

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA
FACULDADE DE FARMÁCIA

JORGE LUÍS ESPÍNDOLA FILHO

**VALIDAÇÃO DE UM TESTE RÁPIDO IMUNOCROMATOGRÁFICO PARA SEMI-
QUANTIFICAÇÃO DE ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO EM SORO
HUMANO**

Porto Alegre

2015

JORGE LUÍS ESPÍNDOLA FILHO

**VALIDAÇÃO DE UM TESTE RÁPIDO IMUNOCROMATOGRÁFICO PARA SEMI-
QUANTIFICAÇÃO DE ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO EM SORO
HUMANO**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Farmacêutica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Thomé Kreutz

Porto Alegre

2015

JORGE LUÍS ESPÍNDOLA FILHO

**VALIDAÇÃO DE UM TESTE RÁPIDO IMUNOCROMATOGRÁFICO PARA SEMI-
QUANTIFICAÇÃO DE ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO EM SORO
HUMANO**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Farmacêutica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em 18 de junho de 2015

BANCA EXAMINADORA:

Profª. Dra. Ana Lígia Bender

Profª. Dra. Ana Paula Duarte de Souza

Dr. Alberto da Costa Stein

Porto Alegre

2015

RESUMO

Cerca de 1 milhão e 100 mil casos de câncer de próstata são estimados no mundo anualmente, responsáveis por mais de 250 mil óbitos. Sabe-se que a melhora do prognóstico dos pacientes deve-se a um diagnóstico precoce desta neoplasia. Embora o Antígeno Prostático Específico (PSA) tenha limitações do ponto de vista de sensibilidade e especificidade para a patologia em destaque, sua dosagem sérica é utilizada em muitos países como ferramenta para o rastreamento e detecção precoce de câncer de próstata, caracterizando-o como uma das ferramentas mais utilizadas desde sua descoberta. Em 2014, o sistema público de saúde brasileiro autorizou aproximadamente mais de 4,8 milhões de testes como este. Levando em consideração a heterogeneidade territorial e econômica da população do Brasil, é necessária a elaboração de ensaios de baixo custo e fácil aplicação que possam auxiliar no diagnóstico do câncer de próstata, sem abrir mão da sensibilidade e especificidade. Desta forma, o presente trabalho consistiu na validação de um teste rápido desenvolvido por uma empresa brasileira de biotecnologia para semi-quantificação de PSA em soro humano. Ao final do estudo, o produto apresentou sensibilidade diagnóstica = 100% e especificidade = 85,71%, sendo considerado satisfatório para um teste preliminar, mas necessitando ajustes posteriores.

Palavras-chave: Câncer de próstata. PSA. Diagnóstico. Imunocromatografia. Validação.

ABSTRACT

Around 1.1 million cases of prostate cancer are estimated worldwide every year, accounting for more than 250,000 deaths. It is widely known that the improvement on patients' prognosis is due to an early diagnosis of this neoplasm. Although the Prostate Specific Antigen (PSA) has some limitations concerning sensitivity and specificity for the pathology in question, its serum dosage is used in many countries as a tool for screening and early detection of prostate cancer, which makes it one of the most used devices since its discovery. In 2014, the Brazilian public health system authorized more than 4.8 million tests of this kind. Considering the territorial and economic heterogeneity of the Brazilian population, it is necessary to the develop tests with low cost and easy application, which will assist the diagnosis of prostate cancer, without sacrificing sensitivity and specificity. Thus, this study means to validate a rapid test for semi-quantification of PSA in human serum, developed by the Brazilian company FK Biotechnology. At the end of the study, the product showed diagnostic sensitivity of 100% and specificity of 85.71%, being considered satisfactory for a preliminary test, but requiring subsequent adjustments.

Keywords: Prostate cancer. PSA. Diagnosis. Point-of-care. Validation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema de resultados da imunocromatografia	20
Figura 2 – Aplicação das amostras.....	24
Figura 3 – Escala de cores	24
Figura 4 – Cálculo dos dados estatístico	26
Figura 5 – Resultado do ensaio de reprodutibilidade	28
Gráfico 1 – Curva ROC	28
Figura 6 – Número de amostras classificadas com cut-off nível C	29
Figura 7 – Número de amostras classificadas com cut-off nível D	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparativo de níveis idade-específicos de PSA no mundo	17
Tabela 2 – Amostras e respectivas concentrações escolhidas	25
Tabela 3 – Distribuição de amostras por faixa de concentração de PSA	27
Tabela 4 – Pontos da curva ROC	28
Tabela 5 – Número de falso-positivos por faixa de concentração de PSA	30
Tabela 6 – Número de verdadeiros-positivos e falso-positivos por faixa de concentração de PSA.....	30

LISTA DE SIGLAS

ACS – *American Cancer Society* (Sociedade Americana do Câncer)

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AuNP – *Gold Nanoparticles* (Nanopartículas de ouro)

