

ANTÍGENO ESPECÍFICO DA PRÓSTATA EM FLUIDOS BIOLÓGICOS E SUA APLICAÇÃO EM ANÁLISES FORENSES

Bruno Tadeu de Aguiar

Antígeno específico da próstata (PSA) é uma glicoproteína produzida pelo tecido da próstata e secretado no plasma seminal em níveis elevados. O PSA é amplamente usado como um biomarcador do câncer e como um marcador forense. O PSA foi originalmente descrito como um antígeno específico da próstata. Posteriormente, foi observado em uma variedade de fluidos extraprostáticos. Nesta revisão, sintetizou-se a história evolutiva do PSA e avaliou-se informações disponíveis sobre níveis do PSA em fluidos não-prostático. Este artigo aponta discutir se estes níveis podem danificar a identificação forense do semen.

Palavras-chave: PSA, Antígeno Específico da Próstata, Análises forenses

INTRODUÇÃO

A PSA (Prostatic Specific Antigen) é uma glicoproteína de cadeia simples, com PM=33-34 kDa e expressa em altos níveis no epitélio da próstata humana sob o controle de andrógenos e progestinas. Após várias pesquisas desenvolvidas por cientistas forenses em torno de componentes específicos do esperma, a PSA foi descoberta através do isolamento e da caracterização de proteínas do plasma seminal e recebeu várias denominações.

Li e Schulman (1971) descreveram uma proteína com PM=31 kDa que denominaram E1, a qual parecia ser específica do esperma. Sensabaugh (1978), caracterizou uma proteína do plasma seminal, que denominou p30, com PM=30 kDa e que apresentava reatividade com o

anti-soro preparado contra a proteína E1, sugerindo que tinham alguns determinantes imunológicos em comum. Em 1979, Wang descreveu uma glicoproteína com PM=33-34 kDa como sendo específica da glândula prostática, que denominou PSA (antígeno prostático específico). Anos depois os cientistas sugeriram que a PSA era bioquimicamente idêntica à p30.

A PSA (ou p30) faz parte da família das caliceínas, que são proteases do soro com diversas funções fisiológicas. Elas são representadas por uma família de genes, composta por quinze membros, localizados continuamente ao longo do cromossomo 19q13.4. O gene KLK-3 codifica a protease PSA, também chamada hK3 - caliceína glandular humana 3 (Tabela 1).

Tabela 1

Proteína	Caliceína Pancreática Renal	Caliceína Humana	Antígeno Específico da Próstata
Designação Antiga	hPRK	HGK-1	PSA
Designação Nova	hK1	hK2	hK3
Número de Aminoácidos	238	237	237

O nome PSA reflete a idéia inicial de que a expressão da proteína era restrita à próstata. Pensava-se, até recentemente, que a PSA era produzida exclusivamente pelas células epiteliais da próstata, mas, a partir do emprego de metodologias mais sensíveis e da realização de estudos imunohistoquímicos, ficou evidente a presença desta proteína, mesmo em concentrações mínimas, em uma variedade de tipos de tumores, tecidos saudáveis e fluidos biológicos femininos e masculinos, sugerindo que ela possa ser funcional também fora da próstata. Uma das principais funções prostáticas da PSA é liquefazer o coágulo seminal após a ejaculação, através da fragmentação e solubilização das proteínas seminogelina I e II, e da fibronectina.

Os níveis de PSA aumentam no soro de indivíduos com patologias prostáticas e sua dosagem está sendo utilizada como um marcador prostático tumoral há mais de dez anos, auxiliando na detecção de câncer de próstata em estágios iniciais, avaliação da progressão da doença e para estimar a resposta terapêutica.

A PSA pode ser encontrada em duas formas moleculares no soro, livre e complexada: 10-30% de PSA total é livre, não ligada a proteínas do soro, 70-90% de PSA total é ligada a α 1-antiquimiotripsina (ACT) e a uma pequena quantidade de α 1-antitripsina e uma pequena porção não mensurável pelos métodos habituais circula complexada com α 2-macroglobulina.

A presença de PSA no esperma em concentrações milhões de vezes maiores que no soro de homens a caracterizou como um marcador valioso, já testado e validado pela comunidade forense, para a identificação de fluido seminal em evidências criminais deixadas por indivíduos vasectomizados, azoospermicos ou oligozoospermicos.

