram níveis de auto-anticorpos anti-PSA mais elevados do que pacientes com câncer (85,7% e 53,2% respectivamente) ($p = 0,015$).

Analisando apenas os pacientes com câncer, estratificou-se os mesmos em presença e ausência de metástase óssea. Os dados estão demonstrados na Tabela 2. Em relação à presença de auto-anticorpos anti-PSA, pacientes com metástase óssea apresentaram níveis de auto-anticorpos maiores que pacientes sem metástase óssea, porém a diferença encontrada não foi estatisticamente significativa ($p = 0,464$).

Ainda analisando apenas os pacientes com câncer, porém os estratificando em quatro subgrupos: presença de metástase óssea, ausência de metástase óssea, presença de metástase linfonodal e câncer localmente avançado, observou-se que pacientes com metástase óssea e com câncer localmente avançado apresentaram níveis mais elevados de auto-anticorpos anti-PSA, porém não estatisticamente significativos ($p = 0,591$) como visto na Tabela 3 e Figura 3.

Ao estabelecer correlações entre idade e auto-anticorpos anti-PSA e PSA e auto-anticorpos anti-PSA, verificou-se ausência de correlação com $p = 0,932$ e $p = 0,807$, respectivamente.

Discussão

O PSA é considerado o melhor marcador tumoral para o câncer de próstata, entretanto não deve ser utilizado como teste de triagem isoladamente, mas como complementar ao toque retal, porque 38% a 48% dos pacientes com câncer confinado à próstata apresentam níveis de PSA normais(13). O papel do PSA no estagiamento e na triagem do câncer de próstata continua limitado devido às faixas amplas e sobrepostas dos níveis de PSA no sangue que existem em muitos pacientes com doença localizada ou doença metastática avançada.

Atualmente, não há marcadores séricos que diferenciem doenças clinicamente relevantes de doenças benignas da próstata. Melhores indicadores da presença e progressão do câncer de próstata são necessários para evitar tratamento desnecessário, biópsia desnecessária, predizer o curso da doença e desenvolver terapias mais efetivas (14, 15).

O PSA é uma protease de 34 KDa que possui seqüência homóloga à família das calicreínas de serino-proteases. Auto-anticorpos contra outras serino-proteases já foram descritos em várias doenças auto-imunes, como granulomatose de Wegener, poliartrite nodosa, síndrome de Churg-Strauss e doença intestinal inflamatória (16, 17).

Também já foi relatada a presença de auto-anticorpos em hiperplasias como na Doença de Graves, Myasthenia gravis e desordens linfóides benignas do pulmão(11).

Zisman e colaboradores, em 1995, levantaram a hipótese de um possível processo auto-imune na hiperplasia prostática benigna através da detecção de auto-anticorpos anti-PSA. Em seu estudo, 59% dos pacientes estudados com hiperplasia prostática benigna apresentaram auto-anticorpos anti-PSA (11). Nem todos pacientes demonstraram reação, possivelmente responderiam a outros antígenos prostáticos, como antígeno prostático específico de membrana ou receptor de andrógenos (12, 15).

Nas décadas de setenta e oitenta, foi demonstrado a presença de auto-anticorpos séricos em pacientes com câncer de próstata, mas devido ao desconhecimento do seu real significado, foi considerada uma resposta imune inespecífica. Nos últimos anos, ressurgiu o interesse em caracterizar a resposta aos autoanticorpos no câncer de próstata (12).

Neste estudo, detectamos auto-anticorpos anti-PSA em pacientes com e sem neoplasia da próstata de acordo com o exame anátomo-patológico.

O estudo demonstra que pacientes sem diagnóstico anátomo-patológico de câncer de próstata apresentaram níveis maiores de autoanticorpos que pacientes com câncer, quando considerado 1,0 como ponto de corte (Tabela 1 e Figura 2). Alguns comentários são pertinentes em relação a estes resultados. Os pacientes sem neoplasia participantes deste estudo procuraram atendimento no hospital por estarem com alguma sintomatologia. Todos estes 21 pacientes apresentavam níveis de PSA entre 4 e 10 ng/mL e foram submetidos a biópsia, a qual não evidenciou presença de neoplasia.

Sabe-se que níveis de PSA menores que 10 ng/mL, possuem baixa especificidade para doença confinada ao órgão. A extensa sobreposição nos níveis de PSA total entre indivíduos saudáveis e pacientes com câncer de próstata acarreta na discriminação incorreta entre pacientes com câncer e indivíduos normais quando o PSA encontra-se na faixa entre 4 e 10 ng/mL (18). Devido a esta baixa especificidade do PSA total para o diagnóstico do câncer, o número de biópsias é muito elevado para a confirmação do tumor. Um recente estudo mostrou que os tumores ocupam somente 15,6% das biópsias pré-operatórias, aproximadamente metade do que é visto nas biópsias *ex vivo* (19).

Auto-anticorpos anti-PSA já foram encontrados em pacientes com câncer de próstata e foi constatado que estes anticorpos podem interferir nos imunoenaios, bloqueando os sítios de ligação dos anticorpos monoclonais, subestimando os valores do PSA(20).

Considerando estes aspectos, duas hipóteses podem ser sugeridas: o paciente pode estar ocultando um câncer de próstata, não diagnosticado pela biópsia, nem evidenciado pelo PSA total, o qual permanece em níveis normais, pois os auto-anticorpos estão interferindo no ensaio do PSA ou, os auto-anticorpos, em níveis elevados, possuem efeito protetor contra o câncer, ou ainda, são marcadores de uma resposta anti-tumoral.

Avaliamos também neste estudo, apenas os pacientes com câncer, estratificando-os pelo estadiamento (Tabelas 2 e 3 e Figura 3). Observou-se que pacientes com metástase óssea e com câncer localmente avançado apresentaram níveis mais elevados de auto-anticorpos anti-PSA, porém não estatisticamente significativos ($p = 0,591$). Para detectar uma diferença entre os percentuais de auto-anticorpos anti-PSA, teríamos que possuir uma amostragem maior; com o N utilizado nesta comparação o poder do teste estatístico de detectar uma diferença clinicamente relevante é baixo.

Os auto-anticorpos anti-PSA propõe uma informação diferente da obtida pelo teste PSA, ilustrado pela ausência de correlação entre os dois testes. Desta forma, a detecção de auto-anticorpos anti-PSA não é uma alternativa ao PSA e sim um possível teste complementar auxiliando no diagnóstico e prognóstico do câncer de próstata.

