

**Estudo da Incidência do Cancro da Próstata
na RAM e Avaliação da Sua Detecção Precoce,
Através da Associação do Marcador
[-2] proPSA ao PSA e PSA Livre**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Dulce Helena Fernandes da Silva

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA



UNIVERSIDADE da MADEIRA

A Nossa Universidade

www.uma.pt

julho | 2015

**Estudo da Incidência do Cancro da Próstata
na RAM e Avaliação da Sua Detecção Precoce,
Através da Associação do Marcador
[-2] proPSA ao PSA e PSA Livre**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Dulce Helena Fernandes da Silva

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA

ORIENTADOR

Miguel Ângelo Almeida Pinheiro de Carvalho

CO-ORIENTADOR

Ilídio Rodrigues de Ornelas

“Estudo da incidência do cancro da próstata na RAM e avaliação da sua deteção precoce, através da associação do marcador [-2] proPSA ao PSA e PSA livre.”

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Dulce Helena Fernandes

Estudo da incidência do cancro da próstata na RAM e avaliação da sua deteção precoce, através da associação do marcador [-2] proPSA ao PSA e PSA livre. 106pp.

Cancro da Próstata, Antigénio Específico da Próstata, PSA livre, [-2] proPSA, incidência, prevalência.

Dissertação de Mestrado – Programa de Mestrado em Bioquímica Aplicada – Universidade da Madeira – Funchal, Portugal.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Silva DHF. Estudo da incidência do cancro da próstata na RAM e avaliação da sua deteção precoce, através da associação do marcador [-2] proPSA ao PSA e PSA livre. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Aplicada), Universidade da Madeira, Portugal, 2015;106pp.

Dissertação realizada sob a orientação do Professor Doutor Miguel Ângelo Carvalho, docente do Centro de Competências das Ciências da Vida, Universidade da Madeira e coorientação do Dr. Ilídio Ornelas, Técnico Superior de Saúde no Laboratório de Patologia Clínica, Hospital Dr. Nélío Ferraz Mendonça.

Índice

Objetivos.....	17
1. Introdução	18
1.1. Cancro	18
1.1.1. Biologia molecular do cancro	18
1.2. Cancro na próstata	22
1.2.1. Próstata	23
1.2.2. Prevalência e incidência do cancro da próstata	25
1.2.3. Fatores de risco.....	27
1.2.4. Bioquímica do cancro da próstata	28
1.2.5. Diagnóstico do cancro da próstata	34
1.2.6. Tratamento do cancro da próstata	39
1.3. Imunoensaio quimiluminescente	41
1.3.1. Quimiluminescência.....	41
1.4. Curva ROC.....	42
2. Metodologia Experimental.....	43
2.1. Aprovação pela comissão de ética.....	43
2.2. Amostragem	43
2.2.1. Identificação das amostras	43
2.2.2. Colheita e preparação das amostras	44
2.2.3. Recolha de dados.....	44
2.3. Metodologia.....	45
2.3.1. Avaliação dos testes	47
2.4. Análise estatística dos dados	48
3. Resultados.....	49
3.1. Caracterização da amostra inicial.....	49
3.1.1. Entidade requisitante	50
3.1.2. Pedido de diagnóstico.....	51
3.1.3. Origem geográfica.....	52
3.1.4. Idade	53
3.2. Caracterização da subamostra de indivíduos na zona cinzenta.....	55
3.2.1. Idade	56
3.3. Caracterização da subamostra de indivíduos submetidos a biópsia	56
3.3.1. Entidade requisitante	57
3.3.2. Origem geográfica dos pedidos de biópsia	58
3.3.3. Idade	60

3.4. Utilização de marcadores serológicos na classificação dos indivíduos, segundo o risco e diagnóstico do cancro da próstata	61
3.4.1. PSA total	61
3.4.2. Cancro da próstata e PSA livre	63
3.4.3. Correlação entre marcadores serológicos.....	63
3.4.4. Cálculo do Beckman Coulter Phi	65
3.4.5. Teste ROC	68
3.5. Classificação de Gleason.....	71
Discussão	72
Conclusão	79
Bibliografia.....	80
Anexos.....	89

Índice de Figuras

Figura 1.	Aspeto das diferenças morfológicas entre tumores benignos (A) e tumores malignos (B) [2].....	19
Figura 2.	Aspeto do processo de carcinogénese [2,7].....	20
Figura 3.	Aspeto da mutação e desenvolvimento do cancro [8].	21
Figura 4.	Representação esquemática da localização da próstata e diferentes zonas que a constituem, adaptado de Greene et al. [28].....	25
Figura 5.	Taxa de incidência anual por cancro da próstata e taxa de mortalidade anual por cancro da próstata /100.000 indivíduos (Globocan 2008, IARC [21]).	26
Figura 6.	Evolução da incidência/mortalidade por cancro na próstata, com a idade, numa extrapolação para 100.000 indivíduos (Globocan 2008, IARC [21]).	27
Figura 7.	Esquema de diagnóstico do cancro da próstata [43].....	35
Figura 8.	Princípio do teste de EIA, técnica de quimiluminescência [98].....	41
Figura 9.	Analizador automática UniCel DxI 800 [97].....	45
Figura 10.	Princípio de funcionamento do teste de PSA no UniCel DxI 800 técnica (“sandwich”) [98].	47
Figura 11.	Distribuição dos pedidos de análises para marcadores oncológicos da doença da próstata por serviço requisitante.	50
Figura 12.	Diagnóstico associado aos pedidos de análises oncológicas para cancro da próstata.....	51
Figura 13.	Distribuição geográfica de pedidos de análise dos marcadores serológicos.	52
Figura 14.	Origem geográfica dos pedidos de análises serológicas para cancro da próstata.....	53
Figura 15.	Distribuição por faixas etárias dos indivíduos com pedidos de análises oncológicas para deteção do cancro da próstata.	54
Figura 16.	Distribuição dos pedidos de biópsias pelos diferentes serviços requisitantes.	57

Figura 17. Percentagem de pedidos de biópsias relativamente à população total de cada conelho e à quantidade de pedidos de análise de PSA.....	59
Figura 18. Frequência de biópsias positivas e negativas por conelho, em relação ao número total de biópsias.	59
Figura 19. Distribuição de biópsias positivas e negativas por faixas etárias.	61
Figura 20. Frequência do resultado das biópsias por faixa etária dos indivíduos com PSA total superior a 2,0 ng/mL.	62
Figura 21. Frequência do resultado de biópsias positivas segundo os cut offs de PSA livre.	63
Figura 22. Variação do PSA total em função do PSA livre e cálculo da respetiva correlação, para os 25 indivíduos submetidos a biópsia.....	64
Figura 23. Variação do PSA total em função do [-2] proPSA e cálculo da respetiva correlação, para os 25 indivíduos submetidos a biópsia.....	64
Figura 24. Cálculo da curva ROC para os marcadores serológicos PSA, PSA livre, [-2] proPSA e Phi, utilizando a amostra dos 25 indivíduos submetidos a biópsia, com o programa SPSS.	68
Figura 25. Cálculo da curva ROC para os marcadores serológicos (intervalo de PSA 2,0 a 10,0 ng/mL), utilizando o programa SPSS.	70

Índice de Tabelas

Tabela 1.	Avaliação do fator familiar (história familiar) no risco e propensão para contrair o cancro da próstata [34].	28
Tabela 2.	Influência das diversas manipulações da próstata nos níveis de PSA sérico [75].	31
Tabela 3.	Percentagens de fPSA em homens com valores de PSA total [2,0 – 4,0] ng/mL [43].	32
Tabela 4.	Valores de PSA ajustados à faixa etária [81].	34
Tabela 5.	Classificação de Gleason utilizada para determinar o estado e grau de diferenciação do tumor da próstata [89,90].	37
Tabela 6.	Número de pedidos dos marcadores serológicos.	49
Tabela 7.	Valor mínimo, máximo e média registada para os marcadores serológicos PSA e PSA livre.	50
Tabela 8.	Distribuição dos pedidos de análise aos marcadores oncológicos de acordo com o diagnóstico clínico associado.	51
Tabela 9.	Estimativa da população masculina residente na Região Autónoma da Madeira e por concelho em 31 de dezembro de 2012 [116] e quantidade de indivíduos por concelho.	52
Tabela 10.	Relação do PSA e % fPSA segundo a faixa etária dos utentes.	53
Tabela 11.	Distribuição de indivíduos por valores de referência de PSA e relação com o rácio.	55
Tabela 12.	Distribuição de indivíduos por valores de referência de PSA ajustados à idade.	56
Tabela 13.	Amostra dos indivíduos analisados ao PSA com apresentação do número de biópsias realizadas.	57
Tabela 14.	Quantidade de pedidos de biópsias por concelho da Região Autónoma da Madeira em relação aos pedidos de análise e marcadores.	58

Tabela 15. Distribuição dos indivíduos submetidos a biópsia por faixas etárias e respetiva percentagem em relação à quantidade de indivíduos sujeitos a análises do PSA.	60
Tabela 16. Resultados das biópsias realizadas aos indivíduos e frequência, por faixa etária.	60
Tabela 17. Distribuição de biópsias positivas e negativas, segundo os intervalos de PSA.	61
Tabela 18. Resultado das biópsias por faixa etária dos indivíduos com PSA total superior a 2,0 ng/mL.	62
Tabela 19. Distribuição das biópsias positivas, segundo os cut offs de PSA livre.	63
Tabela 20. Comparação de valores médios de utentes com patologia da próstata e sem patologia.	65
Tabela 21. Variação dos valores de Phi e o risco do indivíduo contrair CP [98].	66
Tabela 22. Variação dos valores do Beckman Coulter Phi na subamostra com vinte e cinco indivíduos.	66
Tabela 23. Diagnóstico anátomo-patológico dos pacientes com biópsia negativa.	67
Tabela 24. Valores obtidos no cálculo da área sob a curva ROC para os marcadores serológicos (intervalo de PSA > 2,0 ng/mL).	69
Tabela 25. Valores obtidos no cálculo da área sob a curva ROC para os marcadores serológicos (intervalo de PSA 2,0 a 10,0 ng/mL).	70
Tabela 26. Classificação de Gleason dos doentes com patologia da próstata.	71

Dedicatória

Dedico esta Dissertação ao meu amigo, companheiro e marido Rafael Rodrigues, pela coragem, força e proteção que me fizeram nunca desistir e que me ampararam em momentos menos bons.

Ao João Francisco que está a caminho, pelo tempo roubado na preparação do seu enxoval para me dedicar à finalização da dissertação.

Aos meus amados e queridos pais, que sempre acreditaram em mim e que nunca me deixaram desistir.

Agradecimentos

No encerramento deste trabalho e da etapa que com ele termina, foram muitos os que contribuíram, com a sua ajuda e estímulo, para a sua realização. Assim, a todos dirijo uma palavra de apreço e de gratidão, nomeadamente:

À Comissão de ética do Hospital Dr. Nélio Mendonça, pela oportunidade concebida para a execução do trabalho.

Ao Professor Doutor Miguel Ângelo Carvalho, orientador interno, pela atenção dispensada na orientação do texto, pela cooperação e pelos conselhos dados durante o estágio.

Ao meu orientador externo, Dr. Ilídio Ornelas, a minha gratidão por ter aceitado orientar-me neste estudo e pela disponibilidade que sempre demonstrou para entender as minhas dificuldades.

À Professora Doutora Helena Tomás, coordenadora do Mestrado em Bioquímica Aplicada, pela atenção prestada, sempre de uma forma carinhosa.

À Dra. Graça Andrade e ao Dr. José Camacho, Diretora e Diretor do serviço de Patologia Clínica e Anatomia Patológica do Hospital Dr. Nélio Mendonça, pelo fornecimento de dados, bem como, pelo apoio, simpatia, compreensão e disponibilização das condições necessárias ao desenvolvimento e conclusão do trabalho.

Às minhas amigas e colegas de trabalho, em particular à Dra. Fabiana Gonçalves e à Dra. Gracinda Marques, pelo apoio e palavra amiga.

Um agradecimento especial ao meu marido, Rafael Rodrigues, e aos meus pais pelo amor incondicional, apoio, coragem e confiança que sempre me incutiram.

Ao Dr. Filipe Ganança e ao Élder Pinto pelo seu constante apoio e compreensão durante a elaboração do trabalho.

Ao Dr. André Peixe, ao engenheiro Carlos Valente e ao Dr. Marcus Fazenda, representantes da firma CH WERFEN e BECKMAN COULTER PORTUGAL, pelo fornecimento do Kit de reagente [-2] proPSA, sem o qual este não seria possível a realização do trabalho.

A todos o meu muito obrigado!

“O importante é não parar nunca de questionar”.

(Albert Einstein)

Abreviaturas

aa	Aminoácidos
APS	Antigénio Específico da Próstata (em inglês)
ARE	Elementos de resposta a antigénios
AUC	Área sob a curva
bp	Pares de base
CP	Cancro da próstata
DHT	Dihidrotestosterona
EIA	Imunoensaio enzimático
FAP	Fosfatase ácida prostática
HBP	Hiperplasia benigna da próstata
INE	Instituto Nacional de Estatística
kp	kilo pares de base
kDa	kiloDalton
MODULAB	Software informático
PSA	Antigénio específico da próstata
BPSA	PSA na forma benigna
cPSA	PSA na forma complexada
fPSA	PSA na forma livre
proPSA	Percursor do PSA
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAT-Win	Software informático

Glossário

Classificação de Gleason – Classificação numérica que avalia o estado de diferenciação glandular, bem como o crescimento do tumor em relação ao estroma prostático. Quanto menor o seu valor, melhor o prognóstico do paciente [89,90].

Cut-offs – Valores de corte (ou de referência) para um determinado parâmetro analítico.

ROC – Representação gráfica que apresenta a especificidade do teste (marcadores), através do índice de verdadeiros positivos em relação ao índice de falsos positivos. Um valor de 0,5 de área sob a curva corresponde a um valor nulo. Um valor acima de 0,7 é considerado como um valor de desempenho satisfatório [102].

Resumo

O cancro da próstata (CP) é uma das patologias mais frequentes no homem em todo o mundo, sendo considerado um grave problema de saúde pública.

Esta patologia apresenta uma elevada heterogeneidade, pelo que nos dias de hoje, torna-se cada vez mais, importante a realização de estudos a nível dos possíveis fatores de risco, diagnóstico, progressão e tratamento da doença.

A introdução do antigénio específico da próstata (PSA) como marcador serológico possibilitou grandes avanços na deteção precoce do cancro da próstata. Atualmente é o marcador serológico mais utilizado a nível de rastreio, embora ainda existam algumas dúvidas, relativamente à sensibilidade e à especificidade do teste.

Assim sendo, torna-se fundamental a descoberta de novos marcadores que auxiliem quer o diagnóstico quer o prognóstico da patologia, de modo a evitar ou a retardar a progressão da doença, conduzindo a novas terapias menos invasivas para o doente.

Com o presente trabalho realizou-se um estudo retrospectivo que incluiu soros de 15.369 indivíduos masculinos, com o intuito de avaliar a incidência de cancro da próstata na Região Autónoma da Madeira (RAM), os quais foram submetidos a análise para detetar as quantidades de PSA, PSA livre e [-2] proPSA, utilizando a técnica de imunoensaio quimiluminescente. A 82 desses indivíduos foram realizadas biópsias, das quais 27 apresentaram resultados positivos e 55 apresentaram resultados negativos. De acordo com os valores de cut-offs do PSA, intervalo [2,0-10,0 ng/mL], 33% das biópsias eram positivas e 67% das biópsias eram negativas.

A doença atingiu maioritariamente os indivíduos com idade superior a 70 anos (63,63%), tendo 2 pacientes apresentado um score de Gleason superior a 7 (tumor agressivo) e 3 pacientes, um score menor que 7 (tumor moderadamente diferenciado).

O teste ROC em que foram comparados os valores de PSA, PSA livre e [-2] proPSA permite aferir que o [-2] proPSA foi a isoforma do PSA que apresentou maior valor de predição na deteção precoce do CP.

Este trabalho procurou contribuir para um melhor conhecimento do perfil dos indivíduos, com maior probabilidade de contraírem o cancro da próstata na população da RAM.

Palavras-chave: Cancro da Próstata; Antigénio Específico da Próstata; PSA Livre; [-2] proPSA; incidência; prevalência.

Abstract

Prostate cancer is the most frequent pathology in man worldwide and is considered a serious public health problem.

This disease shows to be highly variable in its clinical features, so nowadays it is increasingly important to conduct studies about the risk factors, diagnostic, progression and treatment of disease.

The introduction of prostate specific antigen (PSA) as a serological marker enables great advances in early diagnostic of prostate cancer. The PSA is currently the most widely used serum marker in the screening of prostate cancer, although still some doubts about the sensitivity and specificity of this test. Therefore, it becomes essential to discover novel markers that can assist both in terms of diagnosis and prognosis of disease, and to prevent the progression of the disease, leading to new less invasive therapies.

In this work we performed a retrospective study with a total of 15.369 individuals, in order to assess the incidence of prostate cancer in Autonomous Region of Madeira (RAM), which serum samples were submitted to chemiluminescent immunoassay to detect the amounts of PSA, free PSA and [-2] proPSA. Among these individuals, 82 biopsies has been realized from which 27 were positive and 55 negative. For PSA values in the interval range of 2,0-10,0 ng/ml, 33% biopsies were positive and 67 % negative.

The disease shows higher prevalence in men older than 70 years (63,63 %). Two patients had Gleason score greater than 7 (aggressive tumor), and 3 patients, a lower score than 7 (moderately differentiated tumor).

According to ROC test, which compares PSA, free PSA and [-2] proPSA values, the last one is himself as the best predictor for early detection of prostate cancer.

This study sought to contribute to a better understanding of prostate cancer in the population profile of RAM.

Keywords: Prostate Cancer; Prostate Specific Antigen; Free PSA; [-2] proPSA; incidence; prevalence.

Objetivos

Esta dissertação teve como principal objetivo analisar o universo de indivíduos referenciados com potencial neoplasia da próstata, procurando-se verificar as suas similaridades ou dissimilaridades com estudos análogos, em termos de estrutura, origem e diagnósticos da amostra. A utilização dos marcadores tumorais convencionais no diagnóstico, a sensibilidade e especificidade no diagnóstico e a deteção de cancro da próstata foram também objeto de estudo, assim como a importância e perspectiva de introdução de um novo marcador tumoral, [-2] proPSA, no aumento da sua sensibilidade e especificidade, numa tentativa de redução de métodos invasivos no diagnóstico do cancro da próstata (número de biópsias à próstata) nos pacientes.

Objetivos específicos

- Caracterizar a amostra populacional dos indivíduos que realizaram a análise de marcadores tumorais para o cancro da próstata no laboratório de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélio Mendonça (HDNM) entre maio de 2011 e abril de 2012.
- Determinar a incidência de cancro da próstata na Região Autónoma da Madeira, entre maio de 2011 e abril de 2012
- Avaliar a eficácia dos marcadores tumorais no diagnóstico de doença da próstata, através da avaliação da sua sensibilidade e especificidade.
- Avaliar o grau de coincidência entre os resultados obtidos com os marcadores tumorais e as biópsias na aferição dos marcadores tumorais mais fiáveis no diagnóstico de cancro da próstata.
- Sensibilizar os clínicos relativamente à necessidade de pedidos mais assertivos das biópsias, os quais poderão levar à redução de custos, inerentes ao diagnóstico e tratamento do cancro da próstata.

1. Introdução

O meu projeto teve por finalidade o estudo da incidência do cancro da próstata na Região Autónoma da Madeira e a avaliação da sua deteção precoce, através da análise e associação dos marcadores serológicos PSA, PSA livre e [-2] proPSA ao diagnóstico do cancro. Esta procura contribuiu para a análise da possibilidade de redução do número de biópsias à próstata, através do recurso a um novo marcador tumoral, [-2] proPSA, que valida uma técnica de diagnóstico menos invasiva no rastreio do cancro da próstata nos homens.

O projeto tem por base um estudo clínico realizado no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélio Mendonça, sob a supervisão da Dra. Graça Andrade, Diretora de Serviço.

1.1 Cancro

O cancro é um conceito genérico usado para definir um grupo de doenças que podem afetar qualquer pessoa, independentemente do tipo de sexo, faixa etária ou grupo social, possuindo um enorme impacto sobre os indivíduos, famílias e sociedades. O cancro pode ocorrer em qualquer parte do corpo humano, sendo uma doença que resulta do crescimento descontrolado de uma única célula que sofreu mutações [1].

Os registos mais antigos sobre esta doença remontam ao Antigo Egipto (3000 A.C.) e crê-se que Hipócrates foi pioneiro na utilização do termo “karkinos”, que em grego significa caranguejo, em que o tumor apresenta uma estrutura central e os vasos sanguíneos em seu redor assemelham-se às garras de um caranguejo [2,3]. A partir de meados do século XIX, o cancro começou a ser estudado, revelando uma enorme heterogeneidade que ainda hoje torna difícil a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes ao seu desenvolvimento.

1.1.1 Biologia molecular do cancro

O cancro resulta de uma proliferação anormal de células no tecido ou órgão, as quais adquirem características morfológicas e funcionais atípicas. Estas células crescem e dividem-se de forma descontrolada, sem controlo dos mecanismos que regulam normalmente o processo de divisão celular, dando origem a células tumorais [4]. Neste tipo de células é característico a presença de núcleos muito maiores do que nas células

normais, a distribuição irregular dos cromossomas e a presença de nucléolos muito salientes [4,5]. Os tumores podem ser divididos em dois grupos: tumores benignos e tumores malignos (Figura 1).

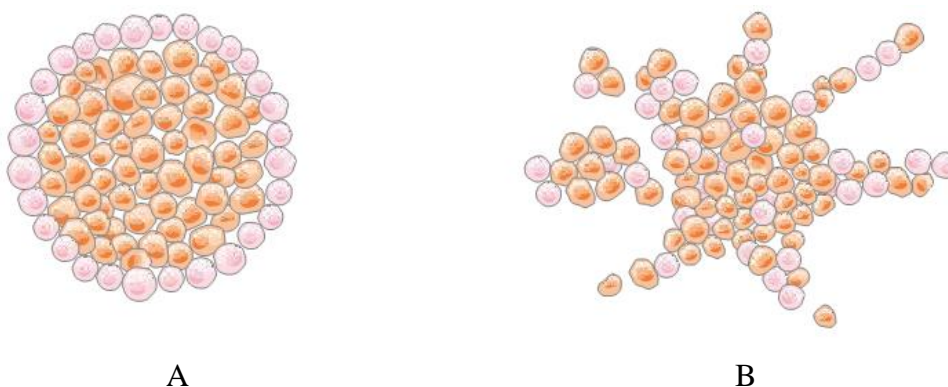


Figura 1.
Aspeto das diferenças morfológicas entre tumores benignos (A) e tumores malignos (B) [2].

Os tumores benignos raramente colocam em risco a vida do indivíduo, pois têm um tamanho reduzido, crescimento lento e são menos intensos não havendo disseminação celular para os tecidos em redor ou para outras partes do organismo, o que torna possível a sua remoção cirúrgica. Por outro lado, os tumores malignos são mais graves, pois as células que os constituem apresentam taxas de divisão celular e crescimentos superiores ao tumor benigno e possuem capacidade metastática, invadindo e danificando os tecidos e órgãos envolventes, podendo ainda entrar no sistema circulatório e originar tumores noutros órgãos, através de um processo denominado de metastização [6].

O aparecimento de um tumor maligno é geralmente um processo lento, podendo levar vários anos até que a célula cancerosa prolifere e dê origem a um tumor visível.

O processo pelo qual as células normais originam células cancerígenas denomina-se de carcinogénese e envolve três etapas: iniciação, promoção e progressão (Figura 2) [2,7].

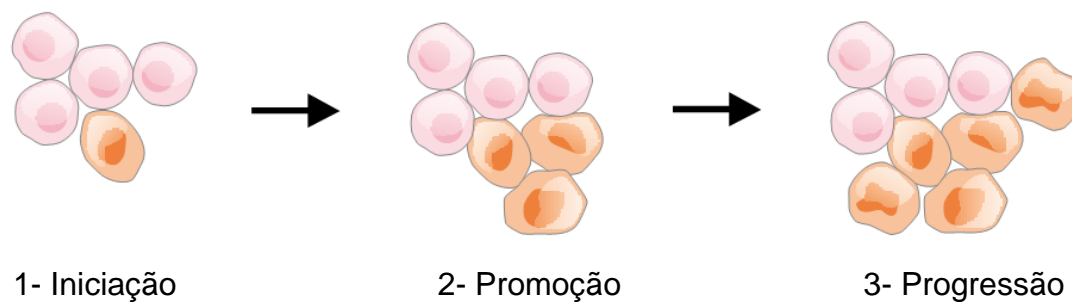


Figura 2.

Aspeto do processo de carcinogénese [2,7].

A primeira fase da carcinogénese denomina-se fase de iniciação. Durante esta fase, um carcinogéneo liga-se ao núcleo celular, provocando alterações genéticas que danificam e dão origem a uma mutação não letal. Nesta fase poderá ocorrer a reparação do material genético, podendo assim ser revertida, pois é necessário um longo período de contacto com o agente promotor para dar origem à célula cancerígena. Caso o sistema de reparação falhe (com eliminação de células anormais), a promoção desencadeia a proliferação da célula danificada, dando origem a uma massa celular (tumor), dependente do fornecimento do oxigénio e nutrientes pelo organismo. Relativamente, à fase da progressão é irreversível, pois envolve um conjunto de mutações em genes específicos, como os proto-oncogenes e genes supressores de tumor [8].