Com os relatos da presença da PSA no soro de homens e em outros fluidos extraprostáticos, como no soro de mulheres e crianças, urina de mulheres, líquido amniótico, leite materno, saliva e fluido cerebrospinal, é interessante que os níveis de PSA encontrados nestes fluidos sejam relacionados com os níveis de PSA encontrados no líquido seminal. O propósito deste trabalho é relatar os resultados de pesquisas realizadas nestes fluidos e avaliar se podem ou não interferir na constatação da

presença de líquido seminal em materiais periciados.

PSA EM FLUIDOS BIOLÓGICOS

O isolamento e a purificação da PSA no esperma humano tornou possível o desenvolvimento de métodos imunológicos para a sua detecção. De acordo com a descoberta e evolução desses métodos que, inicialmente, tinham uma sensibilidade de 5.000 a 1 ng/ml, vários pesquisadores forenses testaram, desde 1977, diversos fluidos biológicos em relação à PSA e concluíram que a PSA era específica do esperma.

A maior parte do conhecimento sobre a bioquímica do PSA parte de estudos sobre a proteína isolada do fluido seminal, no qual as concentrações são milhões de vezes superiores às encontradas no soro. A concentração do PSA no fluido seminal varia de 0,5 a 4,0 mg/ml, enquanto que a concentração sérica em indivíduos normais raramente excede a 4,0 ng/ml.

Atualmente, a determinação quantitativa da PSA é realizada em equipamentos automatizados e totalmente computadorizados que utilizam métodos imunológicos, como enzimaímunoensaios, quimioluminescentes imunoenzimáticos e imunorradiométricos. Estes métodos possuem uma sensibilidade de pelo menos 0,001ng/ml, o que possibilitou, a partir de 1994, a detecção da PSA em vários fluidos biológicos extraprostáticos (Tabela 2), como descrito a seguir.

Breul et al (1997) investigaram a concentração de PSA em urina de 20 mulheres com ingestão contínua de testosterona e 20 mulheres que não estavam ingerindo testosterona (controles). Somente cinco dos controles apresentaram PSA entre 0,2-2 ng/ml e o grupo sob ação de androgênicos teve níveis entre 0,2 ng/ml e 12,00 ng/ml. Mannello et al (1998) analisaram a urina de 50 mulheres que tomavam contraceptivo e de 50 mulheres que não estavam ingerindo contraceptivo. Os resultados da PSA variaram, respectivamente, de 0,09-1,239 ng/ml e de 0,02-0,15 ng/ml. Schmidt et al (2001) analisaram amostras de urina de 217 mulheres, cujas dosagens variaram de 0,12 a 1,06 ng/ml.

Obiezu et al (2001) dosaram PSA urinário de 35 mulheres com síndrome de ovário policístico e encontraram valores que variaram de 0,001-10,29 ng/ml e 41 controles sem essa síndrome, com valores até 0,046ng/ml.

Filella et al (1996) verificaram que somente 14% do soro de 252 mulheres apresentaram valores positivos para PSA, e que os mesmos não ultrapassaram 0,5 ng/ml. Melegos et al (1997a) analisaram o soro de 22 mulheres com hirsutismo, encontrando valores de PSA de 0-0,579 ng/ml e de 50 mulheres saudáveis que apresentaram PSA de 0-0,019 ng/ml. Zarghami et al (1997) estudaram a variação de PSA no soro de 14 mulheres saudáveis durante o ciclo menstrual e obtiveram resultados de 0,002-0,004 ng/ml. Aksoy et al (2002) também investigaram a mudança de concentração de PSA no soro e saliva de 30 mulheres saudáveis durante o ciclo menstrual e encontraram variação de 0,007-0,035 ng/ml para o soro e de 0,007-0,029 ng/ml para a saliva. Manello et al (1998) dosaram a PSA no soro de 100 mulheres, metade das quais tomava contraceptivo, e encontraram níveis inferiores a 0,06 ng/ml.