Conclusões

O desenvolvimento de novos e clinicamente relevantes marcadores para o diagnóstico e prognóstico do câncer de próstata é essencial para uma melhor identificação e tratamento desta doença.

Este estudo sugere que os auto-anticorpos anti-PSA podem ser um teste auxiliar ao PSA para o diagnóstico do câncer de próstata. Estudos maiores são necessários para avaliar o verdadeiro significado dos auto-anticorpos anti-PSA no câncer de próstata.

Conflito de interesses

Os autores declaram não existir conflito de interesses.

Agradecimentos

Este trabalho recebeu apoio do Fundo de Incentivo à Pesquisa/Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

Referências

1. BRASIL, Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2007. Disponível em: <<http://www.inca.org.br>>. Acesso em 28 nov. 2007.
2. Lorente JA, Arango O, Bielsa O, Cortadellas R, Gelabert-Mas A. Effect of antibiotic treatment on serum PSA and percent free PSA levels in patients with biochemical criteria for prostate biopsy and previous lower urinary tract infections. *Int J Biol Markers*. 2002 Apr-Jun;17(2):84-9.
3. Potts JM. Prospective identification of National Institutes of Health category IV prostatitis in men with elevated prostate specific antigen. *J Urol*. 2000 Nov;164(5):1550-3.
4. Soletormos G, Semjonow A, Sibley PE, Lamerz R, Petersen PH, Albrecht W, et al. Biological variation of total prostate-specific antigen: a survey of published estimates and consequences for clinical practice. *Clin Chem*. 2005 Aug;51(8):1342-51.
5. Stenman UH. Prostate-specific antigen, clinical use and staging: an overview. *Br J Urol*. 1997 Mar;79 Suppl 1:53-60.
6. Schellhammer PF, Wright GL, Jr. Biomolecular and clinical characteristics of PSA and other candidate prostate tumor markers. *Urol Clin North Am*. 1993 Nov;20(4):597-606.

7. Prostate-specific antigen (PSA) best practice policy. American Urological Association (AUA). *Oncology* (Williston Park). 2000 Feb;14(2):267-72, 77-8, 80 passim.
8. Balk SP, Ko YJ, Bubley GJ. Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol*. 2003 Jan 15;21(2):383-91.
9. Jain S, Bhojwani AG, Mellon JK. Improving the utility of prostate specific antigen (PSA) in the diagnosis of prostate cancer: the use of PSA derivatives and novel markers. *Postgrad Med J*. 2002 Nov;78(925):646-50.
10. Hoffman RM. Screening for prostate cancer. [base de dados na internet]. Wellesley, Mass.: BDR-Up to date. Disponível em: <www.uptodate.com>. [atualizada em 14 nov. 2007; acesso em 29 ago. 2007]
11. Zisman A, Zisman E, Lindner A, Velikanov S, Siegel YI, Mozes E. Autoantibodies to prostate specific antigen in patients with benign prostatic hyperplasia. *J Urol*. 1995 Sep;154(21):1052-5.
12. Casiano CA, Mediavilla-Varela M, Tan EM. Tumor-associated antigen arrays for the serological diagnosis of cancer. *Mol Cell Proteomics*. 2006 Oct;5(10):1745-59.
13. Kreutz FT, Suresh MR. Novel bispecific immunoprobe for rapid and sensitive detection of prostate-specific antigen. *Clin Chem*. 1997 Apr;43(4):649-56.
14. Armbruster DA. Prostate-specific antigen: biochemistry, analytical methods, and clinical application. *Clin Chem*. 1993 Feb;39(2):181-95.
15. Paul B, Dhir R, Landsittel D, Hitchens MR, Getzenberg RH. Detection of prostate cancer with a blood-based assay for early prostate cancer antigen. *Cancer Res*. 2005 May 15;65(10):4097-100.
16. Tricoli JV, Schoenfeldt M, Conley BA. Detection of prostate cancer and predicting progression: current and future diagnostic markers. *Clin Cancer Res*. 2004 Jun 15;10(12 Pt 1):3943-53.
17. Falk RJ, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med*. 1988 Jun 23;318(25):1651-7.
18. Saxon A, Shanahan F, Landers C, Ganz T, Targan S. A distinct subset of antineutrophil cytoplasmic antibodies is associated with inflammatory bowel disease. *J Allergy Clin Immunol*. 1990 Aug;86(2):202-10.
19. Sreekumar A, Laxman B, Rhodes DR, Bhagavathula S, Harwood J, Giacherio D, et al. Humoral immune response to alpha-methylacyl-CoA racemase and prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Jun 2;96(11):834-43.
20. Walton TJ, McCulloch TA, Rees RC, Bishop MC. Obtaining fresh prostate cancer tissue for research: a novel biopsy needle and sampling technique for radical prostatectomy specimens. *Prostate*. 2005 Sep 1;64(4):382-6.
21. Van Duijnhoven HL, Pequeriaux NC, Van Zon JP, Blankenstein MA. Large discrepancy between prostate-specific antigen results from different assays during longitudinal follow-up of a prostate cancer patient. *Clin Chem*. 1996 Apr;42(4):637-41.

Figuras

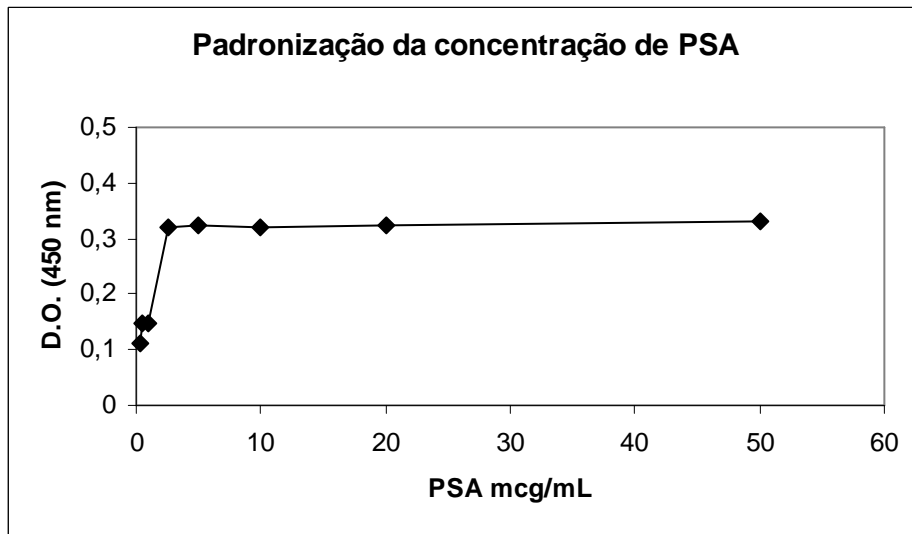


Figura 1: Padronização da concentração de PSA para o ensaio de detecção de auto-anticorpos anti-PSA.