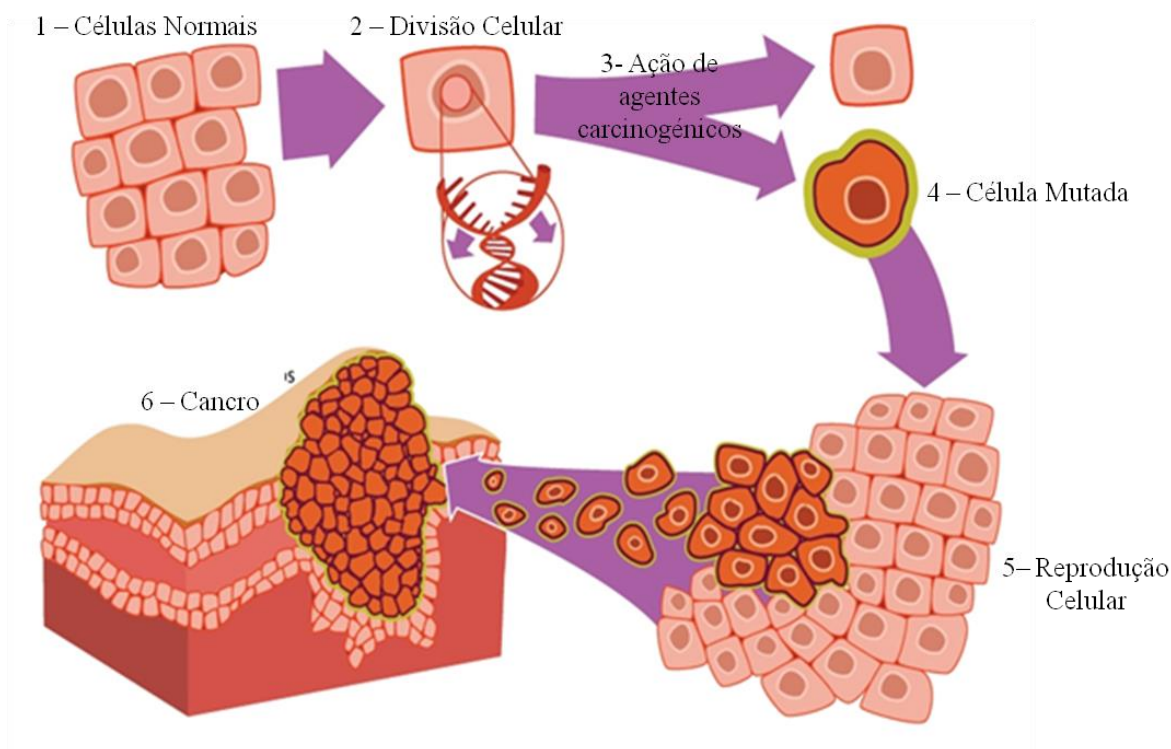


Figura 3.

Aspetto da mutação e desenvolvimento do cancro [8].

Em resultado desse processo, as células adquirem características que lhes confere vantagens a nível da adaptação, potencial replicativo ilimitado, capacidade de desenvolver vasos sanguíneos (angiogénese), insensibilidade aos sinais inibidores do crescimento, invasão de tecidos, metástases e fuga à morte celular programada [8].

Na sua maioria, a causa mais frequente do aparecimento do cancro deve-se às anomalias a nível do material genético de células transformadas. Estas anomalias são o resultado dos efeitos de carcinogénicos, como a radiação, tabaco, substâncias químicas, vírus e bactérias e envelhecimento celular. As anomalias genéticas podem ser adquiridas em resultado de erros na replicação do DNA, bem como por herança genética. Nem todas as pessoas desenvolvem cancro mesmo que estejam expostos a um carcinogénico (Figura 3) [2,9].

O aumento anormal do tecido, causado por um processo inflamatório, quisto, neoplasia benigna ou maligna é designado por tumor [9].

O tumor é classificado de acordo com o tecido onde as células modificadas têm origem, ou seja, o conjunto de células modificadas forma-se e cria metástases em diversas partes do corpo, podendo ser de quatro grupos distintos: o lipossarcoma (assemelha-se aos adipócitos), o fibrossarcoma (tumor dos fibrócitos), o rabdomyossarcoma (tumor do

músculo-esquelético) e o leiomiossarcoma (o tumor do músculo liso) [9,10]. Numerosos tumores são conhecidos, como por exemplo o linfoma e a leucemia, com origem na medula óssea, o teratoma e o seminoma como tumores do ovário ou testículos com origem nas células germinativas, o carcinoma com origem nas células neuroendócrinas, etc. Os carcinomas são denominados mais especificamente de adenocarcinomas (tumores de células epiteliais, morfologia glandular), carcinomas epidermóides (células escamosas) ou carcinoma hepatocelular (células renais) [9,10].

O cancro é uma doença que não escolhe idade, aparece, mesmo que com pouca frequência, na infância, particularmente a leucemia, com tendência a aumentar a sua incidência.

Os principais cancros localizam-se na cavidade oral (boca), colón e reto (intestino), esófago, estomago, mama, pele, próstata, pulmão, colo do útero e medula óssea (leucemias) [2]. Os cancros mais comuns no sexo masculino são o cancro da próstata, do pulmão, do colo-retal, da bexiga e da pele, enquanto no sexo feminino são o cancro da mama, do endométrio e o linfoma não-Hodgkin [11].

1.2 Cancro da próstata

O cancro da próstata é um tumor maligno da próstata, uma glândula do sistema reprodutor masculino que se situa abaixo da bexiga e à frente do reto [1,2,4,22]. Esta doença ocorre aquando da mutação e proliferação descontrolada das células da próstata, que ao sofrerem metástases podem afetar outras partes do corpo como os ossos e os gânglios. Pode causar dor, dificuldade em urinar, disfunção erétil, entre outros sintomas [2,22,23].

O cancro da próstata é universalmente reconhecido como um dos maiores problemas de saúde pública que afeta predominantemente a população do sexo masculino com idade acima dos cinquenta anos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o cancro da próstata tornou-se numa das principais causas de morte masculina, responsável por aproximadamente oitenta e cinco mil óbitos por ano na Europa e Estados Unidos, dos quais cinquenta e cinco mil na Europa e trinta mil nos Estados Unidos. Investigadores da OMS estimam que, nas próximas duas décadas, a mortalidade devido a este tipo de cancro irá aumentar de forma contínua, sendo que a mortalidade referente ao cancro da mama crescerá 25%, enquanto a estimativa para o cancro da próstata é de 43% [19,22].

Muitos fatores como a genética e a dieta estão associados ao desenvolvimento desta patologia. A descoberta da doença ocorre aquando da realização do exame físico (toque rectal) ou por doseamento do antigénio específico da próstata (PSA) no soro sanguíneo, sendo confirmada por biópsia (exame microscópico a uma amostra de tecido removido da próstata). As intervenções cirúrgicas, a quimioterapia, a radioterapia, a terapia hormonal ou mesmo a combinação destes são formas de tratamento do cancro da próstata [1,2,24].

Ainda é pouco conhecida a história natural bem como a progressão dos tumores, em parte devido ao facto da maioria dos cancros da próstata serem multifocais, com múltiplos clones malignos independentes e heterogéneos na mesma glândula [28].

O cancro da próstata varia também quanto ao seu confinamento. O adenocarcinoma é o mais frequente, embora possam existir, raramente, outros tipos histológicos de cancro (sarcomas, carcinomas de pequenas células e carcinomas de epitélio de transição). No adenocarcinoma da próstata a histopatologia é classificada com base no grau de diferenciação celular e em anormalidades nucleares. O esquema de Mostofi [29], da OMS, apresenta três graus de diferenciação celular, consoante as células cancerígenas, nomeadamente “bem”, “moderadamente” ou “pouco diferenciadas”. Assim, os tumores de baixo grau, com células bem ou moderadamente diferenciadas, tendem a ter um desenvolvimento mais indolente. Por outro lado, os tumores pouco diferenciados tendem a evoluir rapidamente para a doença metastática. O tempo de desenvolvimento de cancro da próstata é muito importante, pois tumores com células diferenciadas apresentam taxas de progressão e de mortalidade baixas, entre quinze a vinte anos, e após o diagnóstico observa-se uma diminuição global da sobrevivência dos indivíduos livres da doença bem como o aumento da mortalidade [29].

A doença afeta particularmente os homens mais idosos. Fatores como a idade e a saúde do doente são cruciais para a seleção do tratamento, sendo, por vezes, uma escolha difícil e um dilema entre os benefícios [25]. Há situações em que por vezes, a decisão do tratamento é duvidosa, quando se contrapõem os benefícios e os possíveis danos em relação à sobrevivência e à qualidade de vida do doente.

1.2.1 Próstata

A próstata é um músculo glandular que faz parte do sistema reprodutor masculino, cuja função é produzir, armazenar e secretar o fluido prostático com características

alcalinas que constitui o principal componente do sémen (Figura 4). As secreções da próstata são compostas por menos de 1% de proteínas, enzimas proteolíticas (como a fibrinolisa que ajuda a liquefazer o sémen) e antigénio específico da próstata (PSA). Níveis elevados de PSA no sangue são indicadores de doença na próstata [26].

As principais doenças que atingem a próstata são a hiperplasia benigna da próstata (HBP), a prostatite e o cancro de próstata.

A próstata precisa de hormonas, os androgénios (responsáveis pelas características sexuais masculinas) para o seu bom funcionamento. A principal hormona masculina é a testosterona (produzida nos testículos), no entanto a dihidrotestosterona (DHT) é a hormona que regula a próstata. Este órgão encontra-se localizado na pélvis, por baixo da bexiga e à frente do reto, e devido a esta localização, as doenças da próstata geralmente afetam o controlo urinário, bem como a ejaculação (Figura 4).

A próstata pode ser subdividida em quatro “lobos”, os quais correspondem a quatro regiões glandulares distintas (designadas por Zonas de McNeal): a zona periférica (lobo posterior), a zona central (lobo médio), a zona de transição (lobo anterior) e a zona fibromuscular (lobo lateral). A zona periférica encontra-se no lobo posterior da próstata que envolve a uretra distal e é nesta que se originam as neoplasias da próstata (70% das neoplasias em homens jovens). A zona central envolve os canais ejaculadores por onde o esperma passa para a uretra (contabiliza aproximadamente 15 a 25% das neoplasias). A zona de transição encontra-se no lobo anterior e, geralmente, não se encontra associada a neoplasias. Ela é responsável por 5% do volume prostático, constituindo assim, a zona onde se desenvolve o aumento benigno ou a hiperplasia benigna da próstata (HBP). A zona fibromuscular é composta por músculo e tecido fibroso (ausência de componentes glandulares) e contabiliza, aproximadamente, 5% do peso prostático [27,28].

As regiões glandulares apresentam características biológicas diferentes, o que poderá justificar as diferentes percentagens de neoplasias ou tumores que se desenvolvem em cada região [28].

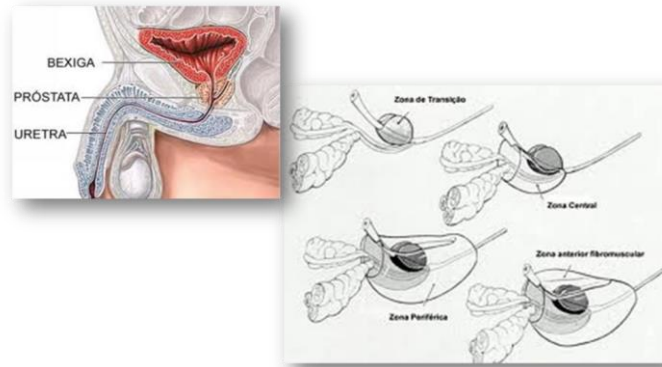


Figura 4.

Representação esquemática da localização da Próstata (à esquerda) e diferentes zonas que a constituem (à direita), adaptado de Greene et al. [28].

1.2.2 Prevalência e incidência do cancro da próstata

Todos os anos mundialmente são detetados cerca de doze milhões de novos casos de cancro. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o número de óbitos devido a esta doença irá duplicar nos próximos vinte anos, prevendo-se um registo aproximado a 13,2 milhões de vítimas mortais em 2030, face os 7,6 milhões registados em 2008, dados que fazem do cancro a segunda causa de morte, a seguir às doenças coronárias [12,13].

Os cinco cancros mais frequentes em Portugal são o cancro do colo-retal, da mama, da próstata, dos pulmões e do estômago. Segundo o Instituto Nacional de Estatística (INE), em 2010, a neoplasia que provocou mais óbitos foi a da laringe, brônquios e pulmão, com quatro mil e quarenta e seis óbitos, seguindo-se o cancro do cólon (2.650 óbitos), do estômago (2.323 óbitos), do tecido linfático (2.009 óbitos) e da próstata (1.786 óbitos) [12]. Em Portugal estima-se que mais de trinta mil pessoas venham a falecer em 2030 devido ao aumento exponencial de novos casos de cancro [12]. O aumento do número de cancros na faixa etária abaixo dos sessenta e cinco anos prevê-se que seja de 12,7% e de 40% nas idades superiores a sessenta e cinco anos, sendo que este aumento parece estar associado à alteração do estilo de vida, ao consumo de tabaco, ao aumento da obesidade, entre outros fatores. Estima-se que uma em cada nove pessoas irá sofrer de cancro da próstata em Portugal [12].

Atualmente, o cancro da próstata representa cerca de 3,5% dos óbitos e mais de 10% dos óbitos por cancro, representando um dos valores mais elevados da Europa [14,15].

Na Madeira, de acordo com os dados publicados pela Secretaria dos Assuntos Sociais em 2007, 8% dos óbitos registados no sexo masculino registados foram devidos a esta neoplasia maligna [16].

A taxa de incidência do cancro da próstata regista uma elevada variação a nível mundial (Figura 5 a)).

As regiões e países mais desenvolvidos como América do Norte, Argentina, Europa Ocidental, África do Sul e Austrália apresentam taxas de incidência, mais elevadas comparativamente ao Continente Asiático [17].

A etnia é um fator com alguma relevância no desenvolvimento desta neoplasia, pois observa-se que esta patologia é recorrente na população afro-americana, sendo 60 a 70% superior à incidência na população caucasiana, contudo, é quatro vezes superior aos indivíduos de raça negra (África), o que aponta para a existência de outros fatores, para além dos de origem genética, no aparecimento desta doença, sobretudo fatores ambientais e de estilo de vida [17-20].

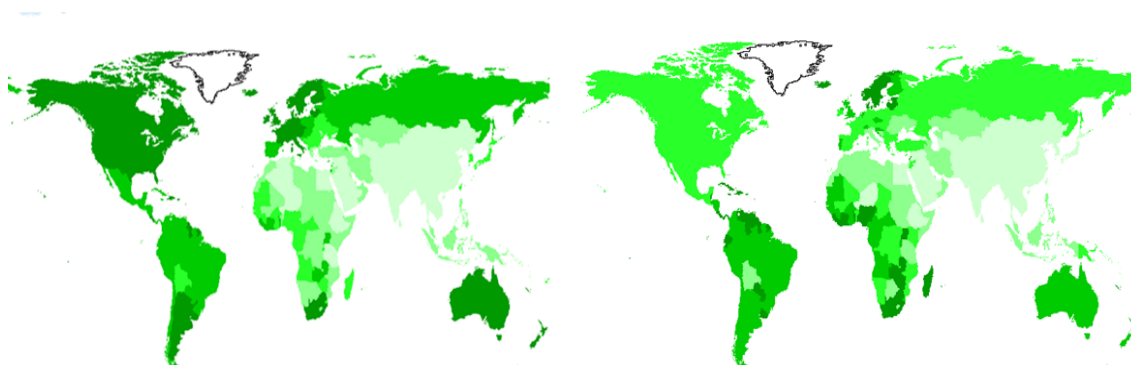


Figura 5 a) - Taxa de incidência por CA.

Figura 5 b) - Taxa de mortalidade por CA.

Figura 5.

Taxa de incidência anual por cancro da próstata (Figura 5 a)) e taxa de mortalidade anual por cancro da próstata (Figura 5 b)) /100.000 indivíduos (Glocoban 2008, IARC [21]).

Quanto à taxa de mortalidade por cancro da próstata, também se verifica uma grande variabilidade a nível global, constatando-se um aumento em alguns países asiáticos como o Japão e Paquistão (Figura 5b)).

As regiões mais desenvolvidas como Estados Unidos, Alemanha e Reino Unido apresentam uma diminuição na taxa de mortalidade, possivelmente devido à evolução dos métodos de diagnóstico (deteção precoce da doença).

O desenvolvimento de planos de deteção precoce bem como a abordagem terapêutica são dois pontos fulcrais que se refletem de forma significativa nas taxas de incidência e de mortalidade.

Estes dados permitem constatar que a cada cinco anos ocorre um aumento de 10% no aparecimento de novos casos de cancro e que a taxa de mortalidade tem vindo a estabilizar ou mesmo a diminuir em alguns casos [22].

1.2.3 Fatores de risco

Apesar dos estudos desenvolvidos, pouco se sabe sobre a etiologia deste cancro, existindo diversos fatores de risco associados [2].

À medida que a esperança média de vida aumenta observa-se um aumento da incidência e da mortalidade do cancro da próstata, sendo a idade o principal fator de risco para o seu desenvolvimento. A partir dos cinquenta anos, quer a incidência quer a mortalidade, devido ao cancro da próstata, aumentam exponencialmente [21,30] (Figura 6). Autópsias revelaram que homens com idade superior a cinquenta anos apresentam uma prevalência da doença de 30%, sendo que esta aumenta para 70% em homens com idades superiores a oitenta anos [30,31].

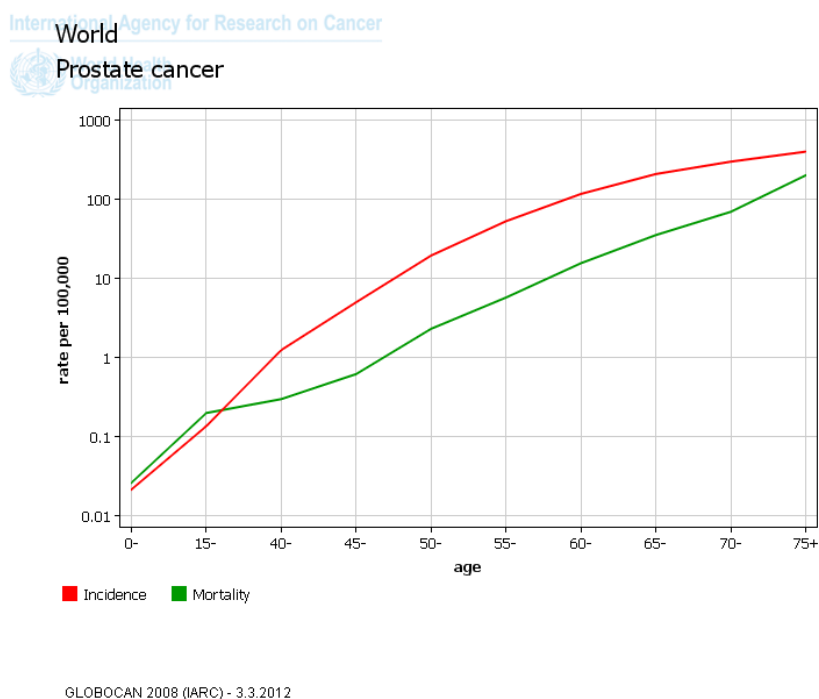


Figura 6.

Evolução da incidência / mortalidade por cancro na próstata, com a idade, numa extrapolação para 100.000 indivíduos (Glocoban 2008, IARC [21]).

Para além da idade, outro fator de risco importante é a história familiar do doente [20]. Este fator contribui em cerca de 9% dos casos para que o cancro da próstata que esteja associado a manifestações precoces da doença, quando na história familiar existam três ou mais indivíduos que foram afetados [32,33]. Assim, um indivíduo que pertence a uma família em que um parente de primeiro grau possua a doença, o risco de poder vir a contraí-la é duas vezes superior a um indivíduo sem antecedentes familiares [34,35] (Tabela 1).

Tabela 1.

Avaliação do fator familiar (história familiar) no risco e propensão para contrair o cancro da próstata [34].

História familiar	Risco relativo	Risco absoluto (%)
Sem antecedentes	1	8
Familiares de 1º grau (Pai ou irmão)	2	15
Familiares de 1º grau, com idade inferior a 60 anos	3	20
Cancro da próstata hereditário	5	35-45

Outros fatores de risco associados à doença são, por exemplo: o ambiente (contaminação atmosférica, a poluição, a exposição a substâncias químicas e fertilizantes), o estilo de vida (tipo de alimentação, a falta de exercício físico), os fatores hormonais e alterações na próstata [36-38].

Provavelmente, o risco de cancro da próstata estará associado ao consumo de gorduras saturadas, que é maior entre os Afro-Americanos, onde esta neoplasia é mais frequente do que em países onde a alimentação é mais pobre em gordura. Contudo, esta associação entre o tipo de alimentação praticada e risco da doença não está devidamente esclarecida [39-42].

1.2.4 Bioquímica do cancro da próstata

O gene antigen prostatic-specific (APS) é o gene que codifica o PSA, localiza-se no cromossoma 19 e tem cerca de 6kb [43]. A síntese de PSA é regulada pelos androgénios. A região do promotor do gene APS contém elementos de resposta a androgénios, os AREs, que regulam a sua atividade. Três ARE's estão identificados: o ARE I, ARE II e o ARE III. O ARE I e o ARE II, os quais estão localizados na região

proximal do promotor do gene APS, encontrando-se, a -170 e a -394 bp do local de iniciação da transcrição. O gene ARE III encontra-se na região 5' do *enhancer*, a -4200 bp do local de início da transcrição [44].

O gene AR localiza-se no cromossoma X e possui mais de 90kb [45], tendo por função ativar a expressão dos genes dependentes de androgénios, como o gene APS, e transportar as hormonas androgénicas. Os androgénios são fortes promotores cancerígenos. Alguns estudos comprovam que a administração de testosterona induz ao aparecimento de cancro da próstata em ratos e, os dados revelam que este carcinoma ocorre raramente em homens com vasectomia [45].

1.2.4.1 Fosfatase ácida prostática (FAP)

Durante muito tempo a fosfatase ácida prostática (FAP) foi o único marcador tumoral utilizado pelos urologistas na deteção e monitorização de doentes com cancro da próstata [46]. Contudo, os níveis de FAP séricos também aparecem elevados em sarcomas, mieloma múltiplo, metástases ósseas, entre outros cancros. Igualmente poderá ser elevada em algumas condições benignas como a HBP, a osteoporose e o hipertiroidismo. O uso clínico de FAP foi então substituído pelo antigénio específico da próstata (PSA) uma vez que a FAP não é um teste tão sensível quanto o PSA no rastreio e deteção do cancro, numa fase inicial. O uso clínico de FAP encontra-se restringido à confirmação do cancro da próstata metastático e do desenvolvimento do cancro da próstata [47].

1.2.4.2 Antigénio específico da próstata (PSA)

O antigénio específico da próstata (PSA), em uso clínico desde 1986, é atualmente um marcador tumoral imprescindível em oncologia urológica. Alguns autores consideram-no como o marcador tumoral mais amplamente utilizado na prática clínica, sendo produzido tanto pelo epitélio prostático maligno como pelo epitélio prostático benigno [48,49]. O PSA desempenha um papel importante na deteção precoce do cancro da próstata, embora ainda exista alguma controvérsia quanto à sua utilização, em virtude das suas limitações e na sensibilidade e especificidade que apresenta, mesmo que auxilie na redução da morbidade e mortalidade [50].

O PSA foi purificado, pela primeira vez, em 1979, a partir do tecido prostático humano e representa uma glicoproteína, com massa molecular entre os 30 e 33 kDa. O

PSA é normalmente secretado no sémen ou excretado na urina, estando presente no sangue em teores muito reduzidos [51].

Do ponto de vista funcional, o PSA é uma enzima, a proteinase serina, com atividade semelhante à quimiotripsina, fazendo parte da família das Calicreínas, pelo que pode ser também designado por Calicreína Humana 3. Esta enzima tem por função liquefazer o coágulo seminal após a ejaculação, através da proteólise das proteínas seminogelina e fibronectina [52].

O PSA atinge a circulação por difusão, através do estroma prostático e pode ser encontrado em concentrações que variam entre os 0,2 e 5,0 ng/mL [53,54]. Estas concentrações são aproximadamente, um milhão de vezes superiores às que normalmente, são encontradas no soro sanguíneo, onde variam entre 0,1 a 4,0 ng/mL [55,56]. Os níveis de PSA aumentam no soro dos indivíduos com patologia prostática, pelo que o seu doseamento está a ser utilizado como marcador tumoral, ajudando na deteção do cancro da próstata numa fase inicial, bem como na avaliação da progressão da doença e da resposta terapêutica [57-59].

1.2.4.2.1 Doseamento do PSA

Uma quantidade de PSA igual ou superior a 4,0 ng/mL é utilizada como valor de referência médica para a realização de uma biópsia à próstata, sendo que apenas em 25% dos homens com estes níveis de PSA e toque retal normal é diagnosticado cancro da próstata após biópsia. Por outro lado, cerca de 20% dos casos de cancro da próstata são detetados em indivíduos com níveis de PSA inferior a 4,0 ng/mL [74]. De qualquer forma, não estão definidos valores de referência de PSA na circulação sanguínea que garantam a deteção específica de formas clinicamente significativas do cancro da próstata [66].

No sentido de aumentar a especificidade do PSA no diagnóstico do cancro, têm sido levados a cabo estudos que permitem o ajuste dos valores de PSA à idade, baseando-se no facto destes níveis aumentarem progressivamente com a idade. A concentração de PSA está associada com vários fatores, entre eles o tamanho da próstata que aumenta com a idade, provocando o aumento da produção de PSA plasmático [51,66].

A utilização do PSA no rastreio de cancro da próstata tem permitido diminuir a idade média de diagnóstico desta patologia, dos 72,0 para 69,2 anos nos caucasianos e dos 70,1 para 67,3 anos nos afro-americanos [55,56].

Estudos realizados, quer em indivíduos saudáveis quer com patologia prostática, indicam que os níveis séricos de PSA não se submetem aos ciclos circadianos (com a

duração aproximada de um dia ou vinte e quatro horas, em que se baseia o ritmo biológico do corpo humano). Não obstante, observam-se certas oscilações de difícil explicação. Stamey et al. [75] observou um decréscimo do PSA nas primeiras vinte e quatro horas de internamento, o que poderá estar relacionado com a posição supina (posição plana de barriga para cima). Estes dados levam a sugerir o doseamento do PSA aquando do internamento. Entre os fatores pré-analíticos devem ser incluídas as manipulações que podem alterar a glândula prostática, entre as quais o toque rectal, a massagem prostática, realização de biópsias, etc. (Tabela 2).