BPH – *Benign Prostate Hiperplasia* (Hiperplasia Prostática Benigna)

CABBIO – Centro Argentina-Brasil de Biotecnologia

CaP – Câncer de Próstata

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DATASUS – Banco de dados do Sistema Único de Saúde

DRE – *Digital Rectal Exam* (Exame de Toque Retal)

ERSPC – *European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer* (Estudo Europeu Randomizado de Triagem do Câncer de Próstata)

EU – União Europeia

EUA – Estados Unidos da América

FINEP – Financiadora de Estudos e Projetos

FP – Falso-positivo

fPSA – *Free Prostate-specific Antigen* (Antígeno Prostático Específico Livre)

HBV – *Hepatitis B Virus* (Vírus da Hepatite B)

HCV – *Hepatitis C Virus* (Vírus da Hepatite C)

HIV – *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)

HSL-PUCRS – Hospital São Lucas da PUCRS

INCA – Instituto Nacional do Câncer

LID-PUCRS – Laboratório de Pesquisa em Imunodiagnóstico da PUCRS

NCI – *National Cancer Intitute* (Instituto Nacional do Câncer)

ng/mL – Nanogramas por mililitro

PLCO- CST – *Prostate, Lung, Colo-rectal and Ovarian Cancer Screening Trial* (Triagem de Câncer de Próstata, Pulmão, Colorretal, e Ovário)

PSA – *Prostate-specific Antigen* (Antígeno Prostático Específico)

PUCRS – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

RS – Rio Grande do Sul

S.A – Sociedade Anônima

SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences*

SUS – Sistema Único de Saúde

tPSA – *Total Prostate-specific Antigen* (Antígeno Prostático Específico Total)

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UnB – Instituto Nacional de Nanobiotecnologia

VP – Verdadeiro-negativo

VPN – Valor Preditivo Negativo

VPP – Valor Preditivo Positivo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	CÂNCER DE PRÓSTATA	12
1.1.1	Aspectos Gerais	12
1.1.2	Epidemiologia	12
1.1.3	Fatores de Risco	13
1.1.4	Diagnóstico	13
1.2	ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO (PSA)	14
1.2.1	Estrutura e Aspectos Gerais	14
1.2.2	Uso em Diagnóstico de Câncer de Próstata	14
1.3	NÍVEIS SÉRICOS DE ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO	15
1.3.1	Ponto de Corte (<i>Cut-Off</i>)	15
1.3.2	Valores Idade-Específicos	16
1.3.3	Interferentes	17
1.4	TESTES RÁPIDOS (<i>POINT-OF-CARE</i>)	18
1.4.1	Aspectos Gerais	18
1.4.2	Imunocromatografia	19
1.5	FK BIOTECNOLOGIA	20
1.5.1	Aspectos Gerais e Linhas de Pesquisa	20
1.5.2	Teste Rápido da Empresa	21
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVO GERAL	22
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	22
3	METODOLOGIA	23
3.1	AMOSTRAS	23
3.2	PROCEDIMENTO PADRÃO DO TESTE RÁPIDO	23
3.3	ESCALA DE CORES	24
3.4	ENSAIOS DE VALIDAÇÃO REALIZADOS	25
3.4.1	Reprodutibilidade	25

3.4.2 Ensaio de Correlação	25
3.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	25
3.5.1 Dados Estatísticos	25
4 RESULTADOS.....	27
4.1 AMOSTRAS	27
4.2 REPRODUTIBILIDADE.....	27
4.3 CURVA ROC	27
4.4 DADOS ESTATÍSTICOS	29
4.5 CONSIDERAÇÕES GERAIS DOS ENSAIOS.....	30
5 DISCUSSÃO	31
6 CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS.....	35

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE PRÓSTATA

1.1.1 ASPECTOS GERAIS

A próstata é uma glândula que faz parte do aparelho reprodutor masculino, localizada na parte baixa do abdômen, abaixo da bexiga e à frente do reto. Por este motivo, teve seu nome derivado do grego, *pro-histamai*, que significa “estar à frente”. Ela é responsável pela produção do líquido prostático, constituinte de parte do sêmen. A secreção prostática possui espermina, a qual atua na liquefação do sêmen e participa na nutrição e preservação dos espermatozoides (INCA, 2015; SOUZA, 2005).

A formação do mecanismo do câncer de próstata (CaP), embora não seja totalmente conhecida, envolve a proliferação de células epiteliais predominantemente na zona periférica do órgão, ocasionando o aumento de volume do mesmo. O comportamento atípico deste câncer pode variar de uma lesão latente focal ou até evoluir para estágios mais avançados, como a metástase óssea (SOUZA, 2005). Em suas fases iniciais, o câncer de próstata é assintomático, e, portanto, é improvável que os pacientes procurem assistência médica neste período (CASTRO *et al*, 2011; KIM *et al*, 2011).