Antoniou et al (2004) verificaram a variação de níveis de PSA no soro de 205 crianças até 12 anos e encontraram para 123 meninos valores máximos de 2,768 ng/ml e para 82 meninas valores de até 0,287 ng/ml. Black et al (2000) analisaram o soro de 118 pacientes com câncer de mama e de 99 controles e encontraram valores variando, respectivamente,

de 0-8,153 ng/ml e 0-0,055ng/ml.

Yu et al (1995) analisaram leite materno de 38 mulheres, obtendo valores positivos para PSA em 34 amostras, com 5 amostras variando de 10 a 350 ng/ml e nas 29 amostras restantes a variação ficou entre 0,01-10 ng/ml e sugeriram que a concentração de PSA no leite diminui em relação ao tempo pós-parto. Wolff et al (1999) encontraram níveis de PSA de 0,003-1,22 ng/ml no líquido amniótico de 48 mulheres grávidas e concluíram que a fonte do líquido amniótico é ainda desconhecida e que a presença de PSA no líquido amniótico pode indicar seu papel biológico no crescimento e desenvolvimento fetal. Magklara et al (1999) analisaram leite de 44 mulheres, obtendo valores positivos para PSA em 39 amostras com valor médio de 0,084 ng/ml, 4 amostras apresentaram altas concentrações com valores variando de 11,8 a 111 ng/ml. Analisaram, também, 116 amostras de líquido amniótico, com resultados de 0,001-2 ng/ml.

Melegos et al (1997) investigaram a presença de PSA em 299 amostras de fluido cerebrospinal coletadas de homens e mulheres e concluíram que a PSA pode ser produzida pelo tecido cerebral e encontraram um valor máximo de 0,382 ng/ml.

A presença da PSA em secreções vaginais foi pesquisada em swabs vaginais livres de esperma por Lawson et al (1998) e Macaluso (1999), coletados, respectivamente, de 20 mulheres com variação entre 0-1,25 ng/ml e de 40 mulheres com variação entre 0,43-0,88ng/ml.

Tabela 2

Fluidos	Autor	Grupos Estudados	PSA (ng/ml)
Soro de Mulheres	<i>Filella et al (1996)</i>	-----	Até 0,5
	<i>Melegos et al (1997)</i>	Controles	0 – 0,019
		Com hirsutismo	0 – 0,579
	<i>Zarghami et al (1997)</i>	Durante o ciclo menstrual	0,002 – 0,004
	<i>Aksoy et al (2002)</i>	Durante o ciclo menstrual	0,007 – 0,035
	<i>Manello et al (1998)</i>	Ingerindo contraceptivo	< 0,06
	<i>Black et al (2000)</i>	Controles	0 – 0,055
Com câncer de mama		0 – 8,153	
Soro de crianças até 12 anos	<i>Antoniou et al (2004)</i>	Meninos	Até 2,768
		Meninas	0,29
Urina de mulheres	<i>Breul et al (1997)</i>	Controles	0,2 – 2,00
		Ingerindo testosterona	0,2 – 12,00
	<i>Manello et al (1998)</i>	Controles	0,02 – 0,15
		Com contraceptivo oral	0,09 – 1,239
	<i>Schmidt (2001)</i>	-----	0,12 – 1,06
<i>Obiezu et al (2001)</i>	Controles	0,001 – 0,046	
	Síndrome de ovário policístico	0,001 – 10,29	
Saliva	<i>Aksoy et al (2002)</i>	Durante o ciclo menstrual	0,007 – 0,029
Leite materno	<i>Yu et al (1995)</i>	-----	< 0,01 – 350
	<i>magklara et al (1999)</i>	-----	0 – 111
Líquido amniótico	<i>Wolff et al (1999)</i>	-----	0,003 – 1,22
	<i>magklara et al (1999)</i>	-----	0,01 – 2,00
Líquido cefalorraquidiano	<i>Melegos et al (1997)</i>	Desordens neurológicas	Até 0,382
Secreção vaginal	<i>Lawson et al (1998)</i>	-----	0 – 1,25
	<i>Macaluso et al (1999)</i>	-----	0,43 – 0,88

CONCLUSÃO

Em perícias que envolvem materiais oriundos de crimes sexuais, onde o corpo de delito é o esperma, não se pode rejeitar o possível envolvimento de indivíduos oligozoospermicos, azoospermicos e vasectomizados. A determinação da PSA, considerando seu alto nível no esperma, é uma ferramenta extremamente valiosa nesses casos, já que a pesquisa microscópica para espermatozoides resultará negativa.