Tabela 2.

Influência das diversas manipulações da próstata nos níveis de PSA sérico [75].

	PSA Elevado	Observações
Toque Retal	Escasso	...
Massagem Prostática	Significativo	Aguardar 3 dias para realizar o doseamento do PSA
Biópsia	Importante	Aguardar 6 semanas para realizar o doseamento do PSA
Exercício Físico
Citoscopia	Escasso	...
Ejaculação	Inconclusivo	...

A estabilidade do PSA no soro é elevada, visto que se observam poucas variações de concentração, quando deixada num tubo à temperatura ambiente, durante 24 horas, sendo igualmente estável quando a amostra é submetida a congelamento e descongelamento.

1.2.4.2.2 PSA livre (fPSA)

O PSA existe em duas formas distintas [60-62], a forma não complexada – livre (fPSA) e a forma complexada (cPSA). O PSA circula maioritariamente ligado a proteínas inibidoras das proteases (alfa 1-antiquimotripsina e alfa 2-macroglobulina) [63,64].

Estudos demonstram que a fração de fPSA é distinta no cancro da próstata e na HBP, sugerindo que a sua deteção específica tem interesse diagnóstico.

Em condições normais, o PSA é produzido pelas células epiteliais da próstata e libertado para o líquido seminal, onde atinge uma elevada concentração. Apenas uma

pequena quantidade de PSA entra na circulação sanguínea, devido à barreira que envolve as células epiteliais e a membrana basal. O PSA permanece, assim, em contacto com uma série de enzimas no líquido seminal que atuam inativando parcialmente a sua atividade proteolítica. No cancro ocorre uma série de erupções na barreira que impede a circulação sanguínea do PSA. Por este motivo, a ação das enzimas proteolíticas é menor, resultando numa menor inativação de PSA. A percentagem de PSA que pode circular na forma livre em pacientes com cancro, é conseqüentemente menor que em controlos saudáveis e em pacientes com HBP. O primeiro fator a considerar é a estabilidade do fPSA que é muito inferior à do PSA total [65]. A percentagem de PSA livre é calculada através da fórmula $[(\text{Concentração de PSA livre} / \text{Concentração de PSA total}) \times 100\%]$ [66]. O cálculo das percentagens de fPSA no soro melhora de forma significativa a distinção dos pacientes com cancro dos portadores de hiperplasia benigna, em especial nos indivíduos com PSA na faixa $\geq 4,0$ e $\leq 10,0$ ng/mL. Concentrações elevadas de fPSA no soro refletem um menor risco de cancro da próstata, pelo que a utilização do rácio (%fPSA) permite melhorar a interpretação dos resultados [63-66].

Tabela 3.

Percentagens de fPSA em homens com valores de PSA total [2,0 – 4,0] ng/ml [43].

%fPSA	Sensibilidade	Falsos Positivos
<10%	47%	10%
<15%	71%	34%
<20%	94%	66%

A Tabela 3 mostra os resultados obtidos para diferentes percentagens de fPSA, observando-se um maior valor preditivo positivo para cut off de 10% que corresponde a 47% de sensibilidade e a 90% de especificidade. A seleção de um cut off maior implica aumentar a sensibilidade e diminuir a especificidade. Cut off de 20% permite diagnosticar 94% dos cancros (especificidade de 34%). A sobreposição de resultados de %fPSA entre homens com HBP e cancro poderá ser explicada pela coexistência da mesma glândula prostática na área da neoplasia e do adenoma [69]. Homens com cancro e HBP significativos, poderá se encontrar uma %fPSA no soro semelhante a valores de homens sem cancro. Este facto é explicável pela elevada sensibilidade de % fPSA observada nos homens com cancro que possuem uma próstata de volume reduzido [43,69]. A %fPSA

pode ser mais útil para diagnosticar o CP em homens mais jovens que possuem próstata com tamanho normal. A seleção de um valor cut off mais adequado para a realização de biópsia é ainda um tema controverso. Acredita-se que o número de biópsias negativas com diagnóstico precoce são fatores fundamentais a considerar, se bem que difíceis de satisfazer o conjunto. A eleição de cut off de 20% para valores de PSA total na zona [4,0–10,0] ng/ml é apoiada por vários autores, com a finalidade de se diagnosticar um maior número de casos de cancro [43].

O PSA livre é formado por diferentes frações, entre elas o proPSA e BPSA que apresentam uma maior associação às patologias da próstata, comparado com o PSA, PSA livre e PSA na forma complexada [63,64].

O proPSA encontra-se mais elevado nas zonas periféricas do tecido canceroso que nos tecidos com hiperplasia benigna da próstata [67]. Este apresenta-se na forma nativa de proPSA contendo um propéptido líder com sete aminoácidos (aa) ([-7] proPSA) ou na forma de propéptidos líderes fragmentados [68]. Os fragmentos de proPSA consistem, principalmente, em proPSA com um propéptido líder de cinco aa ([-5] proPSA), de quatro aa ([-4] proPSA) ou de dois aa ([-2] proPSA) [69,70].

1.2.4.2.3 [-2] proPSA

O [-2] proPSA tem sido alvo de atenção, dado que é a forma principal de PSA detetada em extratos tumorais e por mostrar uma maior imunocoloração no tumor da próstata que nos tecidos benignos [69,71]. Para além disso, o [-2] proPSA é a forma mais estável *in vitro* das cinco formas de proPSA identificadas [72]. Estudos realizados por Benson et al. [73] em homens com cancro da próstata confirmado através de biópsia, com PSA na faixa de $\geq 2,0$ a $\leq 10,0$ ng/mL, demonstram que o [-2] proPSA aumenta a especificidade de deteção do cancro em relação à %fPSA [73]. A utilidade da determinação do [-2] proPSA em homens com níveis de PSA inferiores a 4,0 ng/mL é de particular interesse dado que muitos cancros são diagnosticados em indivíduos com valores de PSA detetados neste intervalo [72].

1.2.5 Diagnóstico do cancro da próstata

1.2.5.1 Rastreio

O prognóstico do cancro da próstata depende da fase em que a doença é diagnosticada, pelo que o rastreio deste tipo de cancro permite que o seu diagnóstico seja realizado precocemente, o que poderá conduzir a uma melhoria da esperança de vida dos indivíduos. As fases avançadas do carcinoma da próstata não têm tratamento, pelo que a diminuição da mortalidade ou da morbilidade causadas por esta patologia só pode ser alcançada através da deteção precoce e tratamento radical do cancro [66]. Indivíduos com tumores confinados à glândula e que são tratados ao realizar uma prostatectomia radical têm uma esperança de vida equiparável aos indivíduos saudáveis com igual idade.

Cerca de 40% dos homens na faixa etária compreendida entre os sessenta e setenta anos possuem focos microscópicos de carcinomas bem diferenciados. Tumores bem diferenciados de tamanho inferior a 0,2-0,5 mm são considerados inofensivos [76]. O rastreio é feito de modo a detetar carcinomas que possam vir a constituir um perigo para o indivíduo e não detetar propriamente um tumor da próstata. O intervalo de tempo de diagnóstico de tumores com grande probabilidade de cura é pequeno, daí a importância de estes serem diagnosticados com antecedência [66].

Alguns estudos, como o de Catalona et al. [67], concluem que os valores do PSA, juntamente com o toque rectal e a ecografia, são ferramentas úteis no diagnóstico do cancro da próstata, sendo dos três testes o que oferece resultados mais fiáveis.

O marcador PSA apresenta elevada sensibilidade no rastreio ao cancro da próstata, contudo, apresenta baixa especificidade. De modo a melhorar a sua especificidade, bem como a diminuir o número de biópsias desnecessárias, foram propostos valores de referência (cut-offs) alternativos na faixa de 4,0 a 10,0 ng/mL [77], de densidade da PSA (razão entre o valor absoluto de PSA e volume da próstata) [78,82], de velocidade de PSA (alterações da concentração de PSA ao longo do tempo) [79,80], etários da PSA (aumento dos valores de PSA com a idade) [81], etc. (Tabela 4).

Tabela 4.

Valores de PSA ajustados à faixa etária [81].

Idade (anos)	PSA Sérico (ng/ml)
< 50	2,5
50-59	3,5
60-69	4,5
> 70	6,5

Apesar da utilidade comprovada do PSA na deteção precoce e monitorização do carcinoma da próstata, o seu uso generalizado em programas de rastreio continua alvo de debate e investigação [66]. Uma das questões é o receio da deteção de falsos positivos e tratamento desnecessário dos indivíduos, com os efeitos adversos ou complicações associadas [76], ou mesmo falsos negativos, devido à existência de componentes pouco diferenciados no tumor, o que resulta na produção de pouca quantidade de PSA, podendo levar a que os tumores não sejam detetados com a antecedência necessária [66].

Outros estudos defendem que o tempo de duplicação dos valores de PSA poderá estar relacionado com a progressão da doença após tratamento cirúrgico [83].

Vaughan et al. [51] num estudo detetaram uma diminuição de doentes com carcinomas avançados de 6,5 para 2%. Por outro lado, a percentagem de carcinomas avançados em doentes submetidos a cirurgia diminuiu de 11 para 6% [66].

1.2.5.2 Diagnóstico do cancro da próstata

Um diagnóstico suficientemente precoce do cancro da próstata é o principal objetivo do doseamento do PSA pelos serviços clínicos. A sensibilidade do teste de PSA está associada à extensão da doença, diminuindo à medida que avança a sua fase de desenvolvimento. A combinação de vários exames (níveis séricos PSA, toque rectal, ecografia e biópsia da próstata) permite um bom diagnóstico da doença [80,85] (Figura 7).

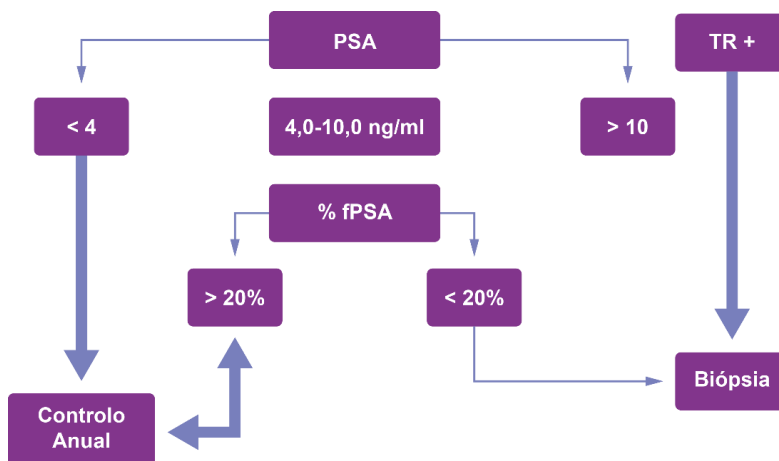


Figura 7.

Esquema de diagnóstico do cancro da Próstata [43].

PSA-Antigénio Específico da Próstata; TR- Toque rectal; %fPSA-Rácio (fPSA/PSA total).

Níveis de PSA superiores a 4,0 ng/ml são indicativos da possibilidade de cancro da próstata. Muitos clínicos utilizam o esquema da Figura 7 para estabelecer uma primeira abordagem diagnóstica com base na determinação do PSA e %fPSA para além do toque retal. Assim, a biópsia é realizada quando o toque retal é positivo, quando o PSA é superior a 10,0 ng/ml ou quando para valores de PSA total de 4,0 a 10,0 ng/ml com %fPSA menor a 20. Homens com prostatite aguda constituem a exceção, pois estes indivíduos apresentam valores elevados de PSA e valores baixos de %fPSA. A %fPSA até ao momento é determinada para decidir a necessidade ou não de avançar para a realização de biópsia quando o PSA está compreendido entre 4,0 e 10,0 ng/ml. Igualmente, alguns autores preconizam a sua utilização para decidir a realização de biópsia quando o PSA é superior a 10,0 ng/ml, bem como, doentes com HBP ou doentes com grande volume prostático com PSA superior a 10,0 ng/ml. Por outro lado, não se pode descartar que no futuro existam resultados concluintes que aconselham a determinação de % fPSA quando o PSA é inferior a 4,0 ng/ml [43].

Outras doenças como a prostatite, HBP, infeções do trato urinário podem levar ao aumento do PSA no soro. Fatores como a idade, tamanho da próstata, tempo de aumento do PSA, relação entre o PSA total e o PSA livre, devem ser avaliados pelo urologista. O toque retal é um exame realizado normalmente pelo médico urologista que através da palpação da próstata pode detetar massas suspeitas de cancro. A ecografia prostática é outro exame fundamental para avaliar o tamanho, forma e características internas do órgão, sendo fundamental na determinação do esvaziamento completo ou não da bexiga. A biópsia prostática é um exame invasivo no diagnóstico final do cancro da próstata, porque são recolhidas amostras do órgão para análise microscópica. Durante a fase de diagnóstico da doença, ainda poderá ser necessário realizar outras avaliações com recurso à ressonância magnética, TAC, Urofluxometria e Cintigrafia [80,85].

As características do tumor como o tamanho (volume), o tipo histológico (classificação de Gleason) e a metastização são determinantes no estabelecimento da agressividade da doença. O volume tumoral é um fator de sobrevivência, no entanto é de difícil avaliação antes da cirurgia. O valor de PSA no soro correlaciona-se com o volume do tumor, ou seja, quanto maior o valor de PSA maior é a probabilidade de doença metastática [85].

A concentração de PSA em conjunto com a fase da doença e a classificação de Gleason permitem decidir a fase patológica do tumor [86,87]. A classificação de Gleason,

Tabela 5, há muito desenvolvida, continua a ser, desde 1993 por recomendação da OMS, o indicador de prognóstico mais utilizado a nível clínico e de investigação em todo o mundo [88]. A classificação de Gleason avalia o estado de diferenciação glandular, bem como o crescimento do tumor em relação ao estroma prostático. Inicialmente, os dois tipos celulares mais comuns são classificados de um a cinco, onde em um verifica-se que as células são muito diferenciadas e mais semelhantes às células saudáveis (forma menos agressiva) e em cinco visualiza-se células pouco diferenciadas (forma mais agressiva). Esta caracterização é feita através de observação microscópica. A classificação final de Gleason resulta da soma dos dois graus, que varia de dois a dez, determinando assim o prognóstico do utente. Quanto mais baixo for o resultado da soma, melhor será o prognóstico. [89,90]

Tabela 5.

Classificação de Gleason utilizada para determinar o estado e grau de diferenciação do tumor da próstata [89,90].

Classificação de Gleason	Grau de Diferenciação
1	Muito Raro
2, 3 e 4	Presença de Tumor bem diferenciado
5 e 6	Presença de Tumor moderadamente diferenciado
7	Presença de Tumor mais agressivo
8, 9 e 10	Presença de Tumor pouco diferenciado

Totais de dois a quatro significam que o tumor é bem diferenciado e de crescimento lento. Contudo nestes tumores existem cerca de 25% de probabilidades de propagação, causando lesões noutros órgãos. Valores entre cinco e sete podem significar a presença de um tumor moderadamente diferenciado ou mais agressivo, dependendo do tempo da sua origem. Neste tipo de tumores, as probabilidades de propagação causando lesões noutros órgãos são de 50%. Valores entre oito e dez correspondem à presença de um tumor pouco diferenciado. Quanto a este tipo de tumores existem cerca de 75% de probabilidade de se propagação, causando lesões noutros órgãos. Assim, de acordo com a Tabela 5, conclui-se que quanto maior é a classificação de Gleason num tumor, maior é a probabilidade deste apresentar um comportamento agressivo.

A determinação da fase juntamente com o diagnóstico é importante na classificação da doença oncológica [90].

A prostatite aguda e a HBP são responsáveis pelos falsos positivos detetados pelo PSA. Estes falsos positivos têm maior incidência entre os indivíduos com HBP do que em indivíduos com prostatite aguda, visto que, neste último caso, os valores de PSA descem até à normalização ao fim de seis a oito semanas, o que explica a utilização por muitos clínicos do valor de cut-off de 10,0 ng/mL no diagnóstico.

O aumento do volume prostático está diretamente relacionado com o aumento deste antigénio específico da próstata, bem como com outros mecanismos, incluindo a libertação do antigénio pelas células destruídas, a baixa vascularização associada à inflamação e a rutura da barreira fisiológica que geralmente dificulta a circulação sanguínea da PSA. Valores de PSA superiores a 4,0 ng/mL podem estar associados a prostatite, a hiperplasia benigna da próstata, etc. [91-93]

Tradicionalmente, o toque retal é usado no diagnóstico do cancro da próstata, sendo que em 8% dos indivíduos o cancro é diagnosticado por toque retal positivo, apesar do valor do PSA ser inferior a 4,0 ng/mL. A biópsia permite detetar a presença de cancro da próstata em 40 a 50% dos pacientes com toque retal positivo [93]. Por outro lado, existem estudos que defendem que a eficácia do PSA no diagnóstico do cancro é superior ao toque retal.

Assim, o diagnóstico precoce do cancro da próstata deverá requerer a utilização de valores de cut-off de PSA suficientemente baixos para detetar o maior número possível de tumores ou para detetar potenciais portadores de tumores. A definição dos valores de cut-off de PSA origina um dilema sem resolução que envolve o compromisso entre um grau de sensibilidade suficiente e a especificidade elevada do método. A “zona cinzenta” para estes valores situa-se entre os 4,0 e 10,0 ng/mL, dando origem a inúmeros falsos positivos.

Carter et al. [49] realçou a importância da monitorização temporal da concentração do PSA no soro, dado que o aumento crescente de PSA permite distinguir a HBP do cancro da próstata, com maior eficácia que o doseamento pontual de PSA. Diversos estudos descrevem a importância da velocidade de aumento do PSA [94]. Um dos estudos de Xavier et al. [94] compreende uma avaliação retrospectiva de cinquenta e quatro homens com seguimento clínico mínimo de sete anos, antes do aparecimento de HBP ou cancro da próstata, em que um aumento anual superior a 0,75 ng/mL é indicativo de

neoplasia. Com percentagens de sensibilidade elevadas (75%), 10% das análises são dadas como falsos positivos com HBP [94].

A existência de uma correlação positiva entre o volume da próstata e a concentração de PSA no soro é frequentemente a causa de falsos positivos deste marcador tumoral em pacientes com elevado volume glandular. A introdução do quociente que relaciona a concentração de PSA com o volume da próstata pretende diminuir o número de falsos positivos detetados pelo rastreio com base apenas no PSA. Segundo Veneziano et al. [95], deteta-se um rácio maior entre o PSA e o volume prostático em pacientes com cancro da próstata do que em pacientes com HBP ou mesmo nos indivíduos saudáveis.

Por sua vez, Benson et al [73,96] introduziu o conceito de densidade de PSA no diagnóstico de cancro da próstata, que quando aplicado define o grupo de indivíduos a ser excluídos do tratamento cirúrgico radical [64]. Inicialmente foi usado 0,1 ng/mL como valor de cut-off com a finalidade de distinguir a HBP do cancro da próstata, tendo sido obtidos valores de 80% para a sensibilidade e 95% para a especificidade. Posteriormente, alguns investigadores usaram a densidade de PSA com valores de cut-off de 0,15 ng/mL, com a finalidade de distinguir os dois grupos de indivíduos que se encontravam na zona cinzenta (zona compreendida entre os 4,0 e 10,0 ng/mL). Nem sempre a interpretação da densidade de PSA é linear. Alguns fatores dificultam a interpretação dos resultados, nomeadamente a própria variabilidade da medição do volume prostático durante a ecografia transretal, bem como a existência de falsos positivos devido a complicações associadas a HBP.

1.2.6 Tratamento do cancro da próstata

O tipo de tratamento a adotar difere consoante a fase em que o tumor se encontra, inicial ou avançada. Quando o tumor encontra-se na sua fase inicial são adotados tratamentos como a cirurgia e a radioterapia interna ou externa. A cirurgia é realizada no local afetado com remoção completa da próstata e das vesículas seminais. Esta técnica é utilizada quando o tumor encontra-se limitado à próstata, sendo removido com fins curativos. Esta intervenção poderá causar disfunção erétil (impotência), incontinência urinária, assim como complicações habituais pós-operatórias, como por exemplo infeções e hemorragias.

A radioterapia consiste na aplicação de radiação de elevada energia no local afetado, com o objetivo de matar as células cancerígenas funcionando como uma terapia

localizada. Este tratamento pode ser realizado antes ou depois da cirurgia, com a finalidade de eliminar células cancerígenas, que se encontrem em redor do tumor. A radioterapia pode ser de dois tipos: interna ou externa. Na radioterapia externa, a radiação é emitida por um dispositivo em ambiente hospitalar, sendo o paciente submetido a este tratamento durante cerca de cinco dias por semana, ao longo de várias semanas. Na radioterapia interna, a radiação atinge o tumor ou as células em seu redor, emanado por um material contido em agulhas ou tubos de plástico, que são colocados diretamente no local do tumor ou ao redor deste [95]. Após realização dos tratamentos, o paciente é seguido e controlado pelo seu médico urologista.

Atualmente encontra-se em investigação a aplicação de técnicas de Criocirurgia, Ultrasons de Alta Intensidade e Radioterapia de prótons ou de neutrões, cujos resultados e eficácia são desconhecidos.

Quando o tumor encontra-se na fase avançada, ou seja, quando já se verifica invasão de células cancerígenas em outros órgãos, não são aconselhados os tratamentos anteriormente mencionados pois os mesmos são tratamentos curativos. Nesta fase é determinante controlar a doença de modo a que esta não progrida e o paciente tenha um resto de vida sem dor. Assim, são realizados tratamentos como hormonoterapia, orquidectomia ou quimioterapia. A hormonoterapia pretende inibir a ação das hormonas masculinas, como a testosterona, responsáveis pelo crescimento e proliferação das células cancerígenas. O tratamento é realizado sob a forma de comprimido (toma diária) ou de injeção (administrada mensalmente ou trimestral). Estes dois tipos de medicamentos têm a função de bloquear totalmente a ação das hormonas. A orquidectomia é um tipo de cirurgia que consiste na remoção da polpa testicular de modo a reduzir a produção da maior parte das hormonas masculinas como a testosterona. Este tipo de tratamento pode ser suficiente para controlar a doença não sendo necessário outro tipo de tratamento. A quimioterapia é o tipo de tratamento que é usado nos casos em que o doente não responde ou deixa de responder aos tratamentos acima mencionados [95]. Nesta fase da doença muitos pacientes recorrem a medicamentos para aliviar sintomas de dor, de fraqueza, de queixas do trato urinário, bem como consequências da doença como insuficiência renal, anemia e fraturas ósseas. Todos estes tratamentos têm complicações e efeitos secundários e não têm capacidade para controlar ou curar por completo a doença. Este facto vem reafirmar a importância e a necessidade de realização de um diagnóstico precoce com vista a uma atuação cada vez mais precoce sobre a doença.

1.3 Imunoensaio quimiluminescente

1.3.1 Quimiluminescência

A quimiluminescência é definida como uma reação química em que um dos produtos finais é a emissão de luz. A luz gerada durante uma reação é medida em unidades relativas de luz (RLUS) [96].

1.3.1.1 Princípio do teste

O teste Access Hybritech é um imunoensaio enzimático (EIA) de dois sítios tipo “sandwich”. Na realização do teste, uma amostra é adicionada ao recipiente de reação com um conjugado anticorpo monoclonal de rato anti-PSA-fosfatase alcalina, partículas paramagnéticas revestidas com anticorpo monoclonal de rato anti-[-2] proPSA e um reagente bloqueador. O [-2] proPSA da amostra liga-se ao anticorpo monoclonal anti-[-2] proPSA imobilizado na fase sólida, ao mesmo tempo, o conjugado anticorpo monoclonal anti-PSA-fosfatase alcalina reage com locais antigénicos diferentes na molécula de [-2] proPSA. Após incubação no recipiente de reação, os materiais ligados à fase sólida são mantidos, enquanto os restantes materiais não ligados são lavados e eliminados. Por fim, o substrato quimiluminescente Lumi-Phos 530 é adicionado ao recipiente e a luz gerada pela reação é medida com um luminómetro (Figura 8).

A produção de luz é diretamente proporcional à concentração de [-2] proPSA na amostra. A quantidade de analito presente na amostra é calculada a partir duma curva de calibração multiponto armazenada no sistema [97].

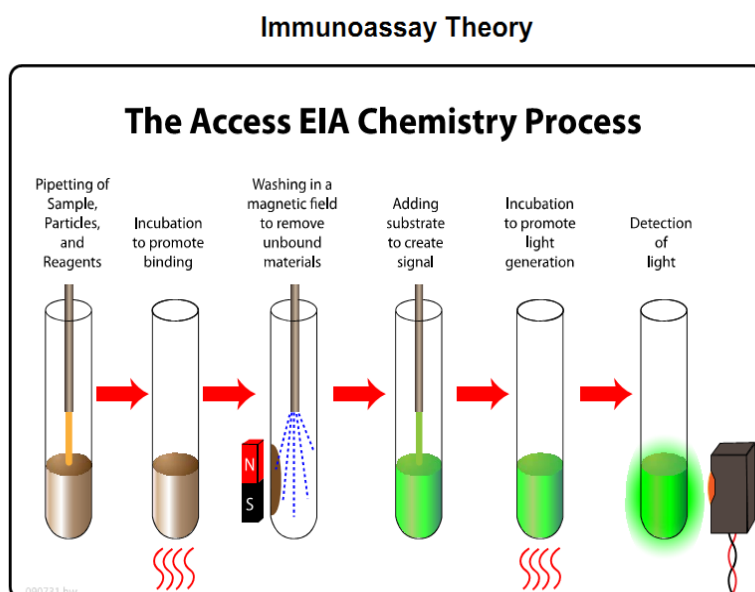


Figura 8.

Princípio do teste de EIA, técnica de quimiluminescência [98].