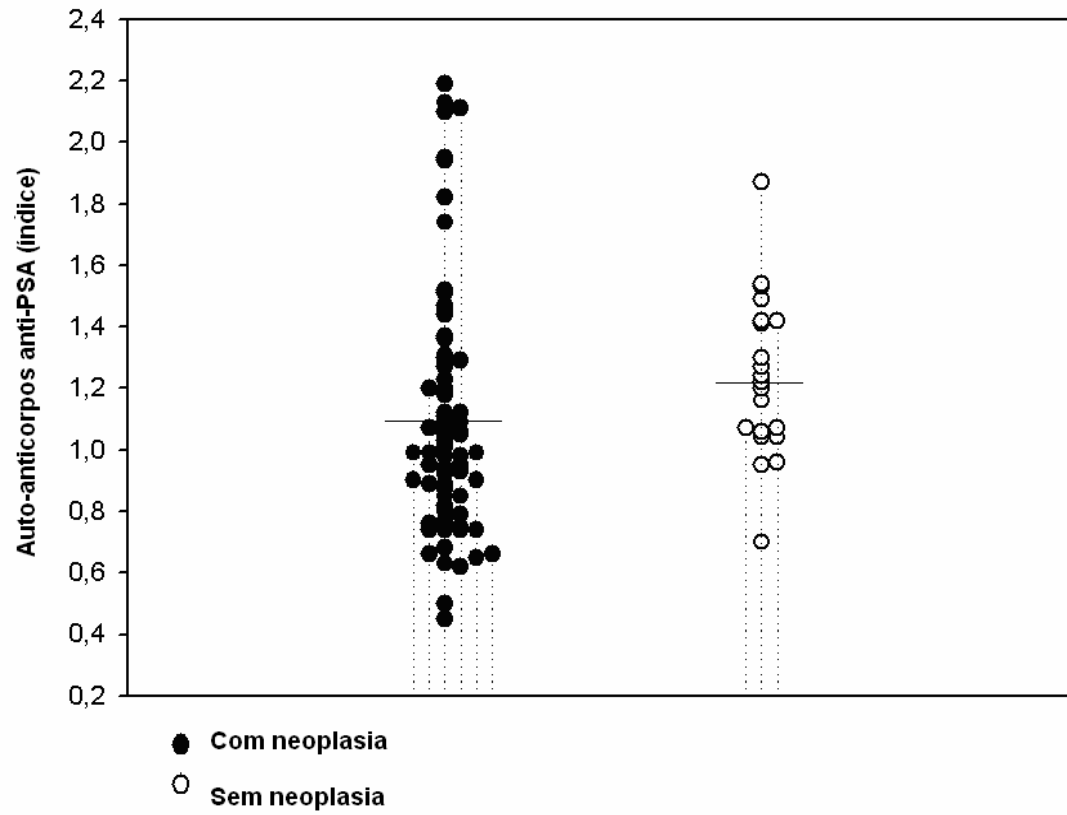


Figura 2: Auto-anticorpos anti-PSA em pacientes com e sem neoplasia da próstata.

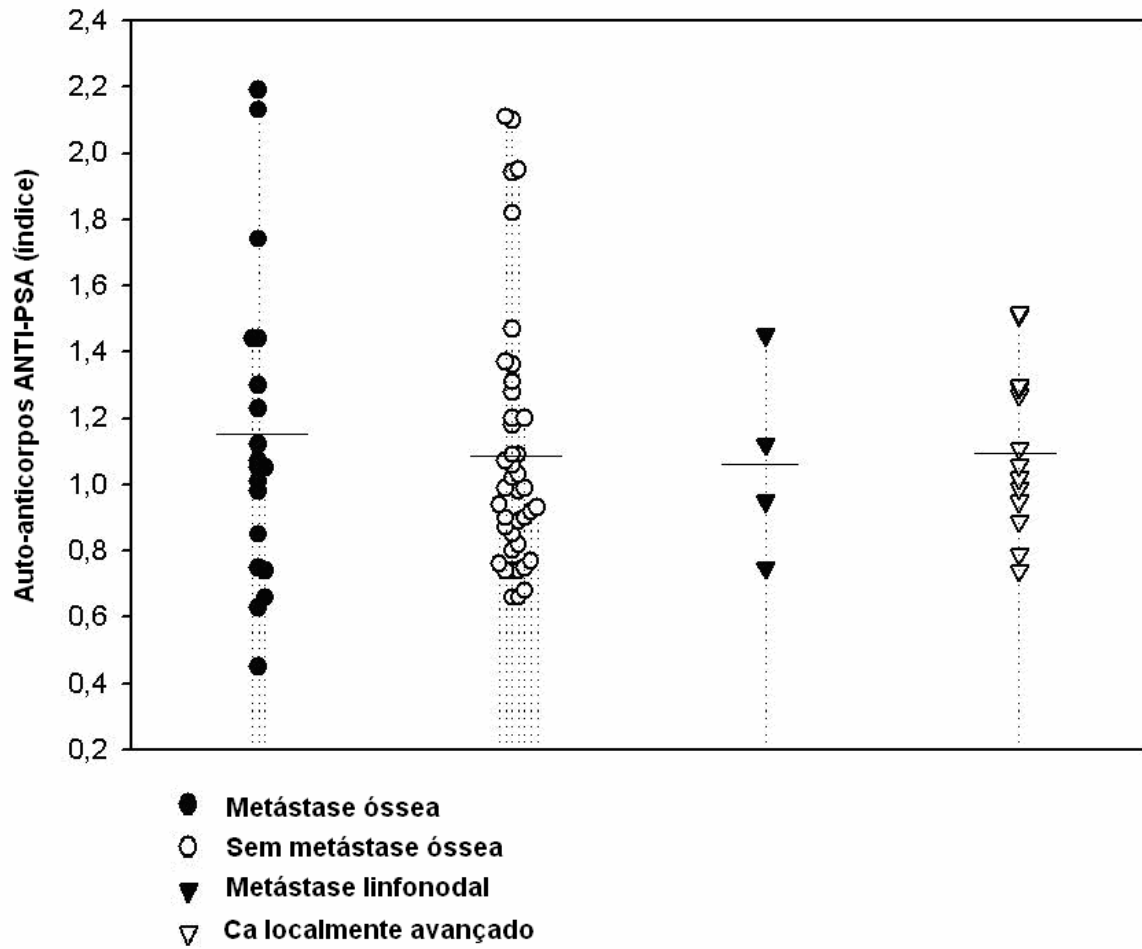


Figura 3: Auto-anticorpos anti-PSA em pacientes com metástase óssea, sem metástase óssea, com metástase linfonodal e com câncer localmente avançado.