1.1.2 EPIDEMIOLOGIA

O câncer de próstata é a neoplasia mais diagnosticada no mundo, sendo a segunda com maior mortalidade, ficando atrás apenas do câncer de pulmão (CASTRO *et al*, 2011; LIMA *et al*, 2013; SOUZA, 2005).

A incidência global estimada é de 1 milhão e 100 mil casos, sendo responsável por 258 mil óbitos a cada ano. Pelo fato destes números apresentarem um ritmo de crescimento ano após ano, são estimados que 500 mil homens irão morrer em decorrência do câncer de próstata em 2030 (INCA, 2015; NA *et al*, 2013). Em 2012, a estimativa foi de quase 70 mil mortes na União Europeia (EU), correspondendo a 10,74 mortes por 100 mil homens, enquanto que nos Estados Unidos (EUA) estimam-se aproximadamente 240 mil novos casos e 28 mil mortes. Já no Brasil, são estimados cerca de 69 mil novos casos, representando 70 destes para cada 100 mil habitantes homens em 2014 (INCA, 2015; LIMA *et al*, 2013).

Apesar deste índice, a mortalidade por CaP é relativamente baixa (especialmente quando seu diagnóstico é feito na fase inicial) se comparada com outros tipos de câncer, o que

indica seu bom prognóstico. A média mundial de sobrevida, em cinco anos, é de 58% (CASTRO *et al*, 2011; SOUZA, 2005).

O câncer de próstata é mais prevalente no norte da Europa, EUA e Austrália, sendo 1,6 vezes mais incidente em negros do que em brancos. Além disso, negros ainda possuem uma sobrevida menor com ou sem tratamento. Por outro lado, o continente africano, assim como o asiático, possui menor incidência da doença (GERTSON *et al*, 2013; SEO *et al*, 2010).

1.1.3 FATORES DE RISCO

Além do fator étnico, homens com mais de 50 anos são mais frequentemente acometidos pelo CaP, em que mais de 65% dos casos são diagnosticados em pacientes com mais de 65 anos (CASTRO *et al*, 2011). O histórico familiar é, também, um dos principais fatores de risco, sendo que o risco aumenta em decorrência ao grau de familiaridade e à idade em que o familiar foi diagnosticado. No caso do parente ser de primeiro grau (pai ou irmão), o risco é aumentado em 2 vezes, ao passo que se ele for diagnosticado com menos de 60 anos, este passa a ser 3 vezes maior (GERTSON *et al*, 2013).

1.1.4 DIAGNÓSTICO

Segundo a recomendação da Sociedade Americana de Câncer (ACS) e da Associação Brasileira de Câncer, a dosagem dos níveis séricos de antígeno prostático específico, mais conhecido na sua sigla em inglês PSA (*Prostate-specific Antigen*), em conjunto com o exame do toque retal (DRE, do inglês *Digital Rectal Examination*) devem ser oferecidos anualmente para homens com idade acima de 50 anos e com expectativa de vida de no mínimo 10 anos, uma vez que tanto o tempo de sobrevida da patologia quanto o tratamento desta podem ser mais prolongados que este período (SEO *et al*, 2010). Na presença de um dos fatores de risco discutidos anteriormente, recomenda-se que o paciente comece a fazer monitoramento da doença 10 anos antes que as demais pessoas (GERTSON *et al*, 2013).

A confirmação do diagnóstico do CaP é realizada pelo estudo histopatológico do tecido da próstata, obtido por biópsia transretal ou transuretral. A biópsia é comumente realizada via transretal guiada por ultrassom e composta pela coleta de 8 a 12 núcleos de tecido prostático. Através desta análise, é possível classificar gradualmente a gravidade da doença, com auxílio do sistema de pontuação de Gleason (GREENE *et al*, 2013; SOUZA, 2005).

A decisão de proceder para a biópsia do tecido prostático deve ser principalmente baseada na dosagem de PSA e do DRE, sendo o primeiro amplamente utilizado em *screenings* (triagens). Ainda, devem-se levar em consideração os fatores de risco, histórico de biópsias e comorbidades (GREENE *et al*, 2013). Em comparação com o DRE isolado, o doseamento de PSA associado a este método aumenta em até 81% a detecção do CaP (CASTRO *et al*, 2011). Conforme estudos realizados, é possível predizer o câncer de próstata de 5 até 25 anos antes de sua manifestação clínica através da dosagem dos níveis séricos de PSA (BOTCHORISHVILI *et al*, 2009; LILJA *et al*, 2007).

1.2 ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO (PSA)

1.2.1 ESTRUTURA E ASPECTOS GERAIS

O antígeno prostático específico é uma glicoproteína expressa em altos níveis no epitélio da próstata humana, com a principal função de liquefazer o coágulo seminal após a ejaculação. Além do líquido seminal, pode também estar circulante na corrente sanguínea. A forma mais abundante encontrada neste fluido está covalentemente complexada à proteína α -1-antiquimiotripsina (PSA-ACT), mas também pode aparecer complexada à α -2-macroglobulina (PSA-AMG) ou ainda em uma forma não-complexada ou livre (fPSA) (PÉREZ *et al*, 2011; PIRONEN *et al*, 1998; SAWAYA *et al*, 2004).