1.4 Curva ROC

A curva ROC é um gráfico que apresenta a especificidade do teste (marcadores), através do índice de verdadeiros positivos em relação ao índice de falsos positivos. É uma ferramenta muito importante, pois quantifica de forma específica os problemas a nível de desempenho de diagnóstico em medicina e analisa a variação da sensibilidade e especificidade para diferentes valores de corte [102]. O teste perfeito corresponderá a uma linha horizontal no topo do gráfico, porém esta nunca será alcançada [102]. Na prática são consideradas boas curvas, as que se encontram entre a linha diagonal e a linha perfeita, ou seja, a curva que estiver mais longe da linha diagonal [102]. De modo a determinar se duas ou mais curvas ROC são significativamente diferentes, a avaliação é feita através da determinação da área sob a curva (AUC) (índice de exatidão do teste), sendo possível quantificar a exatidão do teste de diagnóstico, assim como comparar testes diagnósticos [102]. Assim, um valor de 0,5 de área sob a curva corresponde a um valor nulo. Um valor acima de 0,7 é considerado como um valor de desempenho satisfatório.

A sensibilidade (também chamada de taxa de verdadeiros positivos) refere-se à capacidade de um teste para identificar positivos corretamente e a especificidade (também chamada de taxa de verdadeiros negativos) à capacidade de um teste para identificar negativos corretamente.

2. Metodologia Experimental

2.1 Aprovação pela comissão de ética

A realização do projeto “Estudo da incidência do cancro da próstata na RAM e avaliação da sua deteção precoce, através da associação do marcador [-2] proPSA ao PSA e PSA livre” no período compreendido entre maio de 2011 e abril de 2012 teve a aprovação do Conselho de Administração do Serviço de Saúde da Região Autónoma da Madeira (SESARAM, E.P.E), após parecer favorável da Comissão de Ética para a Saúde (CES) do SESARAM, E.P.E. (Anexo N°1).

2.2 Amostragem

O estudo transversal envolveu uma amostra da população da Região Autónoma da Madeira, entre maio de 2011 e abril de 2012. Este estudo incidiu sobre os indivíduos que realizaram análises clínicas com despistagem dos marcadores serológicos para o cancro da próstata no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélio Mendonça. Os pedidos das análises provieram dos serviços de Consulta Externa (10,23%), serviço de Urologia (0,53%), Medicinas (1,02%) e outros serviços do Hospital Dr. Nélio Mendonça e Hospital dos Marmeleiros (8,84%), bem como de todos os centros de saúde da Região (79,39%), incluindo o do Porto Santo. A dimensão da amostragem foi de quinze mil trezentos e sessenta e nove (15.369) indivíduos despistados em relação aos marcadores serológicos para o cancro da próstata.

2.2.1 Identificação das amostras

As amostras de sangue, requisitadas por Serviços de Consulta Externa, serviço de Urologia, Medicinas e outros serviços do Hospital Dr. Nélio Mendonça e Hospital dos Marmeleiros bem como de todos centros de saúde de toda a Região, dos indivíduos dadores, de seguida referidos como utentes, foram registados no sistema informático do laboratório, através da abertura de uma ficha e posterior atribuição de um número de identificação.

2.2.2 Colheita e preparação das amostras

As amostras de sangue foram colhidas pelos técnicos de análises clínicas.

Antes de iniciar a colheita, a identificação do utente foi confirmada, enquanto foi preparado o material de colheita e colocadas as etiquetas nos tubos com a identificação do utente. A etiqueta, com o nome do utente, idade e serviço requisitante da análise e respetivo código de barras, foi processada pelo sistema informático, sendo a sua leitura efetuada pelos equipamentos. A zona da punção foi desinfetada com uma compressão impregnada de antisséptico (Skin Prep® (Vycon®)). A garrotagem foi efetuada com cuidado, sendo selecionada a veia mais proeminente por visualização ou por palpação. A agulha foi inserida no local da punção e aliviado o garrote logo que o sangue começou a correr para os tubos, com a ajuda do sistema de vácuo. Após a colheita, foi feita pressão sobre o local da punção até parar a hemorragia. O material utilizado foi descartado para contentores próprios de produtos biológicos.

O soro foi obtido utilizando-se tubos da BD Vacutainer® SS II Advance® para a sua colheita, de acordo com as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Os referidos tubos contêm um ativador de coágulo adsorvido nas paredes, cujo objetivo é acelerar o processo de coagulação, possuindo igualmente um gel-separador no fundo do tubo que auxilia na obtenção do soro sanguíneo, proporcionando assim uma maior eficiência de todo o processo laboratorial [101].

Após o processo de triagem, as amostras foram encaminhadas para o aparelho DXI 800 da Beckman Coulter. Este aparelho processou as amostras e permitiu a obtenção do soro, através da centrifugação dos tubos, a 3000 r.p.m., durante oito minutos.

As amostras enviadas por outros postos de colheita foram transportadas em caixas refrigeradas (5°C a 12°C), sendo identificadas e processadas da mesma forma. Seguidamente, foram processadas no equipamento de quimioluminescência DXI 800 que executa a determinação de PSA, fPSA e -2proPSA.

2.2.3 Recolha de dados

A recolha dos dados foi efetuada com recurso aos dois *softwares* ModuLab e PAT-Win do Laboratório de Patologia Clínica e Laboratório de Anatomia Patológica.

Numa primeira fase, foi aplicado um filtro no ModuLab, entre 1 de maio de 2011 e 30 de abril de 2012, para detetar o número de indivíduos com valores de PSA, e

posteriormente outro filtro para seleccionar o número de indivíduos com valores de PSA igual ou superior a 4,0 ng/mL.

As amostras foram descodificadas, sendo conhecidos o nome e a idade do utente, os dados clínicos, laboratoriais, a data do pedido, o serviço requisitante, o resultado do marcador serológico (PSA) e por vezes diagnóstico. Os dados foram transferidos para o programa Microsoft Office *Excel*, para posterior tratamento estatístico.

Por cada pedido seleccionado foi separada uma quantidade de soro em alíquotas devidamente etiquetados e armazenados à temperatura de -20°C , para posterior doseamento do [-2] proPSA.

Posteriormente, um filtro foi aplicado ao *software* PAT-Win, no mesmo período atrás mencionado, dos pacientes com relatório anatomopatológico. Por cada pedido, foi recolhido o nome do utente, o número e a data da análise, os dados clínicos, o serviço requisitante e o relatório anatomopatológico.

Após tratamento, os dados foram cruzados, verificando-se os utentes com os marcadores oncológicos positivos para o cancro da próstata, o respetivo relatório anatomopatológico igualmente positivo e análise do [-2] proPSA realizado.

2.3 Metodologia

A determinação dos marcadores serológicos PSA, PSA livre e [-2] proPSA foi realizada seguindo a mesma metodologia nos três analitos, com recurso ao analisador automático UniCel DxI 800 (Figura 9).



Figura 9.
Analisador automático UniCel DxI 800 [97].

O DXI 800 é um equipamento automatizado, concebido para realizar o diagnóstico laboratorial de parâmetros bioquímicos e hormonais. É um analisador de grande eficácia, com um rendimento máximo de quatrocentas análises por hora.

Este ensaio utiliza a técnica do Imunoensaio Quimiluminescente, com partículas paramagnéticas para determinação quantitativa dos níveis totais dos antigénios em estudo (PSA, PSA livre e [-2] proPSA) no soro humano (Figura 10).

A integridade dos reagentes foi testada recorrendo a um controlo de qualidade analítica quer interno quer externo, composto por uma matriz humana onde foram previamente feitas determinações em condições consideradas ideais. Os valores obtidos enquadravam-se dentro do intervalo de confiança recomendados por Westgard, daí termos avançado, com completa confiança para a determinação dos respetivos analitos nas amostras dos utentes objeto do nosso estudo (Anexo Nº 2 e Nº 3). As regras de Westgard baseiam-se em métodos estatísticos para analisar os dados do Controlo de Qualidade. Estas definem limites de aplicabilidade do método e podem usar-se para detetar erros sistemáticos e/ou casuais. Existe seis regras: três de aviso e três atuação. A violação das regras de aviso deve levar à revisão de todo o procedimento bem como da qualidade dos reagentes e calibração do teste. A violação das regras de atuação deve resultar na rejeição dos resultados.

As amostras de soro foram adicionadas individualmente no recipiente de reação, contendo o conjugado anticorpo monoclonal de rato anti-PSA-fosfatase alcalina e partículas paramagnéticas revestidas com o anticorpo monoclonal de rato anti-(analito em estudo). A reação foi terminada com a adição de reagente STOP (Figura 10).

Após incubação sob agitação durante dez minutos, à temperatura de 36,5°C, na cuvete de reação, os materiais que se encontravam ligados à fase sólida ficaram retidos num campo magnético, enquanto os materiais não ligados foram removidos por três lavagens sucessivas.

De seguida, o substrato quimiluminescente, Lumi-Phos 530, foi adicionado à cuvete, com a mistura do reagente, e a luz gerada pela reação foi medida com um luminómetro. A emissão de luz é diretamente proporcional à concentração de analito na amostra (Anexo Nº 2).

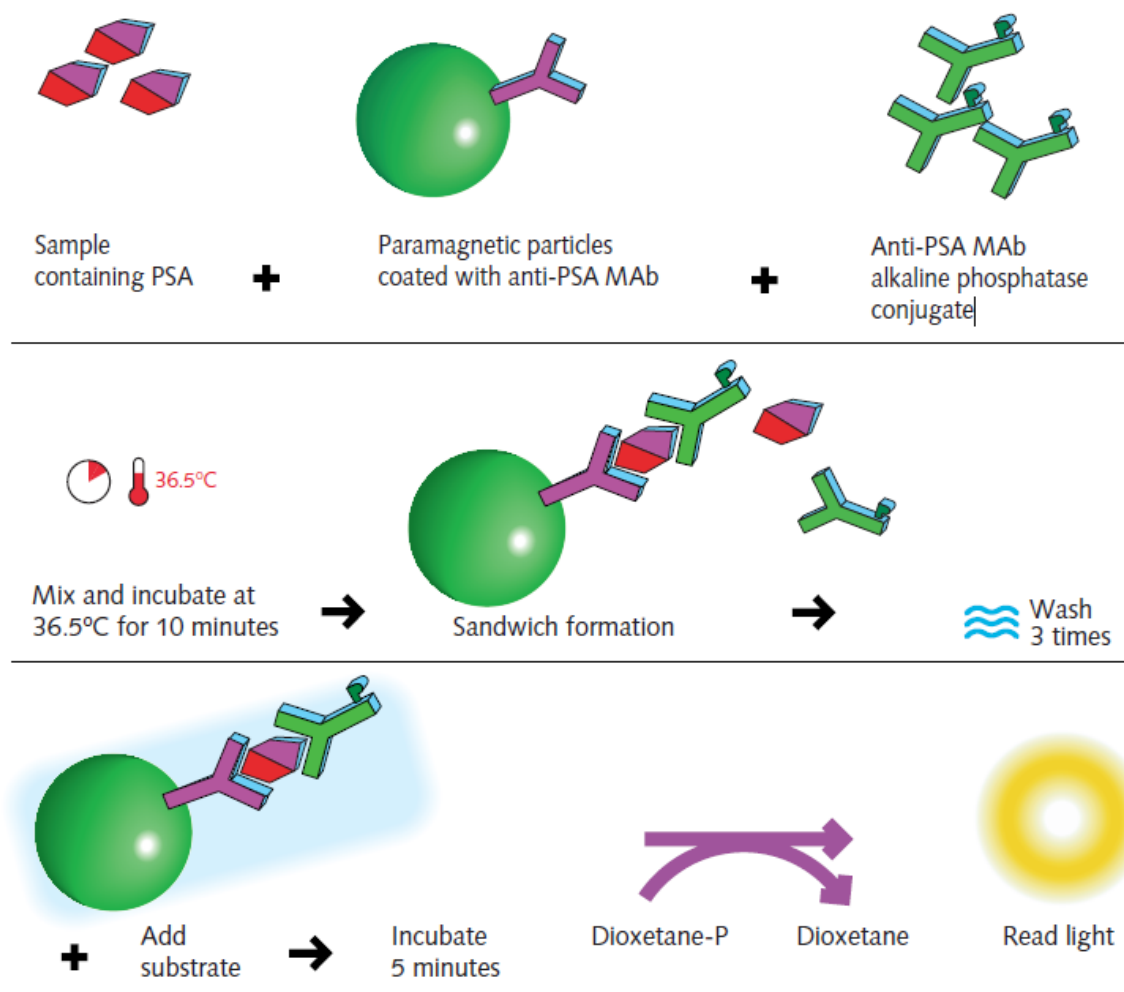


Figura 10.

Princípio de funcionamento do teste de PSA no UniCel Dxl 800 técnica (“sandwich”) [98].

Os resultados dos testes dos doentes foram calculados automaticamente pelo *software* do sistema, utilizando um modelo matemático de curva logística ponderada de quatro parâmetros (4PLC).

2.3.1 Avaliação dos testes

As amostras foram consideradas positivas quando os valores de absorvância foram superiores aos de cut-off e negativas quando os valores de absorvância foram inferiores aos de cut-off [98].

Os valores de [-2] proPSA isolados não demonstram eficácia na discriminação (gestão) dos pacientes, pelo que as concentrações de PSA, fPSA e [-2] proPSA devem ser determinadas na mesma amostra de soro e com o mesmo analisador, para calcular o

Beckman Coulter Prostate Health Index (Phi). Os resultados do Beckman Coulter Phi, assim, podem ser utilizados na gestão dos pacientes. O Beckman Coulter Phi é calculado automaticamente pelos Sistemas de Imunoensaio Access, sendo calculado, somente se os resultados PSA e fPSA foram obtidos com o mesmo tipo de calibração (Hybritech ou WHO), aplicando a fórmula: $phi = \frac{[-2] \text{ proPSA}}{fPSA} \times \sqrt{PSA}$ [98].

2.4 Análise estatística dos dados

As determinações dos utentes foram organizadas por tabelas em função dos parâmetros, com recurso ao programa *Excel 2007*, do Microsoft Office e posteriormente analisados com o auxílio do programa estatístico SPSS versão IBM SPSS Statistics 22.

O tratamento dos resultados consistiu na análise estatística robusta, com o cálculo da média, mínimo, máximo e mediana (estatística descritiva) para as variáveis quantitativas. A estatística descritiva foi utilizada com o objetivo de organizar e simplificar a análise dos resultados, com a utilização de gráficos e tabelas. Para as variáveis qualitativas foram calculadas também a frequência e correlações entre variáveis.

A fim de comprovar a nossa hipótese de trabalho foi determinado o valor preditivo dos diferentes marcadores (parâmetros) utilizados na deteção do CP, através da obtenção e análise da curva ROC. Para além da curva ROC foi calculado o índice de exatidão do teste.

A sensibilidade e especificidade dos marcadores foram calculadas em função do padrão de diagnóstico de CP, a biópsia.

3. Resultados

No presente capítulo são apresentados os resultados obtidos sobre a incidência do cancro da próstata, utilizando-se uma amostragem de indivíduos do sexo masculino da população da RAM. Também é feita a avaliação sobre as perspetivas da sua deteção precoce, através da introdução e associação do marcador [-2] proPSA aos marcadores usuais PSA e PSA livre.

Os resultados encontram-se agrupados e apresentados tendo em consideração três níveis de caracterização e análise da amostragem:

- a. Amostra inicial
- b. Subamostra dos indivíduos da zona cinzenta de diagnóstico
- c. Subamostra dos indivíduos submetidos a biópsia

3.1 Caracterização da amostra inicial

No Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélio Mendonça E.P.E. do Funchal entraram vinte e um mil cento e cinquenta e três (21.153) pedidos para análise de marcadores serológicos da doença da próstata PSA e/ou PSA livre. Na Tabela 6 é apresentado o número de pedidos de análise emitidos no período entre maio de 2011 a abril de 2012. Foram selecionados os processos repetidos. A segunda linha indica que quinze mil trezentos e sessenta e nove (15.369) indivíduos distintos realizaram estes testes, sendo que quinze mil trezentos e sessenta e nove (15.369) realizaram o teste do PSA e dois mil cento e dezasseis (2.116) realizaram o teste do PSA e PSA Livre.

Tabela 6.
Número de pedidos dos marcadores serológicos.

Pedidos/Marcadores	PSA e/ou PSA Livre	PSA	PSA e PSA Livre
Número de pedidos de análise realizados	21.153	18.489	2.664
Número de indivíduos distintos sujeitos a análises	15.369	15.369	2.116

Entre os quinze mil trezentos e sessenta e nove (15.369) indivíduos submetidos à análise do PSA encontraram-se trezentos e setenta e quatro (374) com o valor mínimo 0,1ng/mL, tendo apenas um (1) apresentado o valor máximo de 1.210,81ng/mL.

Relativamente ao PSA e PSA livre, de um total de (2.116) indivíduos sujeitos a esta prova, foram três (3) os que revelaram o valor mínimo de 0,07ng/mL e um (1) demonstrou o valor máximo de 6,25ng/mL. As quantidades médias foram 2,13ng/mL e 0,77ng/mL para o PSA e para o PSA e PSA Livre, respetivamente (Tabela 7).

Tabela 7.

Valor mínimo, máximo e média registada para os marcadores serológicos PSA e PSA Livre.

Marcadores	Valor mínimo (ng/mL)	Valor máximo (ng/mL)	Média (ng/mL)
PSA	0,10	1.210,81	2,13
PSA Livre	0,07	6,25	0,77

3.1.1 Entidade requisitante

Os pedidos de análises dos marcadores serológicos de CP foram submetidos pelos serviços do SESARAM. Os centros de saúde, com 79,39%, e a consulta externa, com 10,23%, foram os serviços que solicitaram maior número de análises. Outros serviços que contribuíram com pedidos foram o das Medicinas (1,02%) e o da Urologia (0,53%) (Figura 11).

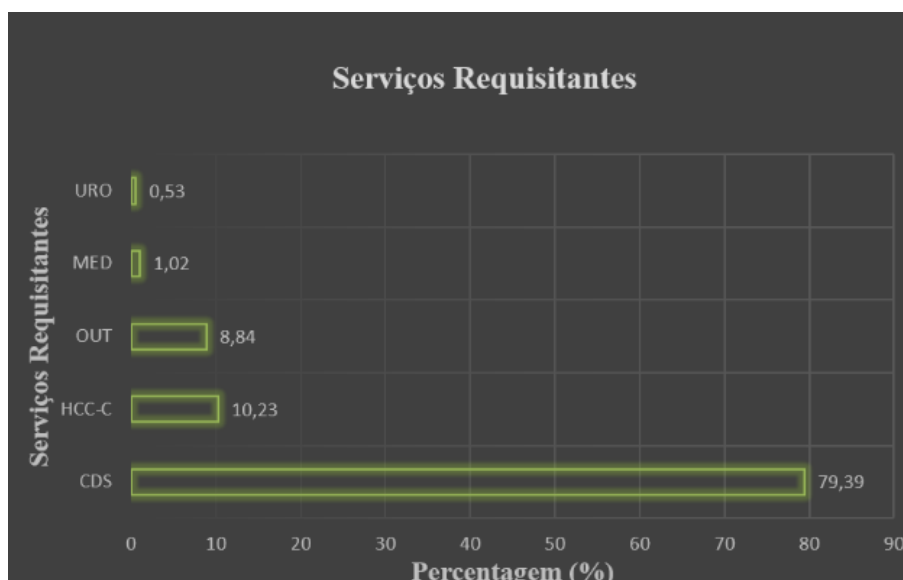


Figura 11.

Distribuição dos pedidos de análises para marcadores oncológicos da doença da Próstata por serviço requisitante.

CDS - Centros de Saúde, HCC-C - Consulta Externa, OUT - Outros Serviços, URO – Serviço de Urologia, MED – Serviço de Medicinas (I,II,III).

3.1.2 Pedido de diagnóstico

A Tabela 8 e a Figura 12 permitem-nos constatar que, na maioria das vezes, o diagnóstico médico ou não era conhecido ou não era explícito. A maioria dos pedidos, treze mil quinhentos e nove pedidos (87,89%) foram realizados como forma de controlo, de rotina, por outro diagnóstico ou até sem diagnóstico estabelecido. Os restantes pedidos, mil oitocentos e sessenta (12,10%), tinham diagnóstico não relacionado com o CP, nomeadamente diabetes, mil e sessenta e oito (6,95%) e hipertensão arterial, setecentos e noventa e dois (5,15%).

Tabela 8.

Distribuição dos pedidos de análise aos marcadores oncológicos de acordo com o diagnóstico clínico associado.

Diagnóstico	Nº Pedidos	Diagnóstico	Nº Pedidos
Prost	14	Cont.	1283
Neop	92	O.D.	2800
HP	91	S.D.	3111
HA	792	Rot.	6118
Diabetes	1068	-	-

Neop – Neoplasia; HP – Hiperplasia da Próstata; Prost – Prostatite; Cont – Controlo; HA – Hipertensão Arterial; OD – Outro Diagnóstico; Rot – Rotina; SD – Sem Diagnóstico.

A Figura 12 apresenta a distribuição percentual dos pedidos de acordo com o diagnóstico clínico estabelecido.

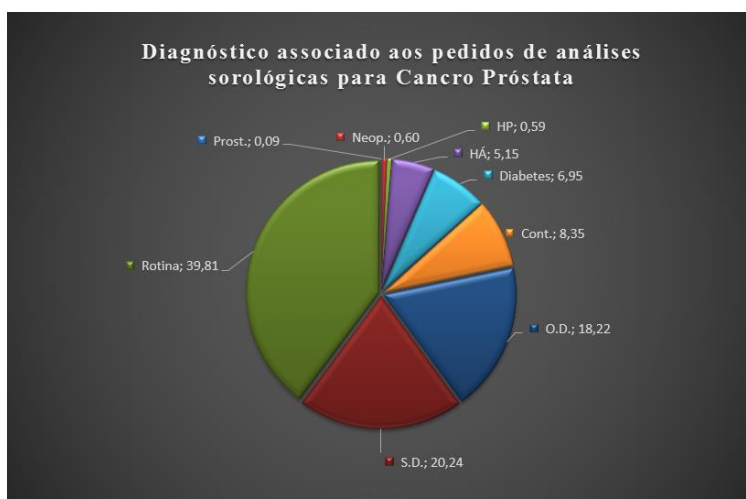


Figura 12.

Diagnóstico associado aos pedidos de análises oncológicas para Cancro da Próstata.

Neop – Neoplasia; HP – Hiperplasia da Próstata; Prost – Prostatite; Cont – Controlo; HA – Hipertensão Arterial; OD – Outro Diagnóstico; SD – Sem Diagnóstico.

3.1.3 Origem geográfica

A distribuição geográfica dos pedidos de análise dos marcadores oncológicos e dos indivíduos do sexo masculino é apresentada na Tabela 9 e Figura 13 – Figura 14.

Tabela 9.

Estimativa da população masculina residente na Região Autónoma da Madeira e por concelho em 31 de dezembro de 2012 [116] e quantidade de indivíduos por concelho.

Concelho	RAM	Funchal	Santa Cruz	C.ª de Lobos	Santana	Ribeira Brava
População masculina	123.139	50.378	21.024	16.757	3.358	5.884
Indivíduos masculinos	15.369	8.556	1.462	1.442	926	597
Concelho	Machico	São Vicente	Ponta do Sol	Calheta	Porto Santo	Porto Moniz
População masculina	10.302	2.551	4.014	5.113	2.650	1.108
Indivíduos masculinos	557	494	474	384	352	125

Ao analisar a origem geográfica dos pedidos, verifica-se que nas zonas urbanas (Funchal, Câmara de Lobos e Santa Cruz) concentram-se 74,57% dos quinze mil trezentos e sessenta e nove indivíduos analisados, enquanto as zonas rurais (Calheta, Machico, Porto Moniz, Porto Santo, Ponta do Sol, Ribeira Brava, São Vicente e Santana) registam 25,43% de pedidos.

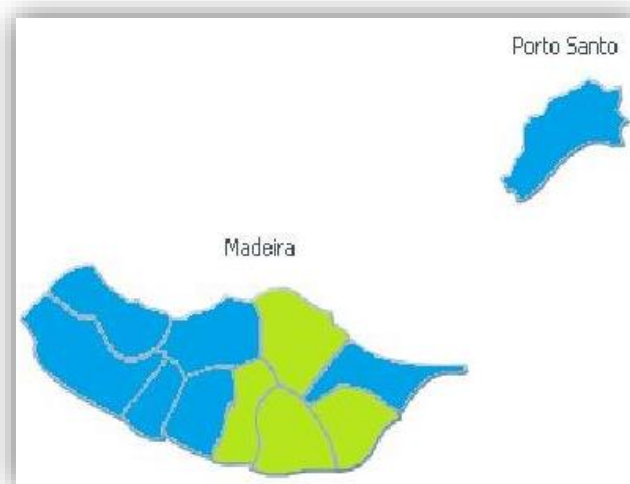


Figura 13.

Distribuição geográfica de pedidos de análise dos marcadores serológicos. A verde estão os concelhos com maior quantidade de pedidos (> 800) e a azul os concelhos com menor quantidade de pedidos (< 800) ao longo do ano em estudo.

Contudo, atendendo à distribuição da população masculina por concelho, pode-se constatar que foi em Santana que se registou a maior percentagem de pedidos (27,6%).

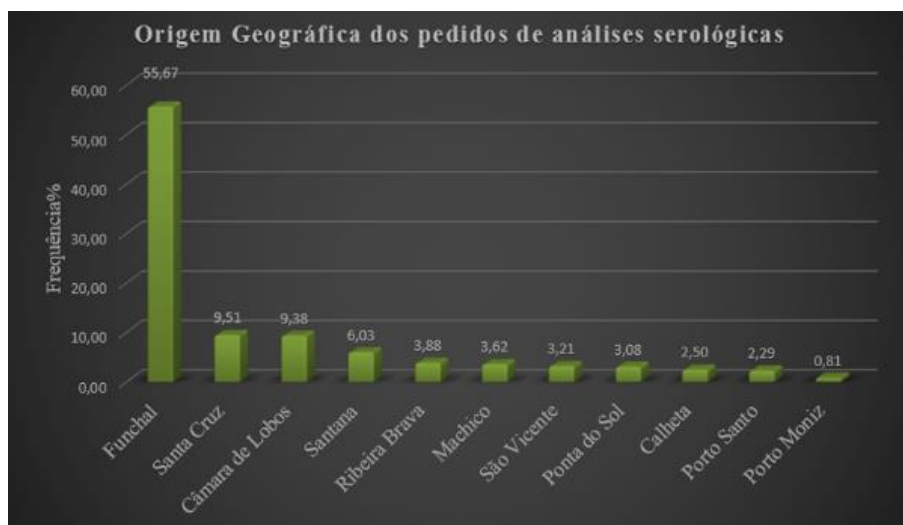


Figura 14.