Tabelas

Tabela 1 – Características dos pacientes estudados com e sem neoplasia de próstata

	COM NEOPLASIA	SEM NEOPLASIA	P
N	77	21	
IDADE (ANOS)	68,7 ± 10,9	68,7 ± 6,5	>0,999
PSA (ng/mL)	14,77 (6,49 – 42,88)	5,88 (4,72 – 7,28)	< 0,001
Aac anti-PSA >1, f (%)	41 (53,2)	18 (85,7)	0,015

Os dados estão apresentados para idade como média ± desvio padrão; auto-anticorpos anti-PSA (Aac anti-PSA) como frequência f (%) e para o PSA como mediana e amplitude interquartil (P25 – P75).

Tabela 2 – Características dos pacientes estudados com neoplasia da próstata com presença e ausência de metástase óssea

	COM METÁSTASE ÓSSEA	SEM METÁSTASE ÓSSEA	P
N	19	58	
IDADE (ANOS)	71,9 ± 11,5	67,7 ± 10,6	0,144
PSA (ng/mL)	69,11 (23,19 – 787,2)	8,88 (5,87 – 25,81)	< 0,001
Aac anti-PSA > 1, f (%)	12 (63,2)	29 (50,0)	0,464

Os dados estão apresentados para idade como média ± desvio padrão; auto-anticorpos anti-PSA (Aac anti-PSA) como frequência f (%) e para o PSA como mediana e amplitude interquartil (P25 – P75).

Tabela 3 – Características dos pacientes estudados com neoplasia de próstata estratificados em presença de metástase óssea, ausência de metástase óssea, presença de metástase linfonodal e câncer localmente avançado.

	COM METÁSTASE ÓSSEA	SEM METÁSTASE ÓSSEA	COM METÁSTASE LINFONODAL	COM CA LOCAL AVANÇADO	P
N	19	41	4	13	
IDADE (ANOS)	71,9 ± 11,5 ^a	70,2 ± 10,4 ^{a, b}	64,8 ± 11,3 ^{a, b}	60,5 ± 7,8 ^b	0,013
PSA (ng/mL)	69,11 (23,19 – 787,2) ^a	8,31 (5,73 – 28,92) ^{b, c}	26,45 (14,65 - 30,90) ^{a, b, c}	10,46 (5,65 – 14,64) ^c	<0,001
Aac anti-PSA >1, f (%)	12 (63,20)	19 (46,30)	2 (50,00)	8 (61,50)	0,591

Os dados estão apresentados para idade como média ± desvio padrão; auto-anticorpos anti-PSA (Aac anti-PSA) como frequência f (%) e para o PSA como mediana e amplitude interquartil (P25 – P75). Letras-índice não coincidentes representam diferenças estatisticamente significativas.

5. ARTIGO EM INGLÊS

ANTI-PSA AUTOANTIBODY DETECTION IN PATIENTS WITH AND WITHOUT PROSTATE NEOPLASIA

Melissa Helena Angeli ^{1*}, Walter José Koff ^{2**}, Fernando Thomé Kreutz ^{3***}

^{1*} Medicine Graduation Program: Medical Sciences, Faculty of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

^{2**} Full professor and head of the Urology Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre

^{3***} Director of FK Biotecnologia

Mailing address:

Melissa Helena Angeli

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Serviço de Urologia [Urology Service]

Rua Ramiro Barcelos, 2350

Zip Code 90035-903 Porto Alegre, RS, Brazil.

Email: mhangeli@hotmail.com

Phone: + 55 51 21018286

Abstract

Background

The prostate specific antigen is a serum marker used to diagnose prostate cancer, however, its sensitivity and specificity is still far from perfect in early cancer detection. Anti-PSA autoantibodies were observed in patients with benign hyperplasia and with prostate cancer, however, their clinical significance has not yet been fully established. Our objective was to detect anti-PSA autoantibodies in patients under treatment at Hospital de Clínicas de Porto Alegre and to correlate with the pathological stage.

Methods

Anti-PSA autoantibodies were detected by means of an enzyme immunoassay in the serum of 98 patients. Out of these, 77 patients with prostate neoplasia and 21 patients without apparent neoplasia, according to the anatomopathological exam.

Results

Considering the arbitrary value 1.0 as cutoff, we noticed that patients without apparent neoplasia had higher anti-PSA antibody levels than patients with cancer (85.7% and 53.2% respectively) ($p=0.015$).

Analyzing only patients with cancer and stratifying them in four subgroups: presence of bone metastasis, absence of bone metastasis, presence of lymph node metastases and locally advanced cancer, we noticed that patients with bone metastases and with locally advanced cancer had higher levels of anti-PSA antibodies, however not statistically significant ($p=0.591$).

Conclusion

Although more studies are needed to evaluate the real significance of anti-PSA autoantibodies, this study creates the hypothesis that anti-PSA antibodies can be an auxiliary text to PSA in the diagnosis and prognosis prostate cancer, increasing its specificity and sensitivity.

Background

Prostate cancer is the sixth most common type of cancer in the world and the most prevalent in men. The incidence rates of this type of cancer are about six times greater in developed countries than in developing countries.

In 2008, it is estimated that there will be 466,730 new cases of cancer in Brazil, being that half of these cases affects the male sex. In men, except for non-melanoma skin cancer, prostate cancer remains the most common cancer in all regions of Brazil, with 49,530 cases (1).

Prostate specific antigen (PSA), a protein produced mainly by prostate epithelial cells, is widely used in the detection, prognosis and monitoring of prostate cancer, however, a high level of PSA does not always indicate cancer, and a value within the reference range does not exclude this diagnostic hypothesis. High PSA values can be observed in prostate cancer, in benign prostate diseases, like hyperplasia and prostatitis, and in different conditions not related to prostate disease (2-7).

Several approaches have been suggested with the purpose of increasing diagnostic performance in PSA determination as prostate cancer market, like calculation of PSA speed and density, suitability of the cutoff and relation between free PSA and total PSA (8-10).

Anti-PSA autoantibodies were observed in patients with benign prostatic hyperplasia and in patients with prostate cancer, however, their clinical significance has not yet been fully established (11, 12). These autoantibodies can be another aid in the prognosis, follow-up and treatment of this disease.