Quanto à estrutura, possui cadeia monomérica composta por 237 aminoácidos e com peso molecular de 28 a 34 kDa (PÉREZ *et al*, 2011; PIRONEN *et al*, 1998; SAWAYA *et al*, 2004). Possui o tempo de meia-vida de 2 a 3 dias e tem sua atividade biológica máxima em pH 8,0 (GRETZER *et al*, 2002; PÉREZ *et al*, 2011). Pertencente à família das calicreínas, proteases codificadas por 15 genes, localizados continuamente no cromossomo 19q13.4, o PSA também é denominado hK3 (Calicreína Glandular Humana 3) (SAWAYA *et al*, 2004; SOUZA, 2005).

1.2.2 USO EM DIAGNÓSTICO DE CÂNCER DE PRÓSTATA

O rompimento da arquitetura prostática normal, seja pelo câncer, Hiperplasia Prostática Benigna (BPH, do inglês *Benign Prostate Hiperplasia*) ou dano ligado à glândula (inflamação ou trauma) pode desencadear um aumento nos níveis séricos de PSA no homem. Desta forma, o PSA atua como um marcador para o câncer de próstata, tendo sua dosagem sérica total (tPSA)

amplamente solicitada por urologistas para fins de diagnóstico *screening* desde sua descoberta na década de 80, devido a sua alta disponibilidade (BOTCHORISHVILI *et al*, 2009; CASTRO *et al*, 2011; GERTSON *et al*, 2013; HEALY *et al*, 2005; KIM *et al*, 2011; NA *et al*, 2013; SHARIAT *et al*, 2011; VICKERS *et al*, 2010).

Somente no ano de 2014 no Brasil, mais de 4,8 milhões de testes foram autorizados pelo SUS, totalizando aproximadamente R\$ 79 milhões em exames (DATASUS, 2015). Neste sentido, dados obtidos em estudo realizado nos EUA apontam que pacientes com maior acesso à saúde e status socioeconômico são numericamente mais submetidos à dosagem de PSA do que homens com menores condições. Além disso, o nível de educação também está proporcionalmente correlacionado a este processo (SEO *et al*, 2010).

Embora seu constante uso, o PSA é um marcador órgão-específico e não câncer-específico, justificando, assim, o fato de não ser o método confirmatório no diagnóstico de CaP (CASTRO *et al*, 2011; GERTSON *et al*, 2013; GRETZER *et al*, 2002; NA *et al*, 2013; SHARIAT *et al*, 2011).

Quanto à eficácia, dois grandes estudos foram publicados para avaliar a melhora do prognóstico com o *screening* de PSA. O *PLCO (Prostate, Lung, Colo-rectal and Ovarian) Cancer Screening Trial*, realizado pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI, do inglês *National Cancer Institute*) dos EUA, não encontraram diferenças significativas na comparação do uso ou não destes testes, em um período de 7 a 10 anos. Entretanto, o *ERSPC (European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer)*, nos quais sete países foram inclusos, demonstrou uma redução de, em média, 20% na mortalidade em um período de 9 anos, sendo que, em uma das localidades, a redução chegou a 40% (COHN *et al*, 2013; GERTSON *et al*, 2013; ZELIADT *et al*, 2012).

1.3 NÍVEIS SÉRICOS DE ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO

1.3.1 PONTO DE CORTE (*CUT-OFF*)

Outro aspecto fundamental deste marcador são suas concentrações séricas. Mesmo que muitos estudos e debates de especialistas acerca dos níveis normais de PSA tenham sido realizados, não existe ainda um consenso de um único limiar seguro que consiga distinguir homens com alto ou baixo risco de ser diagnosticado ou desenvolver câncer no futuro. Tampouco é possível medir a gravidade desta neoplasia, embora níveis muito elevados de PSA tenham correlação com altos graus no sistema de pontuação de Gleason e, portanto indiquem

maior gravidade nos casos de CaP (BOTCHORISHVILI *et al*, 2009; KIM *et al*, 2011; SHARIAT *et al*, 2011; THOMPSON JR *et al*, 2011).

Tradicionalmente, a faixa de 4 a 10 ng/mL de PSA é considerada como risco e os pacientes são suspeitos para câncer de próstata. Por esta razão, o valor de 4 ng/mL é comumente aceito como *cut-off* por muitos urologistas (CASTRO *et al*, 2011; GRETZER *et al*, 2002; INGLE, *et al*, 2013; KIM *et al*, 2011; NA *et al*, 2013; THOMPSON *et al*, 2004; ZELIADT *et al*, 2012). Embora este valor apresente sensibilidade de 67,5 a 80%, possui apenas 20 a 30% de especificidade, sendo que a incidência de CaP em pacientes com níveis de PSA abaixo de 4 ng/mL é de 15 a 20% (KIM *et al*, 2011). Portanto, foi analisada a redução deste valor para 2,5 ng/mL (ANGIE, 2010; CATALONA *et al*, 2000; KIM *et al*, 2011; THOMPSON *et al*, 2004).