Origem geográfica dos pedidos de análises serológicas para Cancro da Próstata.

3.1.4 Idade

Os utentes da nossa amostra foram agrupados em faixas etárias, de acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS) (Tabela 10).

Tabela 10.

Relação do PSA e % fPSA segundo a faixa etária dos utentes.

Idade	PSA		%f PSA – Rácio (PSA livre/PSA total)	
	Nº Indivíduos	Frequência %	Nº Indivíduos	Rácio %
<50 anos	3.250	21,15	83	3,92
≥50 e <60 anos	4.252	27,67	310	14,65
≥60 e <70 anos	3.930	25,57	640	30,25
≥70 anos	3.937	25,62	1083	51,18
Total	15.369	100	2.116	100

A análise da Tabela 10 e Figura 15 permite constatar que em todas as faixas etárias foram realizados na mesma proporção a análise do PSA. Verifica-se que com o aumento da idade aumenta o número de determinações de PSA. A faixa etária em que se realizou mais pedidos de PSA total foi entre os cinquenta e os sessenta anos (27,67%), mantendo-

se relativamente constante com o aumento da idade. Quanto ao rácio [(concentração de PSA livre / concentração de PSA total) x 100], pode-se constatar que de acordo com o que seria de esperar, este é proporcional ao aumento da idade, sendo que para idades inferiores aos cinquenta anos (3,92%) o valor é considerado baixo para o número de análises efetuadas em comparação com indivíduos de idade superior a setenta anos (51,18%), em que o número de análises é muito maior, resultando num valor de rácio mais elevado (menor a agressividade do tumor).

Os indivíduos com idade até cinquenta e nove anos possuem valores de rácio comprometidos à realização de biópsia (o rácio é menor em doentes com cancro) [66], pelo que é de salientar que o valor de rácio depende do valor de PSA livre.

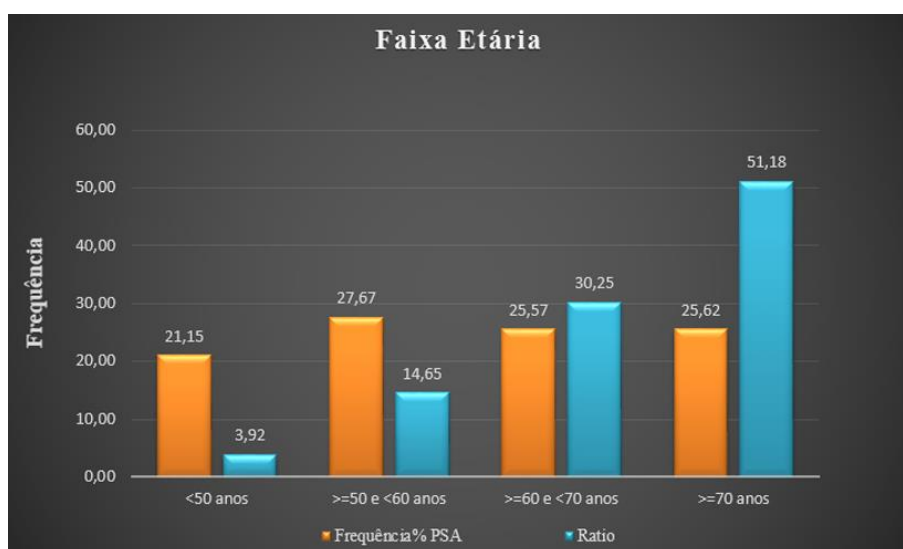


Figura 15.

Distribuição por faixas etárias dos indivíduos com pedidos de análises oncológicas para deteção do Cancro da Próstata.

Colunas laranja-representa a frequência de PSA; Colunas azuis-representa o valor de Rácio (fPSA/PSA).

3.1.4.1 PSA e rácio (% PSA livre)

Os indivíduos a quem foi solicitado o teste de PSA livre (n=2116) foram agrupados por valores de referência de PSA (Tabela 11).

Tabela 11.

Distribuição de indivíduos por valores de referência de PSA e relação com o rácio.

PSA (ng/ml)	Total indivíduos (n=2116)	Média PSA (ng/ml)	Média rácio (PSA livre/PSA) %	Média idade
0,0 – 1,99	51	1,25	84,58	66,21
2,0 – 3,99	1107	3,09	19,47	67,7
4,0 - 10,0	914	5,92	16,51	70,99
>10,1	44	25,21	8,77	73,34

A análise da Tabela 11 permite verificar que com o aumento da idade aumenta o PSA e menor é o valor do rácio. A faixa do PSA com mais indivíduos é entre os 2,0 e os 4,0 ng/ml (1107 indivíduos) não sendo muito dísparo da faixa de 4,0 a 10,0 ng/ml (914 indivíduos). Quanto ao rácio, pode-se constatar que só na faixa do PSA de 0,0 a 1,99 ng/ml (51 indivíduos) não seriam indiciados à realização de biópsia, visto que a media do rácio (84,58%) é elevada (valor rácio >20,0%).

O valor de rácio mais baixo (maior probabilidade de realização de biópsia) incide sobre indivíduos com valores de PSA superior a 10,0 ng/ml, que corresponde a quarenta e três indivíduos com uma média de idade de 73,34 anos.

3.2 Caracterização da subamostra de indivíduos na zona cinzenta

Uma vez que o diagnóstico precoce do cancro da próstata deverá requerer a utilização de valores de cut-off de PSA suficientemente baixos para detetar o maior número possível de tumores ou potenciais portadores de tumores, estes valores originam um dilema sem resolução que envolve o compromisso entre um grau de sensibilidade suficiente e a especificidade elevada do método. A “zona cinzenta” para estes valores situa-se entre os 4,0 e 10,0 ng/mL.

Do total de indivíduos sujeitos a análise quantitativa de PSA (15.369), mil e dez apresentaram valores situados dentro do intervalo da zona cinzenta, correspondendo a 6,6%.

3.2.1 Idade

De acordo com as recomendações da OMS, os indivíduos dentro dos valores de referência de PSA ajustados à idade são apresentados na tabela seguinte (Tabela 12).

Tabela 12.

Distribuição de indivíduos por valores de referência de PSA ajustados à idade.

Idade	Total de indivíduos	Frequência%	Número de indivíduos com valores de referência	Frequência%
<50 anos e PSA $\geq 2,5$ ng/mL	1010	2,47	25	4,81
≥ 50 e <60 anos e PSA $\geq 3,5$ ng/mL		10,69	108	20,77
≥ 60 e <70 anos e PSA $\geq 4,5$ ng/mL		19,80	200	38,46
≥ 70 anos e PSA $\geq 6,5$ ng/mL		18,51	187	35,96
Total		51,48	520	100,00

Assim, pode-se constatar que não é possível selecionar os dados consoante a idade e valores de PSA total, de acordo com as recomendações estipuladas pela OMS. Caso se aplicasse estas recomendações estaríamos perante uma situação em que haveria a exclusão de muitos falsos negativos (48,52%), pelo que se optou por não fazer qualquer análise mais aprofundada a esta subamostra.

3.3 Caracterização da subamostra de indivíduos submetidos a biópsia.

No período em estudo, entre as vinte e um mil cento e cinquenta e três análises de PSA e/ou PSA livre solicitadas foram realizadas no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Dr. Nélio Ferraz Mendonça cento e vinte e três biópsias a indivíduos com suspeita de CP. Deste total de biópsias, trinta e oito foram positivas, confirmando o CP e oitenta e cinco foram negativas. Entre os quinze mil trezentos e sessenta e nove indivíduos que constituíam a nossa amostra, oitenta e dois (0,53%) foram submetidos a biópsia, nesta vinte e sete apresentaram valores positivos (33%) e cinquenta e cinco apresentaram valores negativos (67%) (Tabela 13).

A discrepância no total de biópsias realizadas deve-se ao fato de não se possuir amostra para dosear, pois aquando do início do estudo já havia biópsias em curso.

Tabela 13.

Amostra dos indivíduos analisados ao PSA com apresentação do número de biópsias realizadas.

PSA Total	Biópsias Realizadas	Total de Indivíduos (n=15.369)	
		Biópsias Positivas	Biópsias Negativas
<4,0 ng/ml	82	8	34
4,0 – 10,0 ng/ml		6	13
>10,0 ng/ml		13	8
Total		27	55

3.3.1 Entidade requisitante

Os centros de saúde foram os serviços que se destacaram nos pedidos deste tipo de teste de diagnóstico, provindo destes 69,51% do total de biópsias requeridas. Os restantes serviços solicitantes foram a consulta externa do hospital (16,51%), a urologia (7,31%) e outros serviços (3,66%), pelo que se deduz que esta patologia terá interesse clínico em outras áreas de saúde (Figura 16).

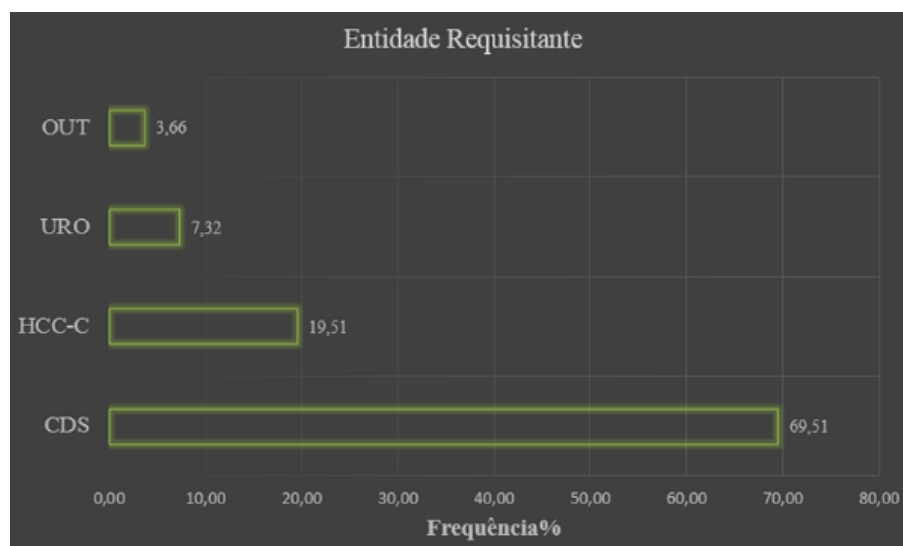


Figura 16.

Distribuição dos pedidos de biópsias pelos diferentes serviços requisitantes. CDS - Centros de saúde, HCC-C - Consulta externa, OUT - Outros Serviços.

3.3.2 Origem geográfica dos pedidos de biópsia

De acordo com a Tabela 14 e Figura 17, verifica-se que foi no concelho do Funchal que houve uma maior quantidade de pedidos de biópsia, contudo, pode-se constatar que a maior percentagem de pedidos de biópsia, relativamente à população masculina, teve origem na Calheta (0,78%).

Tabela 14.

Quantidade de pedidos de biópsia por concelho da Região Autónoma da Madeira em relação aos pedidos de análise a marcadores.

Concelho	Total	Funchal	Santa Cruz	C. de Lobos	Ponta do Sol	Calheta
Pedidos de Biópsia	82	62	5	5	3	3
Biópsia Positiva	27	18	2	2	2	1
Biópsia Negativa	55	44	3	3	1	2
Pedidos de análise a marcadores	15.369	8.556	1.462	1.442	474	384
Concelho	Machico	Santana	São Vicente	Ribeira Brava	Porto Santo	Porto Moniz
Pedidos de Biópsia	2	1	1	0	0	0
Biópsia Positiva	1	0	1	0	0	0
Biópsia Negativa	1	1	0	0	0	0
Pedidos de análise a marcadores	557	926	494	597	352	125

O concelho de Santa Cruz e Câmara de Lobos, bem como, a Ponta do Sol e a Calheta tiveram a mesma quantidade de pedidos de biópsia. A Ribeira Brava, o Porto Moniz e o Porto Santo não tiveram qualquer pedido de biópsia.

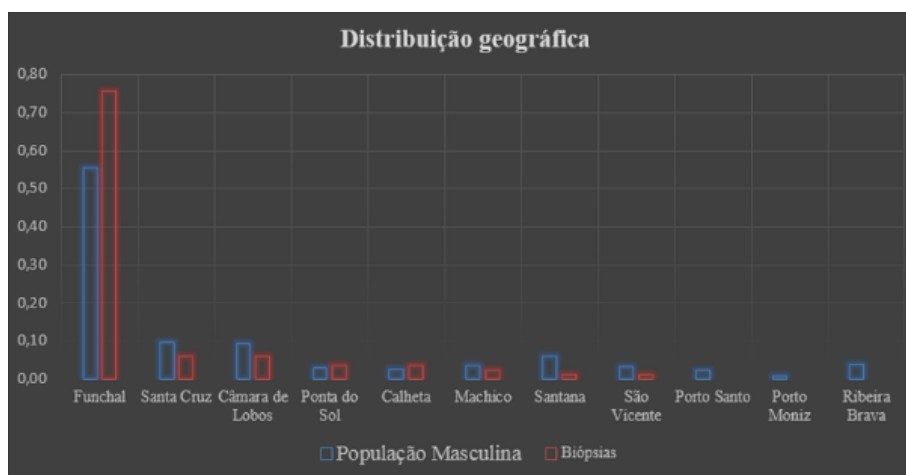


Figura 17.

Percentagem de pedidos de biópsias relativamente à população total de cada concelho e à quantidade de pedidos de análise de PSA.

Em relação aos resultados das biópsias (positivo ou negativo), Tabela 14 e Figura 18 verifica-se que apenas em São Vicente, as biópsias com resultado positivo foram superiores às negativas. Em Machico, a quantidade de biópsias positivas foi igual à de biópsias negativas. Nos concelhos de Câmara de Lobos e de Santa Cruz verifica-se que quer o pedido de biópsias positivas quer o de negativas foi idêntico nos dois concelhos.

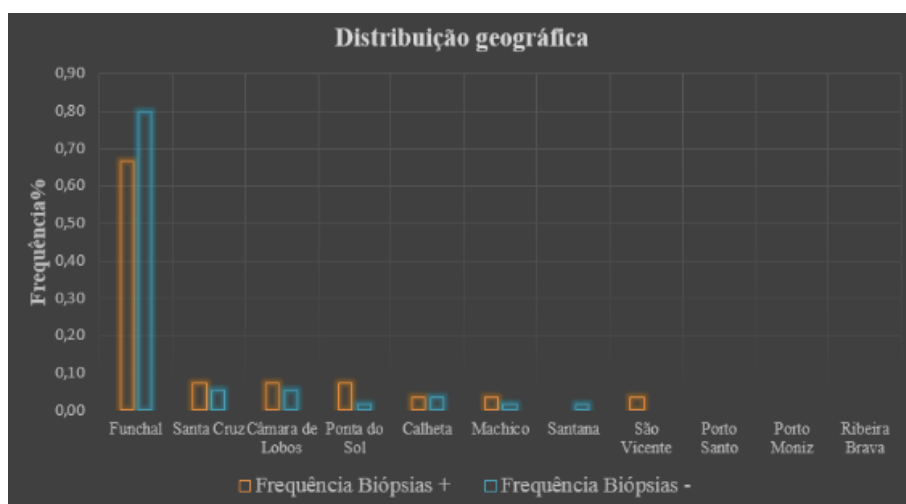


Figura 18.

Frequência de biópsias positivas (+) e negativas (-) por concelho, em relação ao número total de biópsias.

3.3.3 Idade

Na Tabela 15 é apresentada a distribuição de biópsias por faixas etárias, de acordo com as recomendações da OMS.

Tabela 15.

Distribuição dos indivíduos submetidos a biópsia por faixas etárias e respetiva percentagem em relação à quantidade de indivíduos sujeitos a análises do PSA.

Faixas etárias	Total de indivíduos	Frequência% de biópsias
<50 anos	2	2,44
≥50 e <60 anos	13	15,85
≥60 e <70 anos	26	31,71
≥70 anos	41	50,00
Total	82	100,00

A Tabela 16, ilustra que com o aumento da idade do utente, aumenta também a quantidade de biópsias realizadas.

Tabela 16.

Resultados das biópsias realizadas aos indivíduos e frequência, por faixa etária.

Faixas etárias	Biópsias Positivas		Biópsias Negativas	
	Nº Indivíduos	Frequência (%)	Nº Indivíduos	Frequência (%)
<50 anos	0	0,00	2	3,64
>=50 e <60 anos	5	18,52	8	14,55
>=60 e <70 anos	9	33,33	17	30,91
>=70 anos	13	48,15	28	50,91
Total	27	100,00	55	100,00

A média etária dos utentes com diagnóstico positivo de CP por biópsia positiva foi de 68,2 anos e de utentes com diagnóstico negativo (biópsia negativa) foi 68,8 anos.

Pelos dados da Tabela 16 e da Figura 19 podemos observar que a percentagem de biópsias positivas e negativas mantém-se relativamente constante nas 3 faixas etárias mais elevadas, com uma tendência de diminuição de biópsias positivas com o aumento da idade. É de salientar que nos indivíduos com idade inferior a cinquenta anos não se detetaram biópsias positivas.

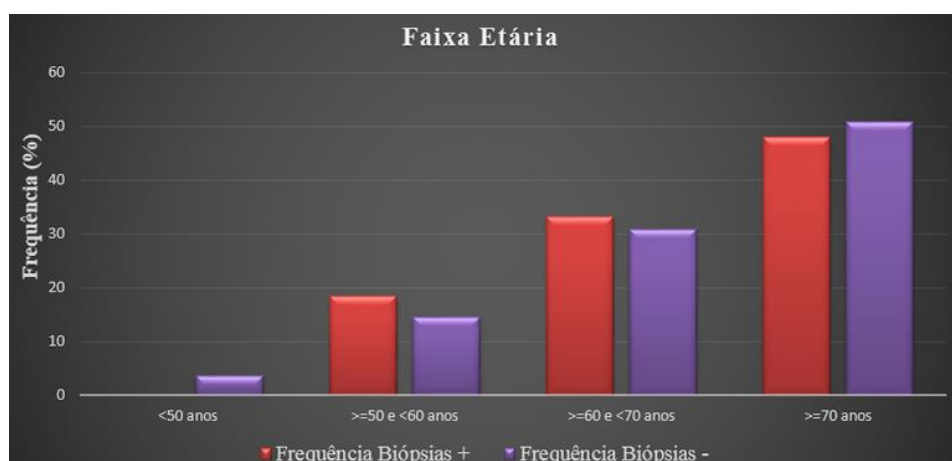


Figura 19.

Distribuição de biópsias positivas e negativas por faixas etárias.

3.4 Utilização de marcadores serológicos na classificação dos indivíduos, segundo o risco e diagnóstico do cancro da próstata

3.4.1 PSA total

Os intervalos de PSA total, clinicamente importantes, foram analisados. Estes intervalos incorporam os valores de PSA Total entre 2,0 a 4,0 ng/mL, 4,1 a 10,0 ng/mL e superior a 10,1 ng/mL (Tabela 17). Assim, a amostra utilizada nesta fase do estudo é composta pelos vinte e cinco indivíduos submetidos a biópsia, com valores de PSA total superior a 2,0 ng/mL (cujos resultados variaram de 2,88 a 29,16 ng/mL).

Tabela 17.

Distribuição de biópsias positivas e negativas, segundo os intervalos de PSA.

PSA (ng/mL)	Total Biópsias	Biópsias Positivas	% cut off PSA	Rácio (%) PSA I/PSA	% de CP
2,0-4,0	4	2	50,00	18,14	18,18
4,1-10,0	12	3	25,00	12,92	27,27
≥10,1	9	6	67,00	15,27	54,55
Total Biópsias	25	11	44,00	46,33	100
PSA (ng/mL)	Biópsias Negativas	% cut off PSA	Rácio (%) PSA I/PSA	% de casos negativos	
2,0-4,0	2	50,00	27,25	14,29	
4,1-10,0	9	75,00	19,13	64,29	
≥10,1	3	33,00	24,84	21,43	
Total Biópsias	14	56,00	71,22	100	

A idade média dos vinte e cinco indivíduos de raça caucasiana utilizados nesta parte do estudo é de 71,3 anos (53-89 anos). Destes vinte e cinco indivíduos, 56% não apresentava cancro da próstata e 44 % apresentava (Tabela 18 e Figura 20).

Tabela 18.

Resultado das biópsias por faixa etária dos indivíduos com PSA Total superior a 2,0 ng/mL.

Faixa Etária	Biópsias negativas	Biópsias positivas	Total
<50 anos	0	0	0
≥50 <60 anos	3	2	5
≥60 <70 anos	3	2	5
≥70 anos	8	7	15
Total	14	11	25

No geral, pode-se constatar que o grupo de indivíduos com cancro da próstata e sem cancro da próstata são equivalentes em relação à média de idades (indivíduos doentes = 70,7 anos; indivíduos sem doença = 71,8 anos). É de salientar que foram detetados dois casos, homens com idade superior a setenta anos, com valores de PSA total menor ou igual a 4,0 ng/mL, com cancro da próstata.

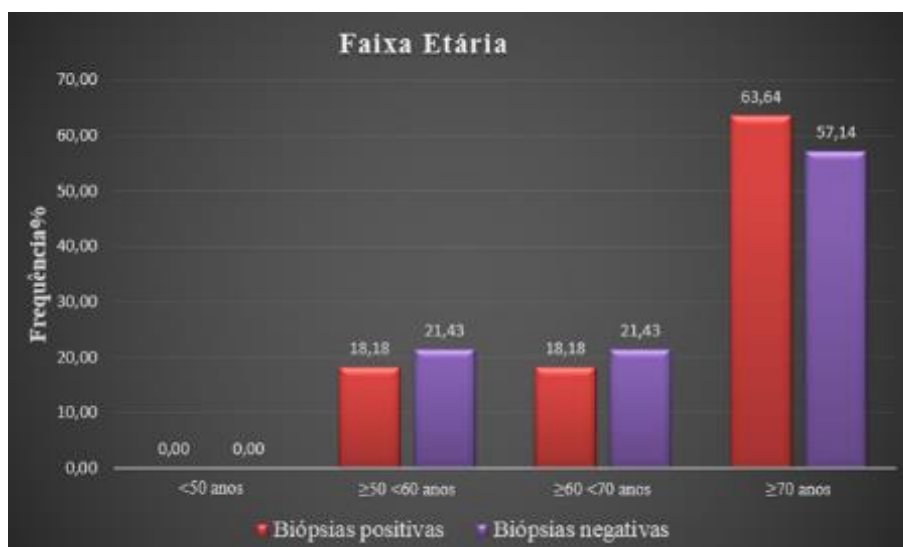


Figura 20.

Frequência do resultado das biópsias por faixa etária dos indivíduos com PSA Total superior a 2,0 ng/mL.

3.4.2 Cancro da próstata e PSA livre

No que respeita à percentagem de PSA livre, nos indivíduos com biópsia positiva, a maioria apresentava valores baixos de PSA livre em circulação (72,73% com PSA livre menor que 20%). Da mesma forma, dos indivíduos com doença, apenas 27,27%, apresentavam um PSA livre maior que 20% (Tabela 19 e Figura 21).

Tabela 19.

Distribuição das biópsias positivas, segundo os cut offs de PSA livre.

Biópsias Positivas			
Cut off PSA livre	<20%	>20%	Total
Número de indivíduos	8	3	11
% Cancro Próstata	72,73	27,27	100
Média rácio	12,73	21,61	34,34

Ao analisar cada cut off, separadamente, verificamos que são nos valores mais baixos de %PSA livre, que encontramos a maior percentagem de indivíduos que contraíram cancro da Próstata (72,73%). Nos indivíduos com %PSA livre mais elevado observa-se uma diminuição na percentagem de cancro da próstata.



Figura 21.

Frequência do resultado de biópsias positivas segundo os cut off de PSA livre.

3.4.3 Correlação entre marcadores serológicos

Neste estudo os valores de [-2] proPSA variaram de 0,79 ng/ml a 118,37 ng/ml. Os valores obtidos para o PSA total foram utilizados para analisar a existência de correlações com os valores de PSA livre e de [-2] proPSA. Apesar do PSA ser o marcador serológico mais usado no despiste de CP, este demonstrou ser pouco robusto, como se pode verificar

pela Figura 22 e Figura 23, pois a correlação entre este e os outros marcadores em estudo (PSA livre e [-2] proPSA) revelou-se ser baixa ($r^2=0,2397$ e $r^2=0,2462$, respetivamente). De igual modo, a Tabela 20 ilustra a diferença entre a média de valores de PSA total em indivíduos com biópsia positiva e biópsia negativa é pequena.

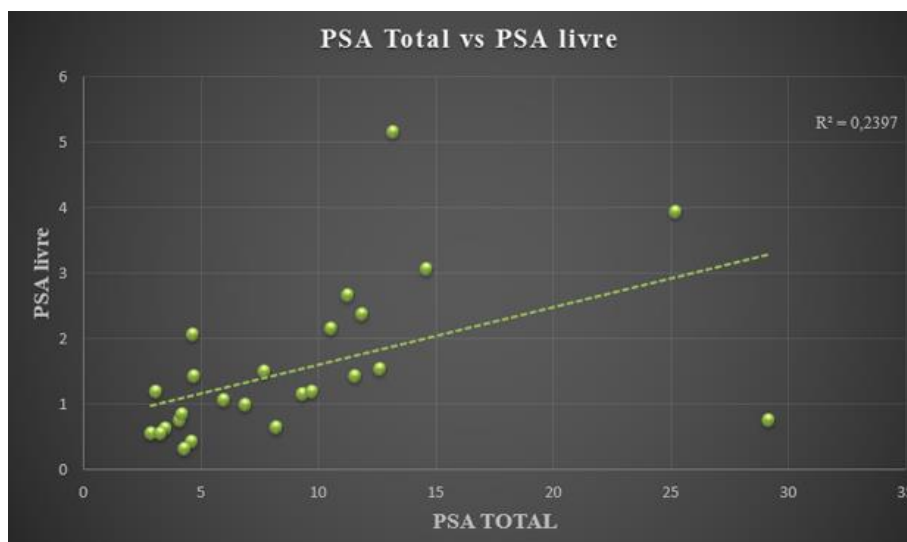


Figura 22.