This study is aimed at detecting anti-PSA antibodies in patients under treatment at Hospital de Clínicas de Porto Alegre and checking possible associations among patients in different stages of prostate neoplasia and clinical and/or lab variables.

Methods

Samples:

Patients receiving treatment at the Urology clinic of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The serums of patients were collected by venous puncture, aliquoted and frozen at -70°C for later analysis of the anti-PSA autoantibodies. The study participants signed an Informed Consent Form that assured nondisclosure of their identity and secrecy of the information obtained in the study.

In all, 98 patients were studied, being that 77 patients had prostate neoplasia and 21 patients did not have apparent neoplasia, according to the anatomopathological exam. Out of the 77 patients with prostate cancer, 41 did not have metastases, 19 had bone metastases, 13 had locally advanced cancer, in this case, patients with perineural, capsular and seminal vesicle invasions and 4 patients had metastases in the lymph nodes.

Methods:

Standardization of the assay to detect anti-PSA autoantibodies:

Sensitization of polystyrene microwell plates (Nunc®) was done with purified PSA (Scripps Laboratories®) in triplicate in the 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20 and 50 µg/mL concentrations in PBS pH 7.2 buffer, dispensing 50µL in each well, the plate being incubated

at the temperature of 4°C for 18 hours. The plate was washed thrice and blocked with 100µL/well of BSA 3% for two hours, at room temperature, under agitation. Three washes were made again, then adding 50µL/well of a monoclonal mouse anti-PSA antibody (FK Biotec®) in the concentration of 10µg/mL, being incubated for 1 hour at room temperature under agitation. This was followed by another washing stage and a second conjugated mouse anti-IgG antibody with peroxidase enzyme (Sigma®) was added in the dilution of 1:1000 in BSA 1% and incubated at room temperature for 1 hour (50µL/well) under agitation. After another washing stage, 50µL/well of TMB chromogen was added (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, Sigma®), being 1mL of TMB 1mg/mL in DMSO (Sigma®) added in 9 mL of citrate phosphate buffer, adding 30 µL of hydrogen peroxide (H₂O₂) (Merck®) . After 15 minutes, 50µL/well of stop solution (sulfuric acid 1M) was added. Reading of the optical density was taken in the SPECTRAmax equipment using the SOFTmaxPRO 3.0 software in the 450nm wavelength. The PSA concentration with the highest optical density without saturation was chosen.

Anti-PSA Autoantibody Detection:

The presence of anti-PSA autoantibodies in the serum of patients was determined by the above described assay, with some modifications. Polystyrene microwell plates (Nunc®) were sensitized with purified PSA (Scripps Laboratories®) in the 5 µg/mL concentration. 50µL/well was added and the plate was incubated at 4°C for 18 hours. After, the microwell plates were washed thrice and blocked with 100µL/well of BSA 3% for 2 hours, at room temperature, under agitation. After a new washing stage, 50 µL of the samples was added (serum from the patients), diluted 1:21 in BSA 1% and incubated for 18 hours at 4°C. The microwell plates were washed again three times and then 50µL/well of human anti-IgG and anti-IgM antibodies marked with peroxidase (FK Biotec®). The incubation time was 1 hour. Another washing stage was performed and 50 µL/well of chromogen was added. It was incubated for 15 minutes and 50µL/well of stop solution (sulfuric acid 1M) was added. The reading was taken at 450nm wavelength in absorbance spectrophotometer – SPECTRAmax equipment using the SOFTmaxPRO 3.0 software. Each sample was tested three times in different assays. A monoclonal mouse anti-PSA antibody (FK Biotec®) was used as positive control in the concentration of 10 µg/mL diluted in BSA 1%.

Statistical Analysis:

The data was described as mean and standard deviation and, for PSA, as median and interquartile range due to the asymmetrical distribution.

χ^2 square tests were used to evaluate association among categorical variables and the Student's t-test to compare means in independent samples.

To compare means between three or more categories, variance analysis was used.

To compare asymmetrical variables among the subgroups, the Kruskal-Wallis test was used, and for PSA, a conversion was conducted ordering by posts to make the multiple comparisons among the different groups.

The correlations were evaluated using the Pearson correlation coefficient, for variables with symmetrical distribution and Spearman correlation coefficient when the distribution is asymmetrical.

The significance level adopted was $\alpha = 0.05$. The data was analyzed in the SPSS release 14.0 and Sigma Plot release 8.0 programs.

Results

PSA Concentration Standardization for sensitization of the plates:

Through an enzyme immunoassay, the ideal concentration for sensitization of the polystyrene microwell plates in order to determine the anti-PSA autoantibodies was set at $5\mu\text{g/mL}$, as shown in Figure 1.

Anti-PSA Autoantibody Detection:

This study determined the presence of anti-PSA autoantibodies classes IgG and IgM in the serum of 77 patients with prostate neoplasia and 21 patients without apparent neoplasia, according to the anatomopathological exam. Out of the 77 patients with prostate cancer, 41 did not have metastases, 19 had bone metastases, 13 had locally advanced cancer and 4 patients had metastases in the lymph nodes.

The samples were tested thrice in simplicate. The inter-assay variation coefficient was 11%.

To prevent a possible inter-assay interference, we chose to standardize the data, establishing a relation between the value of mean optical density of the serum of patients and the value of the mean optical density of the assay positive control.

The cutoff used in this study was 1.0, based on previous studies. Patients with autoantibody rate greater than 1.0 were considered positive for the presence of anti-PSA autoantibodies.

Initially, the patients were stratified in a group with cancer and a group without apparent cancer, according to the anatomopathological exam, as seen in Table 1 and Figure 2.

Considering the value 1.0 as cutoff, we noticed that patients without apparent neoplasia had higher anti-PSA antibody levels than patients with cancer (85.7% and 53.2% respectively) ($p=0.015$).

Analyzing only patients with cancer, we stratified them according to the presence or absence of bone metastases. The data is shown in Table 2. Regarding the presence of anti-PSA autoantibodies, patients with bone metastases had autoantibody levels higher than those of patients without bone metastases, however, the difference found was not statistically significant ($p=0.464$).

Also analyzing only patients with cancer, but stratifying them in four subgroups: presence of bone metastasis, absence of bone metastasis, presence of lymph node metastases and locally advanced cancer, we noticed that patients with bone metastases and with locally advanced cancer had higher levels of anti-PSA antibodies, however not statistically significant ($p=0.591$), as shown in Table 3 and Figure 3.