Estudos demonstrando resultados variados de sensibilidade e especificidade de acordo com os valores de pontos de corte utilizados vem sendo publicados (ANGIE, 2010; BOTCHORISHVILI *et al*, 2009; CATALONA *et al*, 2000; THOMPSON *et al*, 2004). Todavia, é necessário levar em consideração que, reduzindo-se este valor, aumenta-se também a probabilidade da realização de biópsias desnecessárias e da detecção de cânceres de menor complexidade, gerando implicações sociais e psicológicas (CATALONA *et al*, 2000; COHN *et al*, 2013; KIM *et al*, 2011; SHARIAT *et al*, 2011).

1.3.2 VALORES IDADE-ESPECÍFICOS

Tendo em vista esta problemática do ponto de corte e faixa etária regularmente acometida pelo CaP, recentemente foram propostos valores idade-específicos de PSA com o intuito de auxiliar em um diagnóstico mais exato (NA *et al*, 2013). Na Europa e nos Estados Unidos, as faixas de referência atualmente propostas são estratificadas em intervalos de 10 anos a partir dos 40 até os 79 anos de idade, sendo este valor menor em pacientes mais jovens (ANGIE, 2010; CASEY *et al*, 2012). Para as faixas etárias entre 40-49, 50-59, 60-69 e 70-79 anos, valores de 2,5 ng/mL, 3,5 ng/mL, 4,5 ng/mL e 6,5 ng/mL, respectivamente, podem ser utilizados como ponto de corte. Porém, estudos apontam variações em determinadas populações. Apesar de não existirem estudos similares no Brasil, a tabela 1 (CASEY *et al*, 2012) mostra a comparação entre os valores de referência encontrados em diferentes localidades (ANGIE, 2010; CASEY *et al*, 2012; INGLE, *et al*, 2013; NA *et al*, 2013; WINKLER *et al*, 2008).

Tabela 1 – Comparativo de níveis idade-específicos de PSA no mundo

Idade	Americanos Brancos	Americanos Negros	Americanos asiáticos	Japoneses	Coreanos	Jordanianos	Irlandeses
25-29	-	-	-	-	-	1,6	-
30-34	-	-	-	-	1,8	2,3	1,57
35-39	-	-	-	-	1,8	2,9	1,65
40-44	2,5	2,7	2,0	2,0	2,0	3,2	1,85
45-49	2,5	2,7	2,0	2,0	2,0	3,8	2,17
50-54	3,5	4,4	3,5	3,0	2,5	3,8	2,63
55-59	3,5	4,4	3,5	3,0	2,5	3,8	3,25
60-64	4,5	6,7	4,5	4,0	3,9	4,3	4,02
65-69	4,5	6,7	4,5	4,0	3,9	-	4,96
70-79	6,5	7,7	6,5	5,0	6,3	-	-

Fonte: CASEY *et al*, 2012.

Nota: Valores em ng/mL.

Por meio destas adequações de concentração por idade é possível diminuir o número de biópsias desnecessárias realizadas, principalmente, acima dos 60 anos e também aumentar o número de detecções em homens com idades menos avançadas (CASEY *et al*, 2012; INGLE, *et al*, 2013; WINKLER *et al*, 2008).

1.3.3 INTERFERENTES

Uma vez que pequenas variações podem causar diagnósticos errôneos, tornou-se de vital importância analisar quais fatores intrínsecos e extrínsecos podem influenciar positivamente ou negativamente os níveis séricos de PSA. Existem estudos que demonstram interferência de, por exemplo, uso de medicamentos como estatinas (HAMILTON *et al*, 2008) e cigarros (LI *et al*, 2012) ou ainda procedimentos cirúrgicos, como a colonoscopia (BARBATZAS *et al*, 2004).

Os níveis de PSA podem variar de acordo com a idade, etnia e peso, devido a discrepâncias das medições causadas por diferentes métodos e calibradores utilizados. Ainda é possível que o manuseio da amostra, bem como congelamento e descongelamento, ou componentes desta interfiram no resultado (BOTCHORISHVILI *et al*, 2009).

1.4 TESTES RÁPIDOS (POINT-OF-CARE)

1.4.1 ASPECTOS GERAIS

No Brasil, o Sistema Único de Saúde fornece cobertura universal de saúde, utilizada por aproximadamente 80% da população brasileira. Sendo o quinto maior país em extensão territorial, possui diversas áreas com alto índice de pobreza e/ou afastadas de grandes centros urbanos, o que em muitos casos restringe o acesso à saúde nestes pontos. Por este motivo, após a implementação do sistema em 1990, foram adotadas as políticas de descentralização da saúde e foco na assistência primária (IWAYA *et al*, 2013). Entretanto, a grande maioria dos testes para dosagem dos níveis séricos de PSA se dá em laboratórios centralizados, necessitando de técnicas de automação, profissionais treinados e transporte de amostras, além do elevado tempo de espera dos resultados e aumento de consultas, custos médicos e administrativos (HEALY *et al*, 2005, WARSINKE, 2009).