Variação do PSA Total em função do PSA Livre e cálculo da respetiva correlação, para os 25 indivíduos submetidos a biópsia.

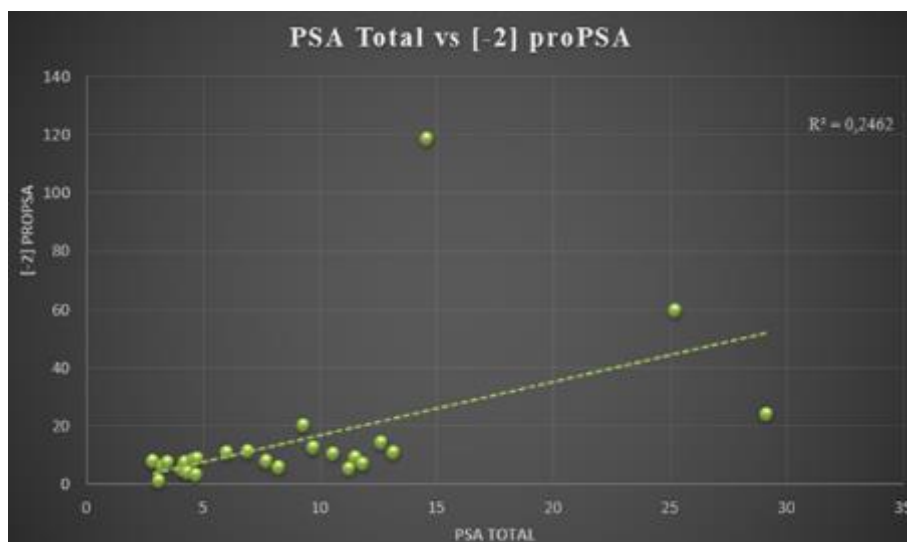


Figura 23.

Variação do PSA Total em função do [-2] proPSA e cálculo da respetiva correlação, para os 25 indivíduos submetidos a biópsia.

Tabela 20.

Comparação de valores médios de utentes com Patologia da próstata e sem patologia.

	Presença de Cancro (N=11)				Ausência de Cancro (N=14)			
	Média	Mediana	Min	Max	Média	Mediana	Min	Max
PSA (ng/mL)	10,56	10,57	2,88	29,18	7,96	5,83	3,12	25,22
PSA Livre (ng/mL)	1,39	1,14	0,42	3,05	1,63	1,19	0,31	5,14
[-2] proPSA (pg/mL)	21,18	10,33	4,88	118,37	10,49	6,93	0,79	59,27
Idade (Anos)	70,73	73,00	55	88	71,79	73,50	53	89

3.4.4 Cálculo do Beckman Coulter Phi

Como anteriormente referido (Tabela 17), cerca de 18% dos homens com cancro da próstata, analisados neste estudo, possuíam um valor de PSA total ≤ 4 ng/mL, resultado este que coincide com vários estudos já efetuados, nomeadamente o de Thompson [103].

O Beckman Coulter Phi foi projetado para ajudar a identificar e a avaliar os utentes que manifestam maior risco de vir a contrair CP, sendo, assim, um índice que resulta da combinação de três testes sanguíneos automatizados, que avalia a probabilidade de um indivíduo ter CP detetado por biópsia. O BC Phi é um valor calculado a partir do PSA, PSA livre e pelo novo ensaio p2PSA, que mede a isoforma [-2] proPSA. É calculado com base na fórmula matemática [98]:

$$phi = \frac{[-2] \text{ proPSA}}{PSA \text{ livre}} \times \sqrt{PSA}$$

A Tabela 21 apresenta a relação do Phi com o risco de um homem vir a contrair CP.

Tabela 21.

Variação dos valores de Phi e o risco do indivíduo contrair CP [98].

Beckman Coulter <i>phi</i> Range (Hybritech Calibration of PSA, free PSA)	Prostate Cancer Risk Category	Probability of Cancer
0 – 20.9	Low	8.4%
21 – 39.9	Moderate	21.0%
40+	Significant	44.0%

O Phi facilita, consideravelmente, o diagnóstico, tanto em termos de sensibilidade (capacidade de deteção de cancro) como de especificidade (capacidade de evitar um resultado falso positivo). Além disso, ajuda na tomada de uma decisão ponderada e equilibrada do diagnóstico e na realização do pedido de biópsia.

No cálculo do Phi foram utilizados os indivíduos sujeitos a biópsia, com valores de PSA superiores a 2,0 ng/mL (Tabela 22).

Tabela 22.

Variação dos valores do Beckman Coulter Phi na subamostra com 25 indivíduos.

Biópsia positiva (B+); Biópsia negativa (B-).

Coeficiente BC Phi	Risco CP	Nº de casos	Nº de B+	Percentagem %	Nº de B-	Percentagem %
0-20,9	Baixo	11	2	18,18	9	81,82
21-39,9	Moderado	9	5	55,56	4	44,44
≥40	Significativo	5	4	80,00	1	20,00

Pela análise da Tabela 22 referente aos pacientes com biópsia positiva, pode-se observar que em relação ao valor de Phi houve mais pacientes que apresentaram risco moderado (5 doentes) do que risco significativo (4 doentes), embora a diferença não seja considerável.

Relativamente aos pacientes com biópsia negativa, na Tabela 23 é apresentado o diagnóstico associado, bem como a classificação do Phi e rácio.

Tabela 23.
Diagnóstico anátomo-patológico dos pacientes com biópsia negativa.

Doente	Phi	Rácio	Diagnóstico
1	Baixo	38,14	HBP
2		43,71	HBP
3		39,00	HBP de grande volume.
4		19,97	HBP e Prostatite
5		18,20	HBP de grande volume e Prostatite Crónica
6		29,96	HBP
7		19,40	HBP e Prostatite Crónica ligeira a moderada agudizada.
8		19,71	HBP e Prostatite Crónica ligeira a moderada agudizada.
9		16,36	HBP e Prostatite Crónica ligeira a moderada agudizada.
10	Moderado	7,65	HBP e Prostatite Crónica ligeira a moderada agudizada.
11		7,14	HBP e Prostatite Crónica ligeira a moderada agudizada.
12		14,16	HBP e Prostatite Crónica ligeira a moderada agudizada.
13		12,19	HBP e Prostatite Crónica ligeira a moderada agudizada.
14	Elevado	15,58	HBP e Prostatite Crónica ligeira a moderada agudizada.

Com base na Tabela 23, constata-se que o diagnóstico de Hiperplasia Benigna da Próstata e prostatite predomina entre os doentes com biópsia negativa. De assinalar que dos doentes com Phi baixo, cinco apresentavam um rácio < 20 (biópsia negativa), sendo explicado pelo fato destes sofrerem de prostatite, patologia que eleva os valores de PSA total e diminui a %PSA livre. Nos doentes com Phi moderado e elevado, verificou-se que todos possuíam rácio < 20 e HBP e Prostatite Crónica ligeira a moderada agudizada.

3.4.5 Teste ROC

A possibilidade de utilizar o novo marcador serológico [-2] proPSA como alternativa para diminuir o número de biópsias e falsos positivos no diagnóstico do CP foi analisada através do teste de ROC.

Num primeiro estudo, utilizou-se como amostra todos os pacientes submetidos a biópsias com PSA > 2,0 ng/mL (Figura 24).

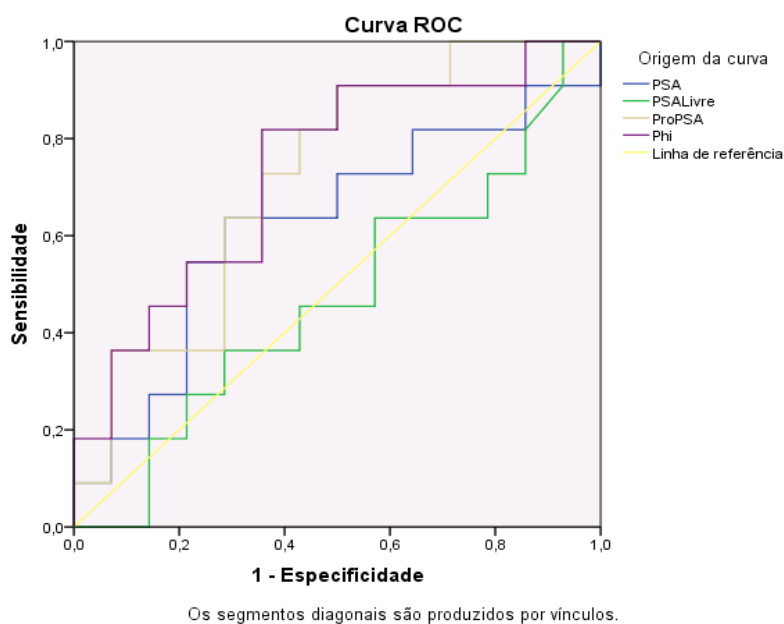


Figura 24.

Cálculo da curva ROC para os marcadores serológicos PSA, PSA livre, [-2] proPSA e Phi, utilizando a amostra dos 25 indivíduos submetidos a biópsia, com o programa SPSS.

Entre as isoformas do PSA Total, o [-2] proPSA obteve a maior área sob a curva (AUC) de 0,721 (sensibilidade de 90,9% e especificidade de 28,6%), sendo considerado como o melhor preditor e melhor marcador. Quando o PSA, o PSA Livre e o [-2] proPSA foram avaliados em conjunto para a determinação do Phi, pode-se verificar que tem um valor de AUC semelhante ao do [-2] proPSA, sendo um valor de discriminação significativo para o diagnóstico do cancro da próstata, ou seja, um bom preditor para o cancro da próstata. O pior preditor com valor de AUC significativo é o PSA, AUC=0,623 (Tabela 24).

Tabela 24.

Valores obtidos no cálculo da área sob a curva ROC para os marcadores serológicos (intervalo de PSA >2,0 ng/mL).

Variável(eis) de resultado de teste	Área	Intervalo de Confiança 95% Assintótico	
		Limite inferior	Limite superior
PSA	0,623	0,391	0,856
PSA Livre	0,471	0,237	0,705
[-2] proPSA	0,721	0,519	0,922
Phi	0,734	0,533	0,935

De acordo com os critérios de interpretação do teste de ROC, nenhuma das curvas é boa, pois os valores de AUC são inferiores ao intervalo ideal de 0,8 a 0,9. As variáveis [-2] proPSA e Phi têm curvas com características medianas (AUC de 0,7 a 0,8) e o PSA tem uma curva com características más (AUC de 0,6).

Na avaliação da sensibilidade e especificidade dos testes têm de ser consideradas as coordenadas da curva de modo a comparar diferentes pontos de corte (cut-off) (Anexo N° 5).

Para o ponto de corte (cut-off) do [-2] proPSA (teste positivo se o valor de [-2] proPSA for maior que 5,105) a sensibilidade do marcador é de 90%, significando que em apenas 10% dos casos há a possibilidade de se detetar falsos negativos, ou seja, do paciente ser considerado erroneamente como não sendo CP doente (valores de cut-off inferiores a 5,1). No entanto, a especificidade do [-2] proPSA é inferior, existindo apenas 28,6% de hipóteses de ser diagnosticado um indivíduo como não doente, pelo que, esta situação implica a existência de uma probabilidade de, em 71,4% de casos, os indivíduos serem falsos positivos.

Na gama de valores de PSA total de 2,0 a 10,0 ng/mL, o [-2] proPSA é, novamente, a isoforma do PSA que apresenta maior AUC de 0,758 (Figura 25 e Tabela 25).

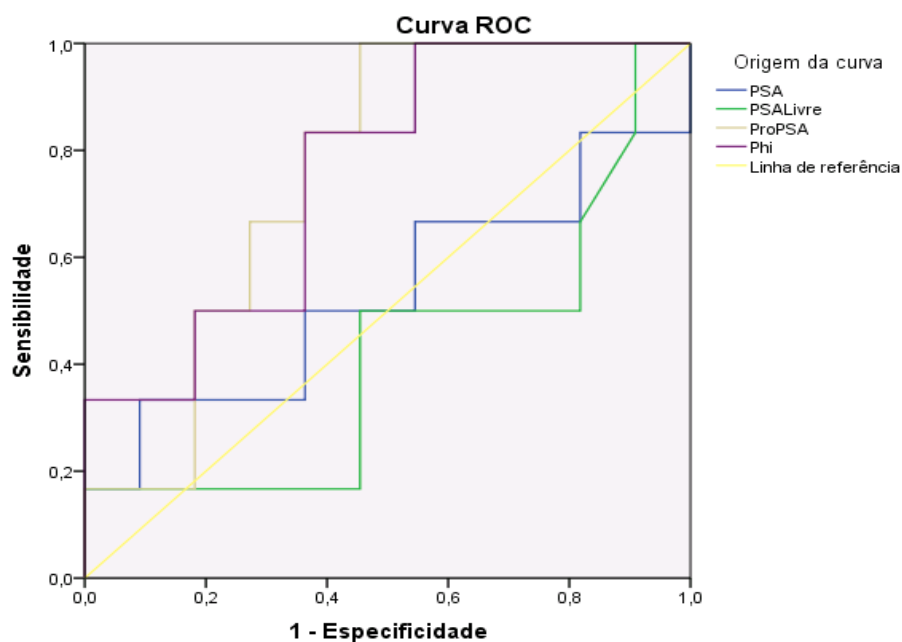


Figura 25.

Cálculo da curva ROC para os marcadores serológicos (intervalo de PSA 2,0 a 10,0 ng/mL), utilizando o programa SPSS.

De acordo com o já referido, na análise do PSA, PSA livre e [-2] proPSA em conjunto com a determinação do Phi observa-se que os valores de AUC do [-2] proPSA e Phi são similares, o que faz destes marcadores os melhores preditores. O PSA, por possuir um valor de AUC considerado como baixo (AUC 0,53), é pior preditor do que o [-2] proPSA, apresentando o PSA livre o valor de AUC mais baixo de todos, sendo assim o PSA livre é o preditor que permite obter piores resultados no diagnóstico do CP.

Tabela 25.

Valores obtidos no cálculo da área sob a curva ROC para os marcadores serológicos (intervalo de PSA 2,0 a 10,0ng/mL).

Variável(eis) de resultado de teste	Área	Intervalo de Confiança 95% Assintótico	
		Limite inferior	Limite superior
PSA	0,530	0,209	0,852
PSA Livre	0,417	0,109	0,724
[-2] proPSA	0,758	0,528	0,988
Phi	0,758	0,522	0,993

3.5 Classificação de Gleason

A classificação de Gleason avalia o estado de diferenciação glandular, bem como o crescimento do tumor em relação ao estroma prostático. Quanto menor o seu valor, melhor o prognóstico do paciente [89,90].

No grupo dos indivíduos com a doença, 63,6% dos homens apresentavam uma classificação de Gleason superior a sete e 36,36% inferior a sete (Tabela 26), pelo que a maior parte já apresentavam um tumor menos diferenciado, logo mais agressivo.

Tabela 26.

Classificação de Gleason dos doentes com patologia da próstata.

Classificação de Gleason	Número de doentes	Percentagem (%)
<7	4	36,36
>7	7	63,64

4. Discussão

O cancro da próstata é uma das principais causas de morte na população do sexo masculino, prevendo-se um aumento progressivo da mortalidade devido a este cancro [19,22]. Assim, um diagnóstico precoce é imprescindível para melhorar a esperança de vida destes indivíduos, pela diminuição da morbilidade e da mortalidade [66].

Desde de 1990, a descoberta da presença do PSA no soro, tanto na forma livre como na forma ligada a inibidores de proteases, particularmente a alfa-1-antiquimiotripsina e as suas diferentes proporções no soro de indivíduos com e sem cancro da próstata, originou o desenvolvimento de estudos e ensaios, com o objetivo de melhorar a especificidade do diagnóstico do CP com os marcadores tumorais [48, 49].

Este estudo foi realizado com o propósito de caracterizar a amostra populacional sujeita a análises de marcadores tumorais para o CP e estudar a incidência e prevalência do CP na RAM, bem como avaliar a eficácia dos marcadores no diagnóstico da doença, estimando-se o grau de concordância entre os marcadores e as biópsias realizadas.

Os resultados obtidos mostram que a idade média dos indivíduos que realizaram biópsia à próstata situa-se nos setenta e um anos, sendo que 56% destas são negativas. Comparando a idade dos indivíduos do estudo com as biópsias realizadas, verificou-se que a maior percentagem de CP depara-se na faixa etária acima dos setenta anos. No que respeita à relação do valor de PSA e a patologia associada, verificou-se que dos indivíduos com CP, 18,18% apresentavam um valor de PSA total inferior a 4,0 ng/ml, o que significa que, na ausência de biópsia à próstata, a doença nestes indivíduos passava despercebida ao rastreio por PSA. 50% dos indivíduos com PSA < 4,0 ng/ml apresentavam CP, um valor considerado elevado, não espetável, visto que, valores inferiores a este cut off são considerados normais. Neste estudo foi possível confirmar que quanto mais elevado é o valor de PSA total maior, também, são as percentagens de biópsias positivas. Para valores de PSA > 10,0 ng/ml, 67% dos indivíduos apresentaram CP. Indivíduos com valores de PSA total localizados na dita zona cinzenta (4,0 a 10,0 ng/ml) registaram uma menor percentagem de CP (25%), contrariamente ao que seria de esperar.

Os resultados do estudo assemelham-se aos obtidos por Thompson et al. (2005) [117] pois estes demonstram uma relevância de cancro mais elevada entre dois mil novecentos e cinquenta indivíduos aparentemente saudáveis [117]. Todos os homens tinham níveis de PSA < 3,0 ng/ml no início do estudo e no final, após sete anos, todos também possuíam níveis de PSA < 4,0 ng/ml. Os indivíduos com PSA < 0,5 ng/ml (0,6%)

tinham CP e 26,9% dos indivíduos com níveis de PSA compreendidos de 3,1 a 4,0 ng/ml também tinham a patologia [117]. Assim, destes indivíduos cujo valor de PSA era considerado como um valor normal, 15%, apresentavam doença. Estas situações apresentam um paradoxo difícil. Uma proporção significativa de homens com um pequeno foco de doença latente está destinada a nunca desenvolver um estado clinicamente significativo. O uso do PSA no rastreio pode ser responsável por um possível sobrediagnóstico da patologia (capacidade do teste de rastreio identificar uma situação patológica).

Relacionado a esta sobredeteção encontra-se um tratamento, quer de cirurgia, quer de radioterapia, quer outros, que em alguns casos é responsável por uma deterioração significativa e desnecessária da qualidade de vida dos indivíduos [117]. Draisma et. al (2003) estimaram que aos 55 anos o teste do PSA resulta numa taxa de sobrediagnóstico de 27%, sendo que com o aumento da idade essa taxa sobe para os 56% [117]. Fatores como o stress do diagnóstico, nunca podem ser colocados de parte, pois a maior parte da morbidade associada ao PSA está relacionada com os tratamentos que atualmente são propostos aos doentes. Os homens com patologia num estado mais avançado aumentam a probabilidade de complicações associadas ao tratamento (incontinência urinária, disfunção erétil, ansiedade) [117].

O centro Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer realizou um ensaio nos Estados Unidos da América (EUA), no qual ficou determinado o efeito do rastreio anual do PSA na redução da mortalidade por CP [117]. O estudo incluía setecentos e sessenta e seis mil novecentos e trinta e um (766931) indivíduos de dez centros de controlo diferentes no período de 1993 a 2001. A população foi dividida em dois grupos: um fazia o controlo com o PSA e o outro não. No final, não houve diferenças significativas na redução da mortalidade específica por cancro entre os dois grupos de estudo [117].

A European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer realizou um estudo que vem contradizer o anterior. Este estudo incluiu 162243 indivíduos de sete países diferentes, num período de nove anos. O grupo em que o rastreio foi feito com o PSA foram detetados cerca do dobro de casos da patologia. Do grupo que não fez rastreio com o PSA faleceram trezentos e vinte e seis indivíduos com CP e duzentos e catorze do grupo que fez rastreio [117]. Douglas et al. (2005) verificaram que houve alterações na prática da biópsia da próstata, em termos de técnica e de tecnologia, o que leva a alterações do valor preditivo do PSA em relação ao CP. Nos anos 90, a correlação entre

o PSA e o diagnóstico de cancro por biópsia era realizada de uma maneira diferente da atual, pelo que essa correlação já não existe [117].

No estudo de Douglas et. al (2005) constata-se que a taxa de biópsias positivas e níveis de PSA <4,0ng/ml igualavam ou ultrapassavam os resultados positivos em indivíduos com níveis mais elevados de PSA. Ora os resultados obtidos no presente estudo, relativo ao Hospital Dr. Nélio Mendonça, em indivíduos com PSA <4,0ng/ml também apresentam uma percentagem de CP superior à dos indivíduos com valores de PSA na zona cinzenta (4,0 a 10,0ng/ml).

Segundo estes estudos, o PSA já não se correlaciona da mesma maneira com as biópsias positivas como já acontecia no passado. Visando aumentar a especificidade da análise, várias investigações foram feitas com base nas diferentes isoformas do PSA [117]. O doseamento do PSA livre surge como o segundo marcador mais estudado para a deteção de CP. A %PSA livre é menor em indivíduos com CP por razões ainda não encontradas [117]. Neste estudo e nesta população em específico, verifica-se que existe uma relação entre o diagnóstico do CP e o valor de PSA livre. Dos indivíduos diagnosticados com CP, mais de metade (72,73%) aponta %PSA livre <20, pelo que, antes da realização da biópsia, permitiria prever o cenário de patologia como provável. Verifica-se que cerca de 27,27% dos indivíduos com patologia, apresentava uma %PSA livre >20, o que seria de esperar, visto que com o aumento da %PSA livre, decresce o número de doentes por CP. O uso do PSA livre é cada vez maior, pois aumenta a especificidade do PSA total no diagnóstico de CP. Estudos recentes vêm comprovar que o valor da %PSA livre reduz a taxa de biópsias desnecessárias em 47%, em indivíduos com PSA >4,0ng/ml. Em média, o uso da %PSA livre, elimina de 20 a 40% de biópsias desnecessárias, aumentando assim a especificidade do PSA. O uso do PSA livre é viável para aumentar a acuidade diagnóstica do PSA total [117].

Considerando a amostra inicial, verifica-se que a maior parte (79,39%) dos pedidos de análise de marcadores serológicos tiveram origem em Centros de Saúde, seguidos pelos da Consulta Externa (10,23%) e pelos serviços de Medicina (1,02%) e Urologia (0,53%) do Hospital Dr. Nélio Mendonça. Poder-se-á inferir que a elevada percentagem de pedidos que provieram dos Centros de Saúde têm origem em análises pedidas em consultas de rotina, uma dedução que pode ser evidenciada pela elevada percentagem de pedidos com esta descrição (39,08%), e por seguimento posterior do paciente com

suspeita de CP. Esta última situação é corroborada pela elevada percentagem (a maior – 60%) de pedidos de biópsia provenientes destes espaços.

O facto de haver uma grande percentagem de análises de rotina permite-nos deduzir a opção correta dos clínicos, pois como anteriormente referido o diagnóstico precoce da patologia é a melhor forma de incrementar a qualidade de vida de um paciente afetado por CP ou mesmo por outra patologia [66].

Relativamente à origem geográfica dos pedidos, foi um dos concelhos mais pequenos da RAM em termos demográficos (Santana), que apresentou, percentualmente, a maior quantidade de pedidos, relativos à população masculina existente nesse concelho. Novamente, esta elevada quantidade de pedidos poderá estar relacionada com análises rotineiras, uma vez que, de entre os novecentos e vinte e seis pedidos, foi apenas um indivíduo com suspeita de CP submetidos a biópsia, verificando-se ser um caso negativo.

Uma vez que os níveis de PSA aumentam com a idade, devido ao aumento do tamanho da próstata [51,66], é importante efetuar uma distinção entre grupos etários, assim, ao agrupar os indivíduos submetidos a análises de marcadores serológicos de acordo com as recomendações da OMS, verifica-se que a quantidade de pedidos para análise de PSA mantém-se relativamente constante ao longo das quatro faixas etárias consideradas (<50, ≥50 e <60, ≥60 e <70 e ≥70 anos). Da mesma forma, era expectável um aumento dos pedidos de biópsias ao longo das faixas etárias recomendadas pela OMS, tal como se veio a confirmar. O facto de haver uma ligeira diminuição na percentagem de casos positivos no grupo etário mais elevado possivelmente poderá denotar que houve um maior cuidado em detetar a patologia no seu estado inicial ou poderá ainda resultar das alterações a nível do ambiente e do estilo de vida.

Saliente-se que esses fatores podem ser os responsáveis pelo surgimento cada vez mais precoce do CP [36,37,38].