Em vestígios criminais, fluidos biológicos são depositados diretamente na vítima, onde a coleta é feita com um swab, ou em outros tipos de suportes sob a forma de manchas. Em ambos os casos, o material deverá ser macerado e extraído. Na obtenção destes extratos, deve-se considerar dois fatores; a diluição do fluido no líquido de extração e a eficiência desta extração. Estes fatores são relevantes ao analisar os níveis de PSA encontrados nos diversos fluidos biológicos.

Os métodos já padronizados e aplicados na extração de fluidos com swabs ou manchas, requerem um volume de solução de extração suficiente para a determinação da PSA e das provas citológicas, sorológicas e moleculares. Considerando este fator de diluição, a eficiência de extração é estimada em 1% , o que significa que somente 1% da PSA contida em uma mancha ou swab é capaz de ser extraída.

Fluidos como sangue, saliva, urina e secreção vaginal também são encontrados em manchas coletadas em perícias de crimes sexuais, além de esperma. Verificando os valores de PSA encontrados nestes fluidos, sob várias circunstâncias e analisados sem diluir, observamos que o maior valor relatado foi de 12

ng/ml, encontrado em urina de mulheres que ingeriam testosterona. Considerando a eficiência de extração, o valor obtido em uma mancha será de 0,12 ng/ml, que é extremamente baixo. Em relação aos níveis detectados em leite materno e considerando este mesmo fator, o valor máximo da PSA ficará em torno de 3,5 ng/ml.

Estas constatações são confirmadas por pesquisas de vários autores forenses que testaram diversas manchas de fluidos biológicos, como sangue e saliva de homens e mulheres, secreção vaginal, urina de mulheres, material fecal e leite materno e não encontraram resultados positivos para nenhuma delas. Os métodos utilizados para a detecção da PSA nestes testes, com sensibilidade de 4 ng/ml, foram os imunocromatográficos, qualitativos e semiquantitativos, realizados em membranas. Isto significa que todos estes fluidos contidos em manchas apresentaram níveis de PSA menores que 4ng/ml. Por outro lado, como a concentração de PSA em esperma fica em torno de 1×10^6 ng/ml, o valor de PSA encontrado em uma mancha será extremamente alto, aproximadamente 10.000 ng/ml.

Os métodos quantitativos realizados em equipamentos computadorizados, com sensibilidade de até 0,001 ng/ml, já foram também validados para testes forenses e devem ser aplicados considerando-se um valor mínimo de positividade para esperma de 4 ng/ml .

Diante destes relatos, conclui-se que os níveis de PSA existentes nos fluidos extraprostáticos não interferem na investigação de esperma em perícias criminais e que os peritos forenses podem, desse modo, determinar com confiança a presença de esperma em manchas e swabs, através de testes de PSA.