Neste âmbito, a utilização de testes rápidos (derivado do inglês *Point-of-Care*), através da sua descentralização, baixo custo, simplicidade de realização e disponibilidade para o paciente, pode auxiliar na redução do número de consultas e conseqüentemente na desoneração de custos e desobstrução do sistema de saúde. Assim, se faz possível uma maior satisfação dos pacientes e obtenção de melhores resultados clínicos (HEALY *et al*, 2005; WARSINKE, 2009).

Para um teste ser considerado viável para *screening*, ele deve possuir requisitos como alta sensibilidade e especificidade, baixo custo e boa segurança (GERTSON *et al*, 2013). Testes rápidos sem controle de qualidade podem gerar falsos resultados (WARSINKE, 2009). O mercado destes testes teve estimativa de aumento para 2,25 e 1,56 bilhões de dólares nos EUA e Europa, respectivamente, em 2012, consolidando-se cada vez mais como maior crescimento anual no mercado de diagnósticos *in vitro* (WARSINKE, 2009; WONG *et al*, 2012).

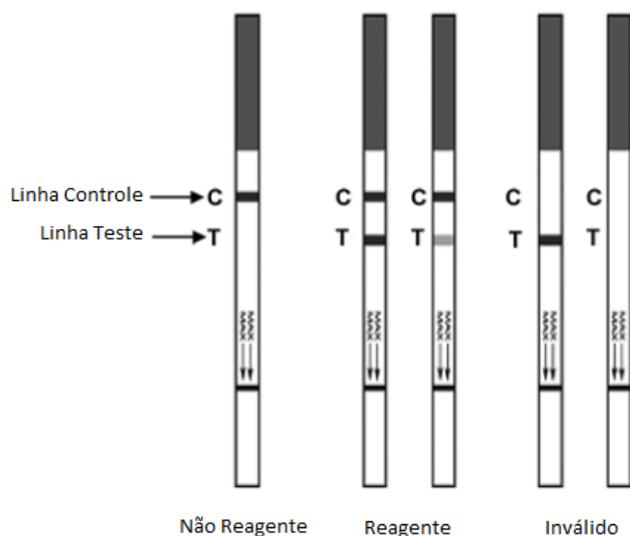
Dentre os testes rápidos mais utilizados está a imunocromatografia (ou imunoensaio de fluxo lateral) que, de modo geral, possui baixo custo, é portátil e produz resultados qualitativos ou semi-quantitativos de boa acurácia e exatidão, sem necessitar de treinamento, instrumentação ou tratamento de amostra. Tem aplicações como pesquisa de antígenos, anticorpos, drogas, hormônios e metabólitos. O exemplo de teste imunocromatográfico mais conhecido é o teste de gravidez (detecção de hCG) (POSTHUMA-TRUMPIE *et al*, 2008; TANAKA *et al*, 2006; WARSINKE, 2009).

1.4.2 IMUNOCROMATOGRAFIA

Como em outras cromatografias, esta é composta por uma fase fixa (sólida) e outra móvel (líquida). Tratando-se de um teste imunocromatográfico para PSA, esta primeira fase é uma membrana porosa de nitrocelulose, onde são dispersos em linha anticorpos específicos para detecção da glicoproteína e a segunda, corresponde à amostra. O líquido migra do ponto de aplicação até a outra extremidade por capilaridade, passando através de uma zona contendo os mesmos anticorpos, porém conjugados a nanopartículas de ouro coloidal (AuNP) (DYKMAN *et al*, 2012; GORYACHEVA *et al*, 2013; WILSON, 2008) e formando complexos antígeno-anticorpo na presença do PSA. O complexo reage, ligando-se, então, com os anticorpos fixados na membrana ocasionando a visualização (observado a olho nu) de uma linha de cor rósea, devido à coloração das AuNPs. Esta linha é denominada “linha teste” e tem intensidade proporcional à quantidade de complexos ligados, sendo possível semi-quantificar a presença de PSA.

No caso de uma amostra negativa ou com concentração abaixo do limite de detecção, não há formação do complexo, portanto não gerando linha teste. Uma vez que o princípio do método é dependente da migração da amostra, caso esta não ocorra, ele se torna inválido, devendo ser repetido. A fim de identificar esta migração da amostra, é imobilizada na membrana outra linha de anticorpos que reconheçam especificamente o anticorpo cujas AuNPs foram conjugadas, denominando-se “linha controle”. Assim, na ausência ou em concentração indetectável de PSA na amostra, ocorrerá a visualização de cor apenas na linha controle, enquanto que na presença do antígeno, as duas linhas apresentarão o fenômeno (BIAGINI *et al*, 2006; MILLIPORE CORP., 2008; PALL CORP.; POSTHUMA-TRUMPIE *et al*, 2008; TANAKA *et al*, 2006; WONG *et al*, 2012).