On establishing correlations between age and anti-PSA autoantibodies and PSA and anti-PSA autoantibodies, we verified the absence of correlation with $p = 0.932$ and $p = 0.807$, respectively.

Discussion

PSA is considered to be the best tumor marker for prostate cancer, however, it must not be used as screening test in isolation, but as complement to rectal touch, because 38% to 48% of patients with cancer confined to prostate have normal PSA levels(13). The role of PSA in the staging and screening of prostate cancer is still limited due to the broad and overlapped ranges of PSA levels in the blood present in many patients with localized disease or advanced metastatic disease.

Currently, there are no serum markers that differentiate clinically relevant diseases from benign diseases of the prostate. Better indicators of presence and progression of prostate cancer are needed to prevent unnecessary treatment, unnecessary biopsy, predict the course of the disease and develop more effective therapies (14, 15).

PSA is a 34 KDa protease with sequence homologous to the family of kallikreins of serine proteases. Autoantibodies against other serine proteases have already been described in several autoimmune diseases, like Wegener granulomatosis, arthritis nodosa, Churg-Strauss syndrome and inflammatory bowel disease (16, 17).

Also, the presence of autoantibodies has been reported in hyperplasia like in Graves Disease, Myasthenia gravis benign lymph node disorders of the lung(11).

In 1995, Zisman et al. raised the hypothesis of a possible autoimmune process in the benign prostatic hyperplasia through detection of anti-PSA autoantibodies. In his study, 59% of the patients studied with benign prostatic hyperplasia had anti-PSA autoantibodies (11). Not all patients showed reaction, they would possibly respond to other prostate antigens, like prostate specific antigen of the membrane or androgen receptor (12, 15).

In the 70s and 80s, the presence of serum autoantibodies was demonstrated in patients with prostate cancer, but because its real significance was unknown, it was regarded as an unspecific immune response. In recent years, interest in characterizing a response to the autoantibodies in prostate cancer reemerged (12).

In this study, we detected anti-PSA autoantibodies in patients with or without prostate neoplasia, according to the anatomopathological exam.

The study shows that patients without anatomopathological diagnosis of prostate cancer had higher levels of autoantibodies than patients with cancer, when the cutoff is taken as 1.0 (Table 1 and Figure 2). Some remarks are pertinent in relation to these results. The patients with neoplasia who took part in this study sought care in the hospital due to symptoms. All these 21 patients had PSA levels between 4 and 10 ng/mL and were subjected to biopsy, which did not show presence of neoplasia.

It is known that PSA levels less than 10 ng/mL have low specificity for the disease confined to the organ. The extensive overlapping of total PSA levels among health individuals and prostate cancer patients results in inaccurate distinguishing of cancer patients and normal individuals when PSA is in the range between 4 and 10 ng/mL (18). Due to the low specificity of total PSA for cancer diagnosis, the number of biopsies is very high to

confirm the tumor. A recent study showed that the tumors occupy only 15.6% of pre-surgery biopsies, approximately half of what is seen in *ex vivo* biopsies (19).

Anti-PSA autoantibodies were found in patients with prostate cancer and it was found that these antibodies can interfere in immunoassays, blocking the binding sites of monoclonal antibodies, underestimating the values of PSA (20).

Considering these aspects, two hypotheses can be suggested: the patient may be hiding a prostate cancer neither diagnosed by the biopsy nor evidenced by the total PSA, which remains in normal levels, since the autoantibodies are interfering in the PSA assay, or the autoantibodies, at high levels, have a protective effect against cancer, or still, they are markers of an anti-tumor response.

Also in this study, we evaluated only patients with cancer, stratified by staging (Table 2 and 3 and Figure 3). It was found that patients with bone metastases and with locally advanced cancer had higher levels of anti-PSA autoantibodies, however, they were not statistically significant ($p=0.591$). To detect a difference between the percentages of anti-PSA autoantibodies, we would have to obtain a greater sampling; with the N used in this comparison, the power of the statistic test to detect a clinically relevant difference is low.

Anti-PSA autoantibodies propose an information different from that obtained by the PSA test, illustrated by the absence of correlation between both tests. Thus, detection of anti-PSA autoantibodies is not an alternative to PSA but rather a possible complementary test to help in prostate cancer diagnosis and prognosis.

Conclusions

The development of new and clinically relevant markers for prostate cancer diagnosis and prognosis is essential for better identification and treatment of this disease.

This study suggests that anti-PSA autoantibodies can be an auxiliary test to PSA in diagnosis prostate cancer. Further studies are needed to evaluate the real significance of anti-PSA autoantibodies in prostate cancer.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interests.

Acknowledgements

This work was supported by the Research Incentive Fund/Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

References

1. BRASIL, Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2007. Disponível em: <<http://www.inca.org.br>>. Acesso em 28 nov. 2007.
2. Lorente JA, Arango O, Bielsa O, Cortadellas R, Gelabert-Mas A. Effect of antibiotic treatment on serum PSA and percent free PSA levels in patients with biochemical criteria for prostate biopsy and previous lower urinary tract infections. *Int J Biol Markers*. 2002 Apr-Jun;17(2):84-9.
3. Potts JM. Prospective identification of National Institutes of Health category IV prostatitis in men with elevated prostate specific antigen. *J Urol*. 2000 Nov;164(5):1550-3.
4. Soletormos G, Semjonow A, Sibley PE, Lamerz R, Petersen PH, Albrecht W, et al. Biological variation of total prostate-specific antigen: a survey of published estimates and consequences for clinical practice. *Clin Chem*. 2005 Aug;51(8):1342-51.
5. Stenman UH. Prostate-specific antigen, clinical use and staging: an overview. *Br J Urol*. 1997 Mar;79 Suppl 1:53-60.
6. Schellhammer PF, Wright GL, Jr. Biomolecular and clinical characteristics of PSA and other candidate prostate tumor markers. *Urol Clin North Am*. 1993 Nov;20(4):597-606.
7. Prostate-specific antigen (PSA) best practice policy. American Urological Association (AUA). *Oncology (Williston Park)*. 2000 Feb;14(2):267-72, 77-8, 80 passim.
8. Balk SP, Ko YJ, Bubley GJ. Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol*. 2003 Jan 15;21(2):383-91.
9. Jain S, Bhojwani AG, Mellon JK. Improving the utility of prostate specific antigen (PSA) in the diagnosis of prostate cancer: the use of PSA derivatives and novel markers. *Postgrad Med J*. 2002 Nov;78(925):646-50.