REFERÊNCIAS

- AKSOY, H.; AKÇAY, F.; ZÜHAL UMUDUM, Z.; YILDIRIM, A. K.; MEMISOGULLARI, R. Changes of PSA Concentrations in Serum and Saliva of Healthy Women during the Menstrual Cycle. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, v. 32, p. 31-36, 2002.
- ANTONIOU, A.; PAPANASTASIOU, P.; STEPHANIDIS, A.; DIAMANDIS, E.; ANDROULAKAKIS, P. A. Assessment of serum prostate specific antigen in childhood. *BJU Int.*, v. 93, n. 6, p. 838-840, 2004.
- BLACK, M. H.; GIAI, M.; PONZONE, R.; SISMONDI, P.; YU, H.; DIAMANDIS, H. P. Serum Total and Free Prostate-specific Antigen for Breast Cancer Diagnosis in Women. *Clinical Cancer Research*, v. 6, p. 467-473, 2000.
- BREUL, J.; PICKL, U.; SCHAFF, J. Extraprostatic production of prostate specific antigen is under hormonal control. *J.Visão Acadêmica, Curitiba*, v. 5, n. 2, p. 109-116, Jul.-Dez./2004 - ISSN: 1518-519 Urol., v. 157, n. 1, p. 212-213, 1997.
- DIAMANDIS, E. P.; YU, H. Nonprostatic sources of prostate-specific antigen. *Urol. Clin. North Am.*, v. 24, n. 2, p. 275-282, 1997.
- FILELLA, X.; MOLINA, R.; ALCOVER, J.; MENENDEZ, V.; GIMENEZ, N.; JO, J.; CARRETERO, P.; BALLESTA, A. M. Prostatespecific antigen detection by ultrasensitive assay in samples from women. *Prostate*, v.29, n. 5, p. 311-316, 1996.
- LAWSON, M.L.; MACULUSO, M.; BLOOM, A.; HORTIN, G.; HAMMOND, K.R.; BLACKWELL R. Objective markers of condom failure. *Sex Transm Dis.*, v. 25, n. 8, p. 427-432, 1998.
- LI, T. S.; SHULMAN, S. Immuno-electrophoretic analysis of human seminal plasma fractions after fractionation by various methods. *Int J Fertil.*, v. 16, n. 2, p. 87-100, 1971.
- MACALUSO M.; LAWSON, L.; AKERS, R.; VALAPPIL, T.; HAMMOND, K.; BLACKWELL, R.; HORTIN, G. Prostate-specific antigen in vaginal fluid as a biologic marker of condom failure. *Contraception*, v. 59, n. 3, p. 195-201, 1999.
- MAGKLARA, A.; SCORILAS, A.; LÓPEZ-OTÍN, C.; VIZOSO, F.; ALVARO RUIBAL, A.; DIAMANDIS, E. P. Human Glandular Kallikrein in Breast Milk, Amniotic Fluid, and Breast Cyst Fluid. *Clinical Chemistry*, v. 45, n. 10, p. 1774-1780, 1999.
- MANNELLO, F.; CONDEMI, L.; CARDINALI, A.; BIANCHI, G.; GAZZANELLI, G. High concentrations of prostate-specific antigen in urine of women receiving oral contraceptives. *Clin Chem.*, v. 44, n. 1 p. 181-183, 1998.
- MELEGOS, D.M.; FREEDEMAN M.S.; DIAMANDIS E.P. Prostate-Specific Antigen in Cerebrospinal Fluid. *Clinical Chemistry*, v. 43, p. 855, 1997b.
- OBIEZU, C. V.; SCORILAS, A.; MAGKLARA, A.; THORNTON, M. H.; WANG, C. Y.; STANCZYK, F. Z.; DIAMANDIS, E. P. Prostate-Specific Antigen and Human Glandular Kallikrein 2 Are Markedly Elevated in Urine of Patients with Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 86, n. 4, p. 1558-1561, 2001.
- SCHMIDT, S.; FRANKE, M.; LEHMANN, J.; LOCH, T.; STOCKLE, M.; WEICHERT-JACOBSEN, K. Prostate-specific antigen in female urine: a prospective study involving 217 women. *Urology*, v. 57, n. 4, p. 717-720, 2001.
- SENSABAUGH, G. F. Isolation and Characterization of a Semen-Specific Protein from Human Seminal Plasma: A Potential New Marker for Semen Identification. *Journal of Forensic Sciences*, v. 23, n. 1, p. 106-115, 1978.
- WANG, T. J.; RITTENHOUSE, H. G.; WOLFERT, R. L.; LYNNE, C. M.; BRACKETT, N. L. PSA Concentrations in Seminal Plasma. *Clinical Chemistry*, v. 44, p. 895-896, 1998.
- WOLFF, J. M.; HEYL, W.; BORCHERS, H.; BREHMER, B. J.R.; RATH, W.; JAKSE, G. Detection of prostate-specific antigen immunoreactivity in amniotic fluid. *Urol Int.*, v. 62, n. 3, p. 139-142, 1999.
- YU, H.; DIAMANDIS, E. P. Prostate-specific antigen in milk of lactating women. *Clin. Chem.*, v. 41, n. 1, p. 54-58, 1995.
- ZARGHAMI, N.; GRASS, L.; SAUTER, E. R.; DIAMANDIS, E. P. Prostate-specific antigen in serum during the menstrual cycle. *Clinical Chemistry*, v. 43, n. 10, p.1862-1867, 1997.