Figura 1 – Esquema de resultados da imunocromatografia



Fonte: XIANG *et al.*, 2012.

1.5 FK BIOTECNOLOGIA

1.5.1 ASPECTOS GERAIS E LINHAS DE PESQUISA

A FK Biotecnologia S.A é uma empresa nacional de base biotecnológica, fundada em 1999, atuando em pesquisa, desenvolvimento e inovação com foco na área de imunodiagnóstico humano, vacinas terapêuticas anticâncer e nanobiotecnologia. Vinculada ao Programa INOVAR da FINEP, a empresa atua como parceiro e colaborador de instituições como Instituto Nacional de Nanobiotecnologia (UnB), Instituto Nacional de Pesquisa Translacional em Medicina (UFRGS) e Projeto CABBIO (Centro Argentina-Brasil de Biotecnologia), via CNPq. A empresa é parceira do Laboratório de Pesquisa em Imunodiagnóstico da PUCRS (LID-PUCRS).

Além da linha de produtos já desenvolvidos, a empresa investe mais de 60% de seu orçamento anual em atividades de pesquisa, desenvolvimento e inovação para produtos de alto valor agregado. O domínio da tecnologia que envolve o desenvolvimento, produção e manutenção de hibridomas é um dos pilares tecnológicos da FK Biotecnologia. A empresa possui autorização de funcionamento da ANVISA, apresentando, portanto, uma estrutura de produção adequada para a realização de suas atividades.

1.5.2 TESTE RÁPIDO DA EMPRESA

Desenvolvido na FK Biotecnologia, o ensaio imunocromatográfico permite a rápida semi-quantificação do PSA em soro. O produto consiste em uma fita-teste, embalada em sachê aluminizado. Nela há uma membrana de nitrocelulose sensibilizada com anticorpos, formando as linhas “teste” e “controle”. Após a aplicação e migração da amostra, as linhas apresentarão (ou não) intensidades de cor. Para realizar a leitura dos resultados, o teste possui uma escala de intensidade de cor onde cada uma corresponde respectivamente a sua concentração de PSA sérico, assim permitindo ao usuário semi-quantificar sua amostra.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o estudo de validação de um ensaio imunocromatográfico desenvolvido por uma empresa brasileira para semi-quantificação de antígeno prostático específico em soro.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Validar, por meio de ensaios, o comportamento do teste descrito acima frente a amostras sorológicas, através da verificação de parâmetros como sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos, além da reprodutibilidade do mesmo.

3 METODOLOGIA

3.1 AMOSTRAS

A soroteca utilizada neste estudo foi proveniente do biorrepositório do Laboratório de Pesquisa em Imunodiagnóstico da PUCRS (LID-PUCRS), abastecido a partir de amostras obtidas da rotina do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital São Lucas (HSL). As amostras foram catalogadas em um software personalizado e armazenadas a -80°C no LID. O biorrepositório possui aprovação no CEP-PUCRS sob o protocolo número 10/05215.

A quantificação de PSA foi realizada pelo método de quimioluminescência, tidos como ensaios de alta sensibilidade e especificidade. Foram testadas 298 amostras, com valores variando de 0,01 a 359 ng/mL e numeradas aleatoriamente.

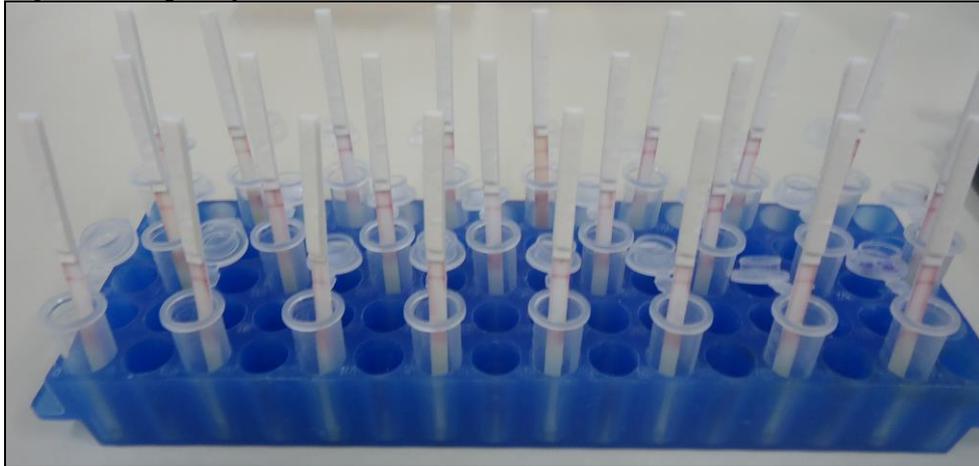
Não foi realizada a pesquisa de agentes infecciosos (como HIV, HCV, HBV, etc) ou fator reumatoide, possibilitando a presença destes nas amostras. Amostras contendo elevado grau de hemólise ou lipemia, com volume insuficiente ou sem valores fornecidos não foram utilizadas neste estudo.