As várias formas truncadas e de comprimento completo do proPSA [-2], [-4], [-5], [-7], bem como a soma destas formas, têm vindo a ser utilizadas para a deteção e o diagnóstico do cancro da próstata, sendo que no geral, a forma [-2] proPSA demonstra um maior valor. O [-2] proPSA é o candidato mais promissor na busca de marcador serológico com maior especificidade e sensibilidade no diagnóstico desta patologia [104,105,106,107,108]. Num estudo de Catalona et.al (2004) [106], que envolveu mil e noventa e um homens, determinou-se que o [-2] proPSA foi o marcador com maior especificidade na deteção do cancro da próstata [106]. A percentagem de deteção da

patologia e os valores de score de Gleason maior ou igual a sete aumentam com o aumento dos níveis de [-2] proPSA, sugerindo-se assim, que o marcador pode melhorar de forma significativa o diagnóstico clínico do cancro [106]. Em 2010, Sokol et.al (2008) [105], conduziram um estudo de validação, patrocinado pelo Instituto Nacional de Cancro, que avaliou a especificidade e sensibilidade do PSA, PSA Livre e [-2] proPSA, usando para esse, amostras de soro de cento e vinte e três homens. Os autores comprovaram que o [-2] proPSA foi o preditor mais preciso para o cancro da próstata, especialmente em indivíduos com teores de PSA no intervalo de [2,0-10,0 ng/mL] [105]. O presente estudo, vem corroborar essa constatação contudo, não é possível efetuar comparação de valores, uma vez que o estudo de Sokol et.al (2008) [105], fundamentou-se num número muito superior de amostras.

Esta pesquisa adiciona informação sobre a utilidade clínica do [-2] proPSA como um marcador de cancro da próstata, em virtude de ser a primeira avaliação da sua potencial utilidade na triagem da população e por fornecer comparações da sua eficácia com a do PSA total e livre.

Embora estudos anteriores mostrem a potencial utilidade clínica do [-2] proPSA a partir de amostras armazenadas, até ao momento nenhum avaliou a variação do [-2] proPSA, numa amostra que resulte da prática clínica real. Refira-se que os estudos prospetivos são vantajosos na avaliação de marcadores tumorais, minimizando a inviabilidade de dados, o armazenamento das amostras e a interpretação dos dados [109,110]. No que diz respeito à generalização de resultados, a distribuição de PSA e de biópsias realizadas são equiparados a outros estudos já feitos. A taxa global de deteção de cancro da próstata em 45,4% na população, com níveis de PSA entre [2,0-10,0 ng/mL] é consistente com a literatura [111,112,113].

A proporção de 40% dos cancros com score de Gleason maior ou igual a sete também é comparável com outros estudos [105,106,114]. Apesar do pequeno número de indivíduos utilizados, os dados a nível da população são representativos de homens submetidos a rastreio de cancro da próstata.

Os resultados confirmam que a utilização dos valores do PSA livre juntamente com o [-2] proPSA podem melhorar significativamente a precisão global do diagnóstico em indivíduos, com uma concentração de PSA total de [2,0-10,0 ng/mL] [105,106,108,115].

Apesar dos valores de PSA total dos indivíduos serem similares, o uso do [-2] proPSA permitiu discriminá-los entre indivíduos com cancro da próstata e sem cancro, sendo esta distinção confirmada por biópsia.

A combinação do PSA livre e [-2] proPSA poderá levar a uma maior discriminação entre casos benignos e o cancro do que em qualquer um dos outros parâmetros. Neste âmbito, constata-se que o Phi pode ser utilizado para avaliar o risco de forma mais precisa para uma biópsia positiva. O Phi é um índice matemático que quando combinado com o PSA total, livre e [-2] proPSA nos dá maior precisão a nível do diagnóstico, com vantagem de ser adequado no diagnóstico individual dos testes. Devido ao baixo número de amostras recolhidas de indivíduos com biópsia da próstata e as limitações no número de análises de [-2] proPSA disponíveis (máximo), estes resultados, apesar de promissores, exigem validação com a utilização de um número superior de indivíduos. Neste estudo é digno de registo o caso excepcional de dois homens com valores de PSA total inferior a 4,0 ng/mL, com idade superior a setenta anos, com biópsia realizada, após várias queixas (com um valor de Phi calculado posteriormente e considerado um valor de risco moderado), onde se confirmou cancro da próstata, quando todos os demais marcadores indicavam a ausência de patologia. Uma vez que na avaliação da sensibilidade e especificidade dos marcadores serológicos foram utilizadas amostras de indivíduos que realizaram biópsia com valores de PSA total superiores a 4,0 ng/mL, alguns pacientes podem ter sido aconselhados pelo seu médico à não realização imediata da biópsia visto não haver dados que levassem à manifestação da doença, podendo estes casos afetar os resultados do estudo.

Na análise ROC, os valores de AUC foram maiores e mais robustos para o [-2] proPSA em relação ao PSA total e PSA livre, sugerindo que este marcador pode ser útil para melhorar o diagnóstico, reduzindo a morbilidade e os custos relacionados com a realização de biópsias à próstata consideradas desnecessárias. Neste estudo, o [-2] proPSA foi a isoforma do PSA com maior apresentação, com melhor utilização a nível de diagnóstico na gama de [4,0-10 ng/mL] e de [2,0-10 ng/mL]. Em valores de PSA no intervalo de [4,0-10 ng/mL], a área sob a curva ROC do [-2] proPSA foi de 0,734, em comparação com o PSA que foi de 0,623, com uma sensibilidade de 90,9% e uma especificidade de 28,6%. Num rastreio com homens cujos níveis de PSA encontravam-se na gama dos [4,0-10 ng/mL] foi obtida uma curva AUC de 0,69 para o [-2] proPSA, com

sensibilidade de 95% e especificidade de 19%, o que foi superior a todas a outras formas de PSA [85].

Mais estudos são necessários para validar o uso do [-2] proPSA e quaisquer outros índices associados como ferramentas de triagem e definição dos valores de corte clínicos (cut-off). Neste sentido a United States Food and Drug, está a desenvolver um estudo com o objetivo de aprovar o [-2] proPSA como auxiliar na deteção precoce do cancro da próstata.

Conclusão

Pela análise dos dados obtidos, verifica-se que existe uma grande preocupação por parte dos clínicos em efetuar uma deteção precoce do Cancro da Próstata, visível no elevado número de pedidos de análise a marcadores serológicos, comparativamente à quantidade de biópsias efetuadas.

A percentagem de doentes assistidos no Hospital Dr. Nélio Mendonça com CP diagnosticados por biópsia não é muito elevada para níveis de PSA total $<4,0\text{ng/ml}$ (dois casos).

A %PSA livre representa uma ferramenta muito útil no que concerne ao aumento da sensibilidade e especificidade do PSA. Nos doentes estudados, observou-se uma relação entre os valores baixos de PSA livre e CP.

Embora atualmente persista alguma controvérsia nas linhas de orientação, compete ao médico adotar a melhor forma de em cada caso informar o doente do seu estado clínico. Compete-lhe por um lado aconselhar e encorajar o doente e por outro lado informar-lhe da patologia, para que em equipa possam estabelecer a melhor forma de combate-la.

A maior percentagem de CP confirmado foi encontrada na faixa etária maior ou igual a setenta anos. O uso de [-2] proPSA em combinação com PSA total e PSA livre, com cálculo do índice matemático Phi, proporciona uma maior eficácia na discriminação entre a doença benigna e a patológica, em homens com níveis de PSA total entre os $[2,0-10,0\text{ ng/ml}]$. Contudo, estudos de validação são necessários para determinar a incorporação deste marcador na prática clínica.

Bibliografia

1. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. Philadelphia PA19106, 1996. P.326.
2. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. Rio de Janeiro. Inca, 2011. ISBN 978-85-7318-187-6.p.17.
3. Daikos GK. History of Medicine: Our Hippocratic Heritage. International Journal of Antimicrobial Agents. Volume 29, Issue 6, June 2007, P. 617-619.
4. Silva JRF. Perfil Transcriptômico e Genético do Cancro da Próstata: avaliação da expressão dos genes *psa*, *PCA3*, *AMACR*, *TFF3*, *SERPINB5*, *GOLM1* e *ERG* e do polimorfismo *NBN-8360G>C* no desenvolvimento da doença. Dissertação de Mestrado em Oncologia. 2010. P.4-5.
5. Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Richard CL, William MG. An Introduction to Genetic Analysis. New York: W H Freeman 2000. Chapter 22. Cancer as a Genetic Disease.
6. Watson J. Molecular Biology of the Gene. The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1987.Inc. Part 3: expression of the genome.
7. Brennan P. Gene-environment interaction and etiology of cancer: what does it mean and how can we measure it? Carcinogenesis. 2002. 23(3): 381-7.
8. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. 2000. Cell. 100(1): 57-70.
9. Dalmaso P, Pastore G, et al., Temporal trends in the incidence of childhood leukemia, lymphomas and solid tumors in north-west Italy. A report of the Childhood Cancer Registry of Piedmont. Haematologica. 2005. 90 (9): 1197-204.
10. Agha M, Dimonte B, Greenberg M, Greenberg C. et al., Incidence trends and projections for childhood cancer in Ontario. 2005 *Int J Cancer*.
11. Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, et al., Cancer statistics, 2005. CA Cancer J Clin 55 (1): 10-30. PMID 15661684
12. DN Portugal. Mortes por cancro aumentarão 34% em Portugal até 2030, disponível em <http://www.dn.pt> (acedido em Março de 2012).
13. Zambrano GT, Galán ML, Mateo CP, et al., Preliminary data of the Spanish contribution to the European Randomized Study on Screening of Prostate Cancer (ERSPC). Arch Esp Urol 2007;60:737-43.
14. Bryant RJ, Hamdy FC. Screening for prostate cancer: an update. European Urology. j.eururo.2007.08.034.
15. Jornal Público. Mortes por cancro aumentam todos os dias em Portugal, disponível em <http://www.publico.pt> (acedido em Março de 2012).

16. Plano de Saúde. Secretaria Regional dos Assuntos Sociais. Região Autónoma Da Madeira. Funchal, 2003. P 34-46.
17. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al., Global cancer statistics, 2002. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2005, 55(2): 74-108.
18. Hsing AW, Chokkalingam AP. Prostate cancer epidemiology. Front Biosci. 2006, 11: 1388-413.
19. Matsuda T, Saika K. Comparison of time trends in prostate cancer incidence (1973-1997) in East Asia, Europe and USA, from Cancer Incidence in Five Continents. Vols IV- VIII. J. Clin. Oncol. 2007, 37(7): 556-7.
20. Baade PD, Coory MD, Aitken F. International trends in prostate-cancer mortality: the decrease is continuing and spreading. Cancer Causes Control. 2004, 15(3): 237-41.
21. Globocan 2008 (Março de 2008). Cancer Incidence Mortality and Prevalence Worldwide in 2008. World Health Organization, disponível em <http://globocan.iarc.fr> (acedido em Março de 2012).
22. Bracarda S, Decobelli O, Greco C, Prayer-Galetti, T, Gatta G, deBraud F, Bartsch G, Cancer of the prostate. Crit Rev Oncol Hematol. 2005, 56(3): 379-96.
23. Carvalho MRDL. Estudo de STR de aplicação forense na etiologia do Cancro da Próstata. Dissertação realizada no âmbito do Mestrado em Ciências Forenses. Universidade do Porto. P.12-19.
24. Associação Portuguesa de Oncologia (SPO) e Urologia (APU). Livro Cancro da Próstata -tudo o que precisa saber, disponível em www.sponcologia.pt e em www.apurologia.pt) (acedido em Março de 2013)
25. Rosenberg JE, Kantoff PW, Prostate Cancer. ACP Medicine. 2011. P. 1-16.
26. McPhee SJ, Lingappa VR, Ganong WF, Lange JD, Pathophysiology of disease. An introduction to clinical medicine. Stamford. Connecticut, 1997; 542-559.
27. Instituto da Próstata e incontinência Urinária de Lisboa e Évora. Inovação e Qualidade no tratamento das doenças da Próstata e Incontinência Urinária, disponível em <http://www.institutodaprostata.com> (acedido em Fevereiro de 2013).
28. Greene DR. Urologic Ultrasonography. 1992. Campell's Urology.
29. Johansson JE, Andren O, Andersson SO et al. Natural history of early, localized prostate cancer. JAMA. 2004, 291(22): 2713-9.
30. Foster CS, Ke Y. Stem cells in prostatic epithelia. Rev Int J.Pathol. 1997; 78:311-329.
31. Barrios CH. Cancer de prostata. In: Murad A.M.& Katz, A. Oncologia: bases clínicas do tratamento. Rio de janeiro: Guanabara Koogan S.A.1996, 435.

32. Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992, 89:3367-3371.
33. Aus G, Abbou CC, Pacik D, Schmid HP, Van Poppel H, Wolff JM, et al. EAU Guidelines on Prostate Cancer. *Eur Urol* 2001; 40:97-101.
34. Gronberg H, Damber L, Damber JE, Familial prostate cancer in Sweden. A nationwide register cohort study. *Cancer* 1996; 77:138-143.
35. Eric A, Klein MD. Course 79 IC: Prostate Cancer – Prevention and Genetics. 2006.
36. Hsing AW, Chokkalingam AP. Prostate cancer epidemiology. *Front Biosci*. 2006, 11: 1388-413.
37. Cook LS, Goldoft M, Schwartz SM, et al. Incidence of adenocarcinoma of the prostate in Asian immigrants to the United States and their descendants. *J Urol*. 1999, 161(1): 152-5.
38. McCracken M, Olsen M, Chen MS Jr, et al. Cancer incidence, mortality, and associated risk factors among Asian Americans of Chinese, Filipino, Vietnamese, Korean, and Japanese ethnicities. *CA Cancer J Clin*. 2007 57(4): 190-205.
39. Whittemore AS, Lele C, Friedman GD, Stamey T, Vogelman JH, Orentreich N. Prostate-specific antigen as predictor of prostate cancer in blackmen and whitemen. *J. National of Cancer Institute*. 1995, 87: 354-360.
40. Fradet Y, Meyer F, Bairati I, et al. Dietary fat and prostate cancer progression and survival. *Eur Urol*. 1999, 35(5-6): 388-91.
41. Hong JH, Ahn KS Bae E. et al. The effects of curcumin on the invasiveness of prostate cancer in vitro and in vivo. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2006, 9(2): 147-52.
42. Kolonel LN. Fat, meat, and prostate cancer. *Epidemiology Rev*. 2001, 23(1): 72-81.
43. Filella X, Molina R, Ballesta AM. Utilidad clínica del PSA. *Roche Diagnostocs S. L*. 2000, 5-35.
44. Cramer SD, Bao-Li C, Rao A, et al. Association between genetic polymorphisms in the prostate-specific antigen gene promoter and serum prostate-specific antigen levels. *J. National of Cancer Institute*. 2003, 95:1044-1053.
45. Nelson KA, Witte JS. Androgen receptor CAG repeats and prostate cancer. *Am Journal Epidemiology*. 2002, 155:883-890.
46. Gutman AB, Gutman, EB, An acid phosphatase occurring in serum of patients with metcinoma of prostate glan. *J Clin Invest*. 1938, 17:173-478.
47. Andriole GL, Catalona WJ. The diagnosis and treatment of prostate cancer. *Ann. Rev. Med*. 1991, 42:9-15.

48. Klotz L, Teahan S. Current Role of PSA Kinetics in the Management of Patients with Prostate Cancer. *European urology supplements*. 2006, 5: 472-478.
49. Carter HB, Pearson DJ, Matter JE, Brant L,J, Chan DW, Andres R, Fozard JL, Walsh PC. Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease. *Jama*. 1992, 267: 2215-2220.
50. Gomes R, Rebello L, Araújo FC, et al. A prevenção do câncer de próstata: uma revisão da literatura. *Rev CS Col*. 2008, 13:235– 46.
51. Vaughan ED, Schlegel PN, Perlmutter AP. Clinician’s Manual on Prostate-Specific Antigen (PSA). *Science Press*, 1998, 13-26.
52. Lilja H. A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. *J. Clin Invest*. 1985, 76: 1899-903.
53. Louro N, Borges R, Massó P, Silva et al. Avaliação comparativa dos valores de PSA total, PSA livre/PSA total e PSA complexado na deteção do cancro da próstata. *Ata Urológica*, 2007, 24 (1): 39-44.
54. Sensabaugh GH. Isolation and characterization of a semen-specific protein from seminal plasma: a potencial new marker for serum identification. *Journal of Forensic Science*. 1978, 23: 106-115.
55. Nash AF, Melezinek I. The role of prostate specific antigen measurement in the detection and manegement of prostate cancer. *Endocrine-Related cancer*. 2000, 7:37-51.
56. Eastham JA. Prostate-specific antigen doubling time as a prognostic marker in prostate cancer. *Nat Clin Pract Urol*. 2005, 2:482-91.
57. Ambruster DA. Prostate-specific antigen: biochemistry, analytical methods, and clínical application. *Clin Chem*. 1993, 39:191-95.
58. Oesterling JE. Prostate specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate. *J Urol*. 1991, 145:907-23.
59. Vihko P, Kurkela R, Ramberg J, Pelkonen I, Vihko R. Time-resolved immunofluorometric assay of human prostate specific antigen. *Clin Chem*. 1990, 36:92-95.
60. Benson MC, Ring KS, Olsson CA, et al. Determination of stage D-0 carcinoma of the prostate using PSA density. *Urologist’s Correspondence club*. September. 1989, 24.
61. Christensson A, Bjork T, Nilsson O, Dahlen U, Matikainen MT, Cockett ATK, et al. Serum prostate antigen complexed to alpha 1 antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. *J Urol*. 1993, 150: 100–105.

62. Lilja H. et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines (LMPG): Practice Guidelines and Recommendations for Use of Tumor Markers in the Clinic, Prostate Cancer (Section B). National Academy of Clinical Biochemistry. 2006.
63. 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, 51: 222–226.
64. Christenson A, Bjork T, Nilsson O, et al. Serum prostate specific antigen complexed to alpha-antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. *J Urol.* 1993, 150: 100-5.
65. Piironen T, Pettersson K, Suonpaa M, Stenman UH, Oesterling JE, Lovgren T, Lilja H. In vitro stability of free prostate-specific antigen and prostate-specific antigen complexed to alpha 1-antichymotrypsin in blood samples. *Urology.* 1996, 48 – 6 A Suppl: 81-7.
66. Grillo MC, Oliveira MA, Rosa AF, Sousa NM. Papel do antígeno específico da próstata no rastreio do carcinoma da próstata. *Acta Urológica.* 2004, 21: 27-33.
67. Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Dodds K,M, Coplen DE, et al. Measurement of prostate specific antigen in sérum as a screening test for prostate cancer. *New England Journal of Medicine.* 1991, 324: 1156-1161.
68. Peter J, Unverzagt C, Krogh TN, Vorm O, Hoesel W. Identification of precursor forms of free prostate-specific antigen in serum of prostate cancer patients by immunosorption and mass spectrometry. *Cancer Res.* 2001, 61:957-62.
69. Catalona WJ, Smith DS, Wolfert RL, et al. Evaluation of percentage of free serum prostate-specific antigen to improve specificity of prostate cancer screening. *JAMA.* 1995, 274: 1214-20.
70. Chan TY, Mikolajczyk SD, Lecksell K, et al. Immunohistochemical staining of prostate cancer with monoclonal antibodies to the precursor of prostate-specific antigen. *Urology .* 2003, 62: 177-81.
71. De Vries SH, Raaijmakers R, Blijenberg BG, et al. Additional use of [-2] precursor prostate-specific antigen and "benign" PSA at diagnosis in screen-detected prostate cancer. *Urology.* 2005, 65: 926-930.
72. Mikolajczyk SD, Milllear LS, Wang TJ, et al. “BPSA”, A specific molecular form of free prostate-specific antigen, is found predominantly in the transition zone of patients with nodular benign prostatic hyperplasia. *Urology.* 2000, 55:41-5.

73. Benson MC, Whang IS, Pantuck A, et al. Prostate specific antigen density: a means of distinguishing benign prostetic hypertrophy and prostate cancer. *J. Urol.* 1992, 147:815-6.
74. Xu J, Meyers DA, Sterling DA, Zheng SL, Catalona WJ, Cramer SD, Bleecker ER, Ohar J. Association studies of serum prostate-specific antigen genes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002, 11: 644-669.
75. Stamey TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE, Freiha FS, Redwine E. Prostate specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *New England Journal of Medicine*, 1987, 317: 909-916.
76. Stamey TA, Freiha FS, McNeal JE, Redwine EA, Whittemore AS. Localised prostate cancer. Relationship of Tumor volume to clinical significance for treatment of prostate cancer. *Cancer.* 71:933.
77. Jacobsen SJ, Katusic SK, Bergstrahl EJ. Incidence of prostate cancer diagnosis in the eras before and after serum prostate-specific antigen testing. *J Am Med Assoc.* 1995, 274:14445-9.
78. Chodak GW, Thisted RA, Gerber GS, et al. Results of conservative management of clinically localized prostate cancer. *N Engl J Med.* 1994, 330: 242-8.
79. Johansson JE, Andren O, Andersson SO, et al. Natural history of early, localized prostate cancer. *JAMA.* 2004, 291: 2713-9.
80. Lopes C, Campos C, Brito MJ. “Cancro da próstata” Problemas do diagnóstico em biópsias e em peças de prostatectomia: Resultados, certezas e dúvidas. *Carcinoma da Próstata – Perspectiva Actual.* 2000.
81. Byar DP, Mostofi FK. Carcinoma of the prostate: prognostic evaluation of certain pathologic features in 208 radical prostatectomies. Examined by the step-section technique. *Cancer.* 1972, 30: 5-13.
82. Miller GJ, Cygan JM. Morphology of prostate cancer: the effects of multifocality on histological grade, tumor volume and capsule penetración. *J Urol.* 1994, 152: 1709-13.
83. Miller GJ, Torkko KC. Natural history of prostate cancer-epidemiologic considerations. *Epidemiol Rev.* 2001, 23: 14-8.
84. Catalona WJ, Southwick PC, Slawin KM, et al. Comparison of percent free PSA, PSA density, and age-specific PSA cutoffs for prostate cancer detection and staging. *Urology.* 2000, 56: 255-60.
85. Mikolajczyk SD, Catalona WJ, Evans CL, et al. Proenzyme forms of prostate specific antigen in serum improve the detection of prostate cancer. *Clin Chem.* 2004, 50: 1017-1025.

86. Kato RB, Srougi V, Salvadori FA, et al. Pretreatment tumor volume estimation based on total serum psa in patients with localized prostate cancer. *Clinics (Sao Paulo)*. 2008, 63: 759-62.
87. Partin AW, Yoo J, Carter HB, et al. The use of prostate specific antigen, clinical stage and Gleason score to predict pathological stage in men with localized prostate cancer. *Journal of Urology*. 1993, 150:110-4.
88. Rees MA, McHugh TA, Dorr RP, et al. Assessment of the utility of bone scan, C.T., scan and lymph node dissection in staging of patients with newly diagnosed prostate cancer. *J Urol*. 1995, 153:352A.
89. Gleason DF. The Veteran's Administration Cooperative Urologic Research Group: histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma. In Tannenbaum M (ed.) *Urologic Pathology: The Prostate*. Lea and Febiger, Philadelphia. 1977, 171-198.
90. Humphrey PA. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod Pathol*. 2004, 17: 292-306.
91. Filella X, Alcover J, Molina R, et al. Clinical evaluation of Fpsa /PSA rácio in the diagnosis of prostate cancer. *Eur J Cancer*. 1977, 33: 1226-9.
92. Greene DR. *Urologic Ultrasonography*. Campell's Urology. 1992.
93. Carter HB, Piantadosi S, Isaacs JT. Clinical evidence for and implications of the multistep development of prostate cancer. *J Urol*. 1990, 143: 742-6.
94. Xavier F, Rafael M, Antonio M, Servicio de Bioquímica Clínica, Unidad de Estudio del Cáncer, Hospital Clínico de Barcelona. Utilidad clínica del PSA. Roche Diagnostics.
95. Xavier F, Rafael M, Antonio M, Servicio de Bioquímica Clínica, Centro de Diagnóstico Biomédico, Hospital Clínico de Barcelona, Marcadores tumorales, Estado actual y perspectivas de futuro II, Roche Diagnostics.
96. Kricka LJ. Chemiluminescent and bioluminescent techniques. *Clin Chem*. 1991, 37:1472-1481.
97. Especificaciones del sistema de inmunoanálise. UniCel DxI 800. Beckman Coulter.
98. Access Hybritech p2PSA. (2010) Beckman Coulter. Inc.
99. Access Hybritech p2PSA QC. (2009) Beckman Coulter. Inc.
100. Access Hybritech p2PSA Calibrators (2010) Beckman Coulter. Inc.
101. BD Diagnostics – Preanalytical Systems. BD Vacutainer – Catálogo de produtos para coleta de sangue. São Paulo; 2008 Jan, disponível em: www.bd.com/resource.aspx?IDX=4627 (acedido em Julho de 2013).