10. Hoffman RM. Screening for prostate cancer. [base de dados na internet]. Wellesley, Mass.: BDR-Up to date. Disponível em: <www.uptodate.com>. [atualizada em 14 nov. 2007; acesso em 29 ago. 2007]
11. Zisman A, Zisman E, Lindner A, Velikanov S, Siegel YI, Mozes E. Autoantibodies to prostate specific antigen in patients with benign prostatic hyperplasia. *J Urol*. 1995 Sep;154(21):1052-5.
12. Casiano CA, Mediavilla-Varela M, Tan EM. Tumor-associated antigen arrays for the serological diagnosis of cancer. *Mol Cell Proteomics*. 2006 Oct;5(10):1745-59.
13. Kreuz FT, Suresh MR. Novel bispecific immunoprobe for rapid and sensitive detection of prostate-specific antigen. *Clin Chem*. 1997 Apr;43(4):649-56.
14. Armbruster DA. Prostate-specific antigen: biochemistry, analytical methods, and clinical application. *Clin Chem*. 1993 Feb;39(2):181-95.
15. Paul B, Dhir R, Landsittel D, Hitchens MR, Getzenberg RH. Detection of prostate cancer with a blood-based assay for early prostate cancer antigen. *Cancer Res*. 2005 May 15;65(10):4097-100.
16. Tricoli JV, Schoenfeldt M, Conley BA. Detection of prostate cancer and predicting progression: current and future diagnostic markers. *Clin Cancer Res*. 2004 Jun 15;10(12 Pt 1):3943-53.
17. Falk RJ, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med*. 1988 Jun 23;318(25):1651-7.
18. Saxon A, Shanahan F, Landers C, Ganz T, Targan S. A distinct subset of antineutrophil cytoplasmic antibodies is associated with inflammatory bowel disease. *J Allergy Clin Immunol*. 1990 Aug;86(2):202-10.
19. Sreekumar A, Laxman B, Rhodes DR, Bhagavathula S, Harwood J, Giacherio D, et al. Humoral immune response to alpha-methylacyl-CoA racemase and prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Jun 2;96(11):834-43.
20. Walton TJ, McCulloch TA, Rees RC, Bishop MC. Obtaining fresh prostate cancer tissue for research: a novel biopsy needle and sampling technique for radical prostatectomy specimens. *Prostate*. 2005 Sep 1;64(4):382-6.
21. Van Duijnhoven HL, Pequeriaux NC, Van Zon JP, Blankenstein MA. Large discrepancy between prostate-specific antigen results from different assays during longitudinal follow-up of a prostate cancer patient. *Clin Chem*. 1996 Apr;42(4):637-41.

Figures

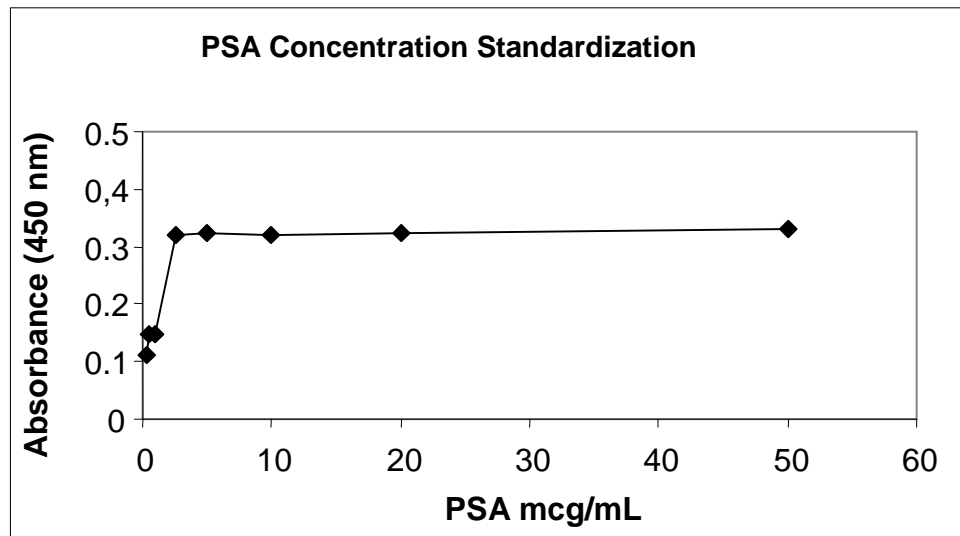


Figure 1: PSA concentration standardization for the anti-PSA autoantibody detection assay.

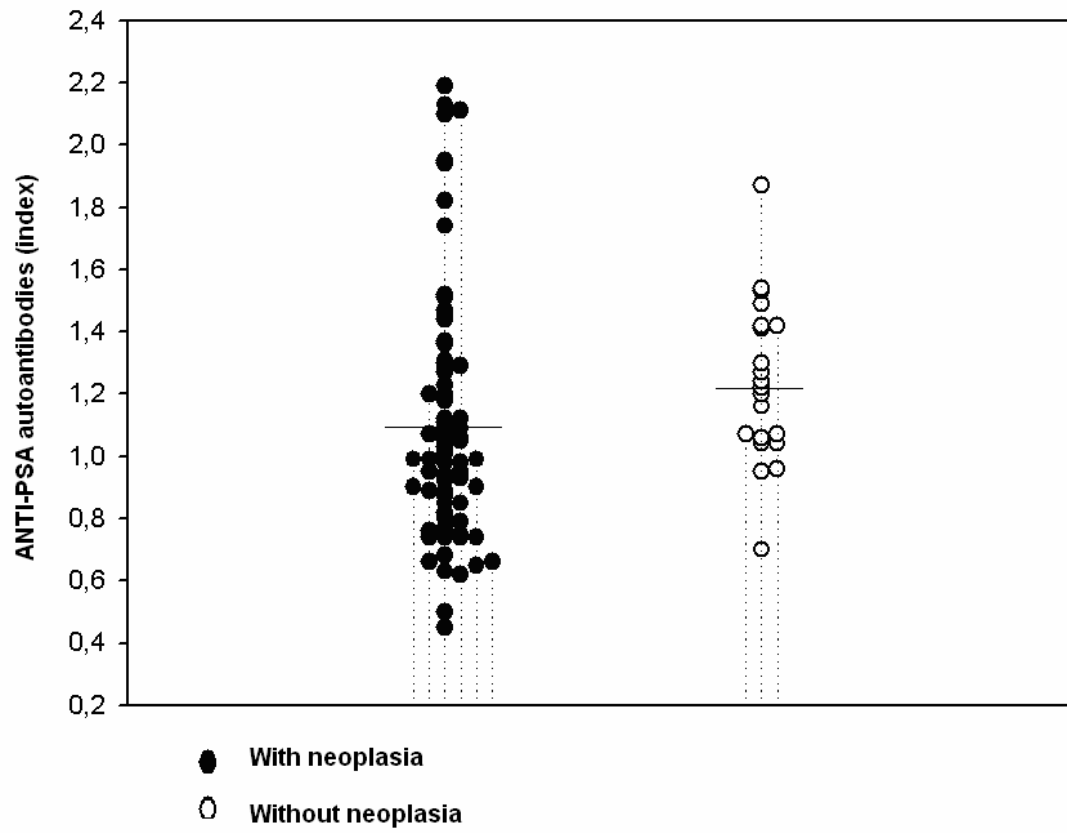


Figure 2: Anti-PSA autoantibodies in patients with and without prostate neoplasia.

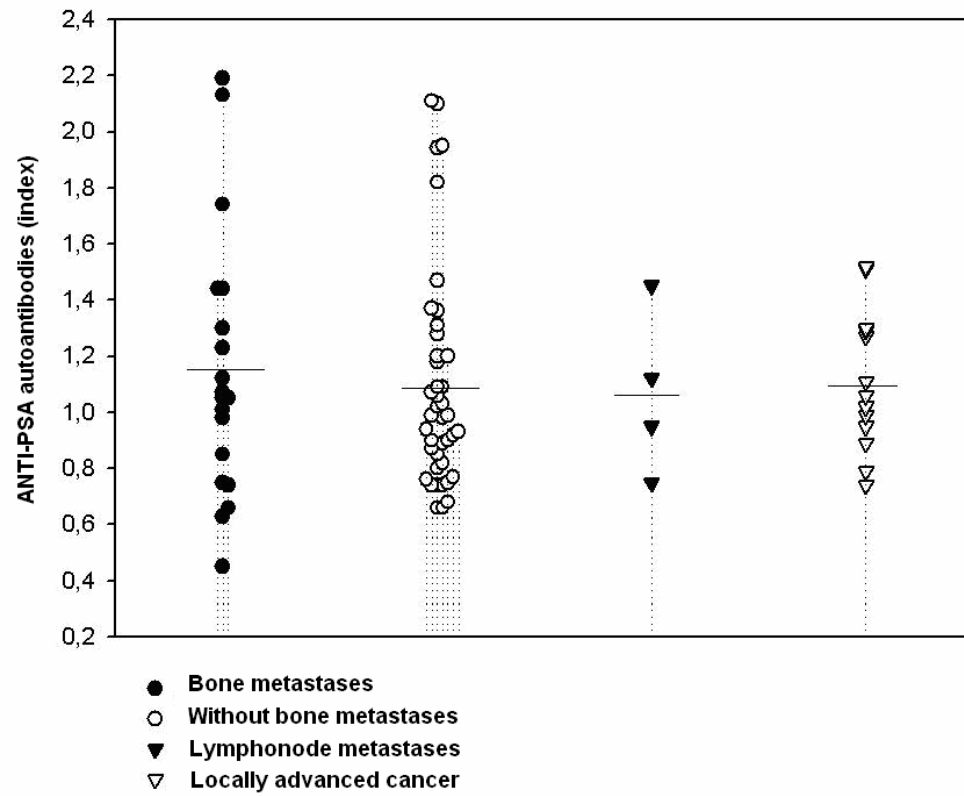


Figure 3: Anti-PSA autoantibodies in patients with bone metastases, without bone metastases, with lymph node metastases and with locally advanced cancer.

Tables

Table 1 – Characteristics of the patients studied with and without prostate neoplasia

	WITH NEOPLASIA	WITHOUT NEOPLASIA	P
N	77	21	
AGE (YEARS)	68.7 ± 10.9	68.7 ± 6.5	>0.999
PSA (ng/mL)	14.77 (6.49 – 42.88)	5.88 (4.72 – 7.28)	< 0.001
Anti-PSA autoantibodies			
> 1, f (%)	41 (53.2)	18 (85.7)	0.015

The data is shown for age as mean ± standard deviation; for anti-PSA autoantibodies as frequency f (%) and for PSA as median and interquartile range (P25 – P75).

Table 2 – Characteristics of the patients studied with prostate neoplasia with presence and absence of bone metastases

	WITH BONE METASTASES	WITHOUT BONE METASTASES	P
N	19	58	
AGE (YEARS)	71.9 ± 11.5	67.7 ± 10.6	0.144
PSA (ng/mL)	69.11 (23.19 – 787.2)	8.88 (5.87 – 25.81)	< 0.001
Anti-PSA autoantibodies			
> 1, f (%)	12 (63.2)	29 (50.0)	0.464

The data is shown for age as mean ± standard deviation; for anti-PSA autoantibodies as frequency f (%) and for PSA as median and interquartile range (P25 – P75).

Table 3 – Characteristics of the patients studied with prostate neoplasia stratified in the presence of bone metastases, absence of bone metastases, presence of lymph node metastases and locally advanced cancer.

	WITH BONE METASTASES	WITHOUT BONE METASTASES	WITH LYMPH NODE METASTASES	WITH LOCALLY ADVANCED CANCER	P
N	19	41	4	13	
AGE (YEARS)	71.9 ± 11.5 ^a	70.2 ± 10.4 ^{a, b}	64.8 ± 11.3 ^{a, b}	60.5 ± 7.8 ^b	0.013
PSA (ng/mL)	69.11 (23.19 - 787.2) ^a	8.31 (5.73 - 28.92) ^{b, c}	26.45 (14.65 - 30.90) ^{a, b, c}	10.46 (5.65 - 14.64) ^c	<0.001
Anti-PSA autoantibodies > 1, f (%)	12 (63.20)	19 (46.30)	2 (50.00)	8 (61.50)	0.591

The data is shown for age as mean ± standard deviation; for anti-PSA autoantibodies as frequency f (%) and for PSA as median and interquartile range (P25 - P75). Letters-non-coinciding index represents statistically significant differences.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O desenvolvimento de novos e clinicamente relevantes marcadores para o diagnóstico e prognóstico do câncer de próstata é essencial para uma melhor identificação e tratamento desta doença.

Este estudo sugere que os auto-anticorpos anti-PSA podem ser um teste auxiliar ao PSA para o diagnóstico e prognóstico do câncer de próstata.

Estudos avaliando grupos definidos da doença, similar a este trabalho, porém com uma amostragem maior são necessários para estabelecer futuras correlações.