102. http://www.paulomargotto.com.br/documentos/Curva_ROC_SPSS.pdf (acedido a 12/03/2014).
103. Thompson IM, Ankerst DP, et al. Assessing prostate cancer risk: Results from the Prostate Cancer Prevention Trial , J of Cancer Institute 2006 Apr 1998 (8):529-534.
104. Mikolajczyk SD, Marks LS, Partin AW, et al. Free prostate-specific antigen in serum is becoming more complex. Urology. 2002; 59:797. [PubMed: 12031356]
105. Sokoll LJ, Wang Y, Feng Z, et al. [-2] proenzyme prostate specific antigen for prostate cancer detection: a national cancer institute early detection research network validation study. J Urol. 2008; 180:539. [PubMed: 18550118]
106. Catalona WJ, Bartsch G, Rittenhouse HG, et al. Serum pro-prostate specific antigen preferentially detects aggressive prostate cancers in men with 2 to 4 ng/mL prostate specific antigen. J Urol. 2004; 171:2239. [PubMed: 15126794]
107. Naya Y, Fritsche HA, Bhadkamkar VA, et al. Evaluation of precursor prostate-specific antigen isoform rácios in the detection of prostate cancer. Urol Oncol. 2005; 23:16. [PubMed: 15885578]
108. de Vries SH, Raaijmakers R, Blijenberg BG, et al. Additional use of [-2] precursor prostate-specific antigen and "benign" PSA at diagnosis in screen-detected prostate cancer. Urology. 2005; 65:926. [PubMed: 15882725]
109. Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL 3rd, et al. Mortality results from a randomized prostate- cancer screening trial. N Engl J Med. 2009; 360:1310. [PubMed: 19297565]
110. Schroder FH, Hugosson J, Roobol MJ, et al. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. N Engl J Med. 2009; 360:1320. [PubMed: 19297566]
111. Emiliozzi P, Longhi S, Scarpone P, et al. The value of a single biopsy with 12 transperineal cores for detecting prostate cancer in patients with elevated prostate specific antigen. J Urol. 2001; 166:845. [PubMed: 11490231]
112. Roehl KA, Antenor JA, Catalona WJ. Robustness of free prostate specific antigen measurements to reduce unnecessary biopsies in the 2.6 to 4.0 ng/mL range. J Urol. 2002; 168:922. [PubMed: 12187191]
113. Catalona WJ, Bartsch G, Rittenhouse HG, et al. Serum pro prostate specific antigen improves cancer detection compared to free and complexed prostate specific antigen in men with prostate specific antigen 2 to 4 ng/ml. J Urol. 2003; 170:2181. [PubMed: 14634374]
114. Billis A, Guimarães MS, Freitas LL, et al. The impact of the 2005 international society of urological pathology consensus conference on standard Gleason grading

- of prostatic carcinoma in needle biopsies. *J Urol.* 2008; 180:548. [PubMed: 18550106]
115. Mikolajczyk SD, Catalona WJ, Evans CL, et al. Proenzyme forms of prostate-specific antigen in serum improve the detection of prostate cancer. *Clin Chem.* 2004; 50:1017. [PubMed: 15054080].
116. DIREÇÃO REGIONAL DE ESTATÍSTICA, “Estimativas da população residente (31 de Dezembro), por distribuição geográfica e sexo, segundo os anos (2003-2013)”; disponível em: <http://estatistica.gov-madeira.pt/index.php/component/content/article/88-populacao-sociedade/demografia/dados-estatisticos-demografia/104-estimativas-da-populacao-residente-31-de-dezembro-por-distribuicao-geografica-e-sexo-segundo-os-anos-2003-2013>>; (acedido a 05 de janeiro de 2015)
117. Carvalho JL. Diagnóstico de Carcinoma da Próstata – Valor do PSA. Mestrado Integrado em Medicina. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar.

Anexos

**Anexo Nº 1 – Pedido de autorização e autorização à Comissão de ética do
SESARAM.**

Documento Nº 1 – Proposta

Centro Hospitalar do Funchal, Projeto 1



**PROPOSTA PARA PROJECTO DE MESTRADO 2010/2011
BIOQUÍMICA, ESPECIALIDADE EM BIOQUÍMICA APLICADA**

TÍTULO: Estudo da incidência do cancro da próstata na RAM e avaliação da sua detecção precoce, através da associação do marcador -2 proPSA ao PSA e PSA livre.

SUPERVISÃO: Miguel Ângelo Carvalho, CCCV/UMa.

CO-SUPERVISÃO: Ilídio Rodrigues Ornelas, Serviço de patologia clínica, CHF. **LOCAL DE**

EXECUÇÃO DOS TRABALHOS: Laboratório de Patologia Clínica, Hospital Dr. Nélio Mendonça.

DESCRIÇÃO DO TRABALHO. *Background* O cancro da próstata afeta os homens, sendo líder em indivíduos, com idade avançada (acima dos 40 anos), mas quando detetado atempadamente (confinado ao órgão), é potencialmente curável por prostatectomia radical. A determinação da incidência da doença é essencial para se delinear estratégias de abordagem, recursos a programar e impacto quer social, económico e/ou legislativo, dado o enorme impacto social e para a saúde pública que este tipo de patologias implica. Por sua vez o diagnóstico atempado do cancro permite evitar ou retardar as taxas de mortalidade. Pelo que a detecção deste cancro realiza-se, através do exame clínico rectal ou de análises clínicas, com a detecção dos marcadores PSA e PSA livre. O antigénio específico da Próstata (PSA) é um dos poucos marcadores tumorais organo-específico que permite diagnosticar o cancro, dependendo a eficácia da sua detecção e a despistagem falsos positivos e/ou negativos, de vários fatores, como sejam os valores dos marcadores no sangue, da idade, etc.. Nas situações de dúvida do diagnóstico o recurso à biópsia, com as consequências traumática e financeiras decorrentes afigura-se como a decisão de recurso para confirmar o diagnóstico clínico. O desenvolvimento e validação de novos testes de diagnóstico adquirem enorme importância. Dado não existir nenhum estudo sobre o tema proposto na Região da Madeira, torna-se pertinente abordagem e realização do projeto proposto.

Objetivo Determinar a incidência dos doentes com cancro na próstata na Região da Madeira, através de marcadores serológicos entre 2011-2012 e avaliar o rigor do diagnóstico clínico.

Metodologia: Efetuar um levantamento dos doentes existentes, através da análise dos marcadores serológicos positivos, PSA, PSA livre, -2 proPSA, durante o período de 1 ano. Determinar a incidência do cancro entre os indivíduos do sexo masculino na Madeira. Utilizar o teste de diagnóstico -2 proPSA na confirmação dos casos considerados positivos com base nos valores de PSA, do teste rectal ou da biópsia. Comparar métodos e ver os melhores marcadores de rastreio da doença. Serão aplicados métodos estatísticos adequados para a análise dos dados.

Bibliografia:

Gjertson, CK, Albertsen, PC. (2011). Use and assessment of PSA in prostate cancer. Med Clin North Am 95(1):191-200. Catalona, WJ, Smith, DS, Ratliff, TL, Dodds, KM, Coplen, DE, Yuan, JJ, (1991). Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. N Engl J Med 324(17):1156-61.

Documento Nº 2 – Formalização de projeto de mestrado, CHF.

Esclarecimentos adicionais

Miguel Ângelo Almeida Pinheiro Carvalho
Universidade da Madeira
Campus da Penteada
9020-105 Funchal

Ex.mo Sr.
Presidente do Conselho Administrativo
Serviço de Saúde da RAM, EPE
Avenida Luís de Camões, nº 57
9004-514 Funchal

Sua Comunicação de

S/Ref.:

N/Ref.:

Data:

96a.CCCV.OP1107-10-2011

Assunto: Formalização de projecto de mestrado, CHF. Esclarecimentos adicionais

Exmo. Sr. Presidente,

No seguimento do nosso requerimento 96.CCCV.OP11, datado de 05 de Agosto último foram solicitados, pela Comissão de Ética esclarecimentos, adicionais sobre o projecto de mestrado de Dulce Helena Fernandes da Silva sob o tema “*Estudo da incidência do cancro da próstata na RAM e avaliação da sua detecção precoce, através da associação do marcador -2 proPSA ao PSA e PSA livre*”, os quais remetemos em anexo.

Ciente da atenção que nos será dispensada, subscrevo-me com a maior atenção.

Com os melhores cumprimentos,



(Miguel

Ângelo Carvalho

Professor Associado Agregado)

Resumo do Projecto

Contextualização

O projecto tem por finalidade o estudo da incidência do cancro da próstata na Região Autónoma da Madeira. E, a avaliação da sua deteção precoce, através da análise e associação dos marcadores sorológicos -2 pro-PSA, PSA e PSA livre.

O trabalho será realizado pela Dulce Helena Fernandes Silva, adiante referida como investigadora, no âmbito do projecto de mestrado do 2º ciclo de Bioquímica, especialidade em Bioquímica Aplicada da Universidade da Madeira, sob orientação e co-orientação do Professor Doutor Miguel Ângelo Carvalho, Universidade da Madeira, e do Dr. Ilídio Rodrigues Ornelas, Serviço de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélio Mendonça.

O projecto tem por natureza um estudo clínico, que será realizado no laboratório de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélio Mendonça, sob a supervisão da Dra. Graça Andrade, Directora de Serviço.

Este tipo de investigação já foi testado anteriormente noutros países, em Portugal e na Região Autónoma da Madeira, será realizada pela primeira vez o que é inovador, uma vez que ao comprovar a hipótese em estudo, será relevante para todos os pacientes, não sendo violada a privacidade destes.

1. Sumário

Remetido em conjunto com o requerimento a 05 de Agosto último.

2. Metodologia

2.1 Objetivo:

Estudar a possibilidade de reduzir o número de biópsias, recorrendo ao uso de novos marcadores tumorais, [-2] pro-PSA, comprovando uma técnica menos invasiva de rastreio do cancro da prostata nos pacientes.

2.2 Desenho

O estudo proposto e a respetiva investigação são constituídos por três etapas:

Etapa I

- i) Deteção de pacientes com valores de PSA compreendidos entre os 4,0 e 10,0 ng/ml (denominada de zona cinzenta dos cut-off de diagnóstico), que serão

seleccionados para figurar num grupo de estudo, ao qual será aposto um grupo controlo de igual dimensão de pacientes, com valores normais de PSA.

- ii) Análise e tratamento estatístico da amostra, segundo as guidelines recomendadas pela Organização Mundial de Saúde.
- iii) Doseamento do [-2] pro-PSA em todos os pacientes da amostra e cálculo do PHi Score ($[-2] \text{ pro-PSA} / \text{PSA Livre} \times \text{PSA}^{1/2}$).
- iv) Análise da eficácia dos novos marcadores, através da comparação dos valores do PHi Score com os resultados das biópsias efectuadas aos pacientes de grupo estudo.

Etapa II

- i) Os pacientes serão classificados, de acordo com número 2.2, etapa I, alínea i), e as amostras serão seleccionadas para separação de uma quantidade de soro em aliquotas etiquetadas com o n° do paciente/utente, idade, número de processo e serviço requisitante.
- ii) As amostras serão conservadas a -20°C para posterior doseamento do [-2] proPSA.
- iii) Doseamento do marcador tumoral [-2] pro-PSA nas amostras, através de electroquimioluminescência.
- iv) Terminada a fase experimental proceder-se-á, à determinação do PHi Score, através da fórmula mencionada anteriormente.

Etapa III

- i) Tratamento estatístico dos resultados, utilizando ferramentas estatísticas robustas e teste paramétricos e não paramétricos para detecção de correlações entre os diferentes parâmetros em estudo;
- ii) Elaboração de tese de mestrado, a qual será alvo de discussão pública, de acordo com as regras do regulamento dos 2^{os} Ciclos da Universidade da Madeira.

Amostra

A dimensão da amostra estará dependente da população de utentes pacientes sob seguimento clínico no período entre Setembro de 2011 e Março de 2012. No entanto, a

dimensão mínima recomendada para a amostra é de 100 a 200 pacientes por grupo de estudo e controlo.

Procedimentos de recolha de amostras e dados

A metodologia utilizada na recolha e processamento das amostras e dos dados associados, relativos aos pacientes será a seguinte:

- i) No final do período laboral, a investigadora consultará, diariamente o sistema informático ModLab, seleccionando todas as análises, com os valores referidos no número 2.2, alínea i). No sistema informático, a investigadora terá acesso apenas ao nome do utente, número de análise, número de processo, data de colheita, serviço requisitante e por vezes o diagnóstico.
- ii) i) Consulta de todos os Processos Clínicos para obtenção de dados clínicos relativos à realização de biópsia e diagnóstico clínico do cancro da próstata será realizado por via indirecta a partir do portal VIA RED MED pela Directora de Serviço. É de salientar que a investigadora não tem acesso a este tipo de portal o que preserva qualquer dado do utente.

Condições materiais

A realização do presente estudo não acarreta custos adicionais para o SESARAM, dado que:

- i) Os pacientes que integrarão a amostra são utentes da CHF, que são submetidos a análises clínicas de rastreio do cancro da próstata por requisição dos serviços;
- ii) A investigadora realizará os trabalhos relativos ao presente estudo em período pós-laboral;
- iii) As análises suplementares utilizarão um kit fornecido gratuitamente por uma casa comercial, devido ao elevado interesse científico no projecto e à necessidade de validar a utilização do marcador tumoral [-2] pro-PSA, como um novo teste de diagnóstico não evasivo e mais eficaz.

Documento Nº 3 – Autorização da comissão de Ética do SESARAM ao pedido de projeto de mestrado.



REGIÃO AUTÓNOMA DA MADEIRA
SERVIÇO DE SAÚDE DA REGIÃO AUTÓNOMA DA MADEIRA, E.P.E.

Comissão de Ética para a Saúde
do
SESARAM,EPE

Parecer nº 49/2011

O Pedido:

Recebido do Conselho de Administração do SESARAM E.P.E. para parecer, pedido de autorização de Miguel Ângelo Carvalho, Professor Associado Agregado da Universidade da Madeira, na qualidade de orientador da Tese de mestrado de Dulce Helena Fernandes da Silva, funcionária do SESARAM, E.P.E., para que esta aceda e utilize dados no âmbito do desenvolvimento da sua Tese de Mestrado “Estudo da incidência do cancro da próstata na RAM e avaliação da sua deteção precoce, através da associação do marcador – 2 proPSA ao PSA e PSA livre”.

Parecer:

A CES/SESARAM,EPE, organizada e a funcionar de acordo com os requisitos das Normas da Boa Prática Clínica (ICHGCP *Guidelines*) e da legislação nacional em vigor (Dec. Lei nº 97/95, de 10 de Maio), composta por Dr. Ricardo Santos, Médico e Presidente, Dr.^a Raquel Tranquada, Médica, Enfermeira Isabel Santos, Dr.^a Joana Dias, Juíza,e, Dr. José Manuel Freitas, Teólogo, na sua reunião de 13 de Setembro de 2011, decidiu, por unanimidade, emitir Parecer Favorável ao pedido acima identificado, nos precisos termos em que o mesmo foi apresentado, por não levantar quaisquer problemas de ordem ética.

Funchal, 25 de Outubro de 2011

O Presidente da CES

(Ricardo Santos)

Anexo Nº 2 – Calibração do Access Hybritech p2PSA

SESARAM EPE

Lab Patologia Clínica

Calibración Data Report

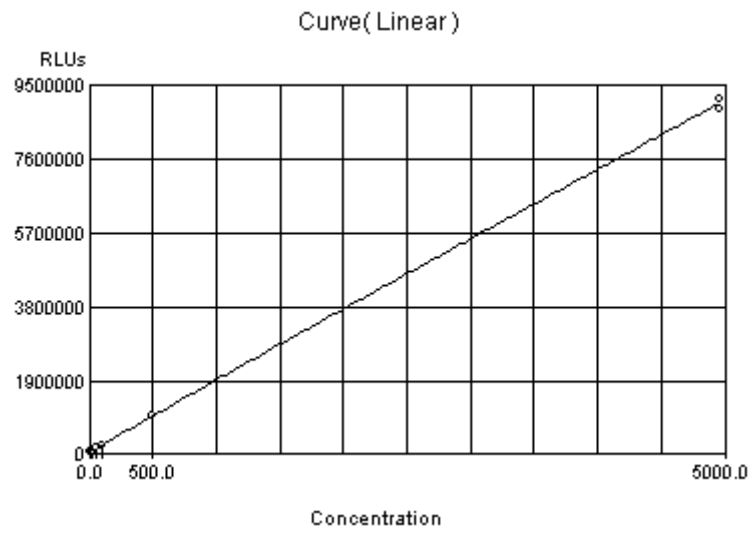
UniCel DxI 800, Access Immunoassay System

S/N 602159, Version 4.4

Test Name: p2PSA Curve: Last Run; Active
 Reagent Lot: 230190 Status: **Passed**
 Calibrated: 11/10/13 13:30 Reason: 324617
 Expiración: 08/11/13 13:30 Cal Lot:

Comment:

Stated	Conc.	RLU	1 SD	%CV	Calculated	Conc.	Flags
pg/mL					pg/mL		
S0	0.00	7610			0.05		
S0	0.00	7393			No Value		
Mean		7501.50	153.44	2.05	0.05		
S1	9.93	27589			10.53		
S1	9.93	26518			9.97		
Mean		27053.50	757.31	2.80	10.25		
S2	20.00	44800			19.57		
S2	20.00	45921			20.16		
Mean		45360.50	792.67	1.75	19.86		
S3	48.49	104214			50.90		
S3	48.49	103524			50.53		
Mean		103869.00	487.90	0.47	50.72		
S4	102.79	199511			101.66		
S4	102.79	191890			97.59		
Mean		195700.50	5388.86	2.75	99.63		
S5	498.99	944885			500.63		
S5	498.99	943951			500.13		
Mean		944418.00	660.44	0.07	500.38		
S6	4953.98	9118248			No Value		
S6	4953.98	8875206			4885.12		
Mean		8996727.00	171856.65	1.91	4885.12		



Anexo Nº 3 – Controlos do Access Hybritech p2PSA

Controlo nível 1

SESARAM EPE
Lab Patologia Clínica

QC Data Report

UniCel DxI 800, Access
Immunoassay System S/N
602159, Version 4.4

Test:	p2PSA	Start Date:	10/10/13
Control:	p2PSA-1	End Date:	16/10/13
Control Lot:	326815	Points:	1
Expiración:	30/04/14	Mean:	19.461
Stated Mean:	20.6100	SD:	No Value
Stated SD:	1.5500	%CV:	No Value
Des. Pipettor:	N/A	Units:	pg/mL

Value	SDI	QC Rules	Comment	Reagent	Lot
		Completion	Omit	Pipettor	
19.46 pg/mL	-0.7	11/10/13 13:54		230190	2

QC Rules: 1=1-2s; 2=2-2s; 3=1-3s; 4=4-1s; X=10x

Page1 of

1

TechnologistPrinted 24/02/14 14:37

Controlo nível 2

SESARAM EPE
Lab Patologia Clínica

QC Data Report

UniCel DxI 800, Access
Immunoassay System S/N
602159, Version 4.4

Test:	p2PSA	Start Date:	10/10/13		
Control:	p2PSA-2	End Date:	16/10/13		
Control Lot:	3268152	Points:	2		
Expiración:	30/04/14	Mean:	158.587		
Stated Mean:	187.7000	SD:	2.349 1.48		
Stated SD:	14.0800	%CV:	pg/mL		
Des. Pipettor:	N/A	Units:	Comment	Reagent	Lot
Value	SDI	Completion	QC Rules	Omit	Pipettor
160.25 pg/mL	-1.9	11/10/13 13:54		230190	2
	-2.2	14/10/13	*1*	230190	3
156.93 pg/mL		17:28			
QC Rules: 1=1-2s; 2=2-2s; 3=1-3s; 4=4-1s; X=10x					

Page1 of

1

TechnologistPrinted 24/02/14 14:37

Controlo nível 3

SESARAM EPE
Lab Patologia Clínica

QC Data Report

UniCel DxI 800, Access
Immunoassay System S/N
602159, Version 4.4

Test:	p2PSA	Start Date:	10/10/13		
Control:	p2PSA-3	End Date:	16/10/13		
Control Lot:	3268153	Points:	1		
Expiración:	30/04/14	Mean:	995.398		
Stated Mean:	965.5000	SD:	No Value		
Stated SD:	72.4500	%CV:	No Value		
Des. Pipettor:	N/A	Units:	pg/mL		
Value	SDI	QC Rules	Comment	Reagent	Lot
		Completion	Omit	Pipettor	
995.40 pg/mL	0.4	11/10/13 13:55		230190	2

QC Rules: 1=1-2s; 2=2-2s; 3=1-3s; 4=4-1s; X=10x

Anexo Nº 4 – Valores médios de doentes com CP e doentes sem CP para valores de PSA Total de 2,0 – 10,0 ng/mL e de 4,0 a 10,0 ng/mL.

Comparação de valores médios de doentes com CP e sem CP para valores de PSA total de 2-10 ng/mL.						
	Cancro			Ausência de Cancro		
	Média	Mediana	N	Média	Mediana	N
PSA (ng/mL)	5,27	4,63	5	5,56	4,69	11
PSA Livre (ng/mL)	0,75	0,61	5	1,04	0,98	11
[-2]ProPSA (ng/mL)	10,59	7,87	5	6,12	6,12	11
Idade (Anos)	71,00	73,00	5	71,36	73,00	11

Comparação de valores médios de doentes com CP e sem CP para valores de PSA total de 4-10 ng/mL.						
	Cancro			Ausência de Cancro		
	Média	Mediana	N	Média	Mediana	N
PSA (ng/mL)	6,66	6,01	3	6,08	4,74	9
PSA Livre (ng/mL)	0,87	1,05	3	1,07	0,98	9
[-2] proPSA (ng/mL)	12,78	10,74	3	7,01	7,11	9
Idade (Anos)	67,00	73,00	3	72,22	73,00	9

Anexo Nº 5 – Coordenadas da curva ROC (Biópsias positivas e negativas)

Coordenadas da curva

Variável(eis) de resultado de teste	Positivo se maior ou igual a ^a	Sensibilidade	1 - Especificidade
	1,8800	1,000	1,000
	3,0000	,909	1,000
	3,2100	,909	,929
	3,3900	,909	,857
	3,8000	,818	,857
	4,1650	,818	,786
	4,2750	,818	,714
	4,4850	,818	,643
	4,6600	,727	,643
	4,7150	,727	,571
	5,3750	,727	,500
	6,4650	,636	,500
	7,3250	,636	,429
	7,9850	,636	,357
	8,7850	,636	,286
	9,5450	,545	,286
	10,1650	,545	,214
	10,9250	,455	,214
	11,4150	,364	,214
	11,7100	,273	,214
	12,2600	,273	,143
	12,9150	,182	,143
	13,8850	,182	,071
	19,9050	,091	,071
	27,1900	,091	,000
	30,1600	,000	,000
	-,6900	1,000	1,000
	,3650	1,000	,929
	,4800	,909	,929
	,5750	,818	,857
	,6200	,727	,857
	,6850	,727	,786
	,7450	,636	,786
	,7900	,636	,714
	,9050	,636	,643
	1,0150	,636	,571
	1,0950	,545	,571
	1,1650	,455	,571
	1,3000	,455	,429
PSA			
PSALivre			

	1,4150	,364	,429
	1,4600	,364	,357
	1,5150	,364	,286
	1,7900	,273	,286
	2,1000	,273	,214
	2,2600	,182	,214
	2,5150	,182	,143
	2,8550	,091	,143
	3,4900	,000	,143
	4,5350	,000	,071
	6,1400	,000	,000
	-,2100	1,000	1,000
	1,8400	1,000	,929
	3,3050	1,000	,857
	4,1000	1,000	,786
	4,6800	1,000	,714
	5,1050	,909	,714
	5,7250	,909	,643
	6,4300	,909	,571
	6,9100	,909	,500
	7,0950	,818	,500
	7,3100	,818	,429
	7,6650	,727	,429
	7,8450	,727	,357
	8,1900	,636	,357
	8,7450	,636	,286
	9,6550	,545	,286
	10,5350	,455	,286
	10,7600	,364	,286
	10,7950	,364	,214
	11,6300	,364	,143
	13,2150	,364	,071
	16,8550	,273	,071
	21,6450	,182	,071
	41,4150	,091	,071
	88,8200	,091	,000
	119,3700	,000	,000
	,172620350319160	1,000	1,000
	2,112822824478490	1,000	,929
	4,607307214878448	1,000	,857
	6,887798725054424	,909	,857
	8,705998235978342	,909	,786
	10,961265304698543	,909	,714
	12,586067509754780	,909	,643
	13,771079695957052	,909	,571
	15,057612976203474	,909	,500
	16,598582754493194	,818	,500
	19,082264396638550	,818	,429
ProPSA			
Phi			

21,116277608352647	,818	,357
21,648142420137372	,727	,357
22,626702519518357	,636	,357
23,943666424943594	,545	,357
24,642439914741230	,545	,286
25,037425538236910	,545	,214
27,046330748148490	,455	,214
30,757668669395470	,455	,143
32,591618670092146	,364	,143
36,502242324199070	,364	,071
46,591971805229090	,273	,071
64,301279327113680	,182	,071
111,989785490689230	,182	,000
160,082853010975780	,091	,000
172,924324324324320	,000	,000

Anexo Nº 6 - Coordenadas da curva ROC (PSA Total de 2,0-10,0ng/mL)

Coordenadas da curva

Variável(eis) de resultado de teste	Positivo se maior ou igual a ^a	Sensibilidade	1 - Especificidade
PSA	1,8800	1,000	1,000
	3,0000	,833	1,000
	3,2100	,833	,909
	3,3900	,833	,818
	3,8000	,667	,818
	4,1650	,667	,727
	4,2750	,667	,636
	4,4850	,667	,545
	4,6600	,500	,545
	4,7150	,500	,455
	5,3750	,500	,364
	6,4650	,333	,364
	7,3250	,333	,273
	7,9850	,333	,182
	8,7850	,333	,091
	9,5450	,167	,091
	10,1650	,167	,000
11,5700	,000	,000	
PSALivre	-,6900	1,000	1,000
	,3650	1,000	,909
	,4800	,833	,909
	,5750	,667	,818
	,6200	,500	,818
	,6900	,500	,727
	,7900	,500	,636
	,9050	,500	,545
	1,0150	,500	,455
	1,0950	,333	,455
	1,1650	,167	,455
	1,3050	,167	,273
	1,4600	,167	,182
	1,7750	,167	,091
	2,1000	,167	,000
	3,1500	,000	,000

	-,2100	1,000	1,000
	1,8400	1,000	,909
	3,3050	1,000	,818
	4,1000	1,000	,727
	4,9050	1,000	,636
	5,7250	1,000	,545
	6,6000	1,000	,455
	7,0950	,833	,455
	7,3100	,833	,364
ProPSA	7,6650	,667	,364
	7,8450	,667	,273
	8,1900	,500	,273
	9,4200	,500	,182
	10,5350	,333	,182
	10,7750	,167	,182
	11,6300	,167	,091
	16,0900	,167	,000
	20,7300	,000	,000
	,172620350319160	1,000	1,000
	2,112822824478490	1,000	,909
	7,588783877533996	1,000	,818
	12,586067509754780	1,000	,727
	13,771079695957052	1,000	,636
	15,057612976203474	1,000	,545
	16,598582754493194	,833	,545
	19,082264396638550	,833	,455
	21,119887219647666	,833	,364
Phi	22,626702519518357	,667	,364
	23,943666424943594	,500	,364
	24,642439914741230	,500	,273
	25,037425538236910	,500	,182
	27,046330748148490	,333	,182
	30,850960407719413	,333	,091
	36,502242324199070	,333	,000
	46,591971805229090	,167	,000
	53,864369370476130	,000	,000