Todos os posteriores ensaios utilizando as amostras, bem como os testes rápidos, foram realizados nas dependências do LID-PUCRS.

3.2 PROCEDIMENTO PADRÃO DO TESTE RÁPIDO

Após o descongelamento total das amostras, estas foram homogeneizadas e 150 μL de cada uma foram pipetados em um microtubo identificado com o respectivo código da amostra. Em cada microtubo, uma fita-teste foi introduzida verticalmente com a área de aplicação voltada para baixo, observando a migração da amostra pela membrana em fluxo ascendente e a formação (ou não) das linhas controle e teste (figura 2). Caso não houvesse sinal na linha controle, o teste seria ser repetido. Após 5 minutos, as fitas foram cortadas na parte inferior da membrana a fim de parar a migração da amostra. Em seguida, foi realizada a leitura e o registro dos resultados para posterior análise.

Figura 2 – Aplicação das amostras

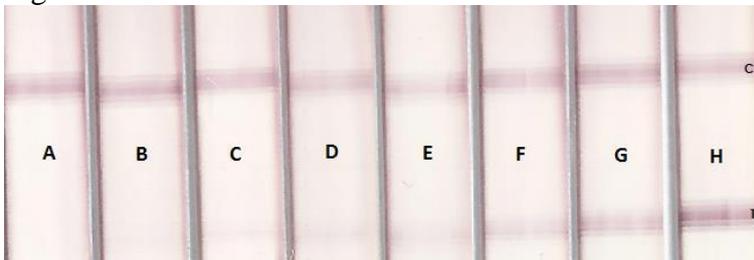


Fonte: O autor, 2015.

3.3 ESCALA DE CORES

Primeiramente, foram escolhidas oito amostras de acordo com a concentração de PSA medida no método de quimioluminescência e executado um teste para cada, utilizando o mesmo procedimento descrito no item 3.2. Posteriormente, foram coladas em folha A4 lado a lado, com concentração crescente, formando uma escala com coloração crescente na linha teste (figura 3).

Figura 3 – Escala de cores



Fonte: O autor, 2015.

Legenda: **A:** 0 ng/mL; **B:** 1 ng/mL; **C:** 2 ng/mL; **D:** 4 ng/mL; **E:** 7 ng/mL; **F:** 10 ng/mL; **G:** 20 ng/mL; **H:** 100 ng/mL; **c:** Linha Controle; **T:** Linha Teste.

3.4 ENSAIOS DE VALIDAÇÃO REALIZADOS

3.4.1 REPRODUTIBILIDADE

Após a criação da escala de cores, foi escolhida uma amostra representativa de cada intervalo abaixo, como mostra a tabela 2:

Tabela 2 – Amostras e respectivas concentrações escolhidas

Intervalo de Concentração de PSA (ng/mL)	Concentração de PSA da amostra representativa (ng/mL)
0,01 - 0,99	0,65
1,00 - 3,99	3,96
4,00 - 10,00	9,02
> 10,00	47,68

Fonte: O autor, 2015.

A seguir, para verificar a reprodutibilidade do teste, foram executadas cinco análises para cada amostra em momentos diferentes.

3.4.2 ENSAIO DE CORRELAÇÃO

Foi feita a análise das 298 amostras da soroteca em dia único, sendo estas ordenadas de forma aleatória e sem o conhecimento da concentração de PSA informada pelo método de quimioluminescência do Hospital São Lucas. Os resultados foram obtidos comparando a intensidade de cor obtida pela linha teste com os oito níveis na escala de cores, classificando assim cada amostra nestes níveis.

3.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS

3.5.1 DADOS ESTATÍSTICOS

Através dos resultados do item anterior e com auxílio do software SPSS, foi gerada a curva ROC para avaliar qual o melhor *cut-off* do teste e, a partir dele, calcular a sensibilidade, especificidade e valores preditivo negativo e positivo de acordo com a Figura 4.

Figura 4 – Cálculo dos dados estatísticos

		Quimioluminescência	
		> 4 ng/mL	< 4 ng/mL
Teste Rápido	> <i>cut-off</i>	A	B
	< <i>cut-off</i>	C	D

$$\text{Sensibilidade} = A / (A + C) * 100$$

$$\text{Especificidade} = D / (B + D) * 100$$

$$\text{Valor Preditivo Positivo} = A / (A+B) * 100$$

$$\text{Valor Preditivo Negativo} = D / (D+C) * 100$$

Fonte: O autor, 2015, adaptada de GUIMARÃES, 1985.

Nota: Os valores de A, B, C, e D referem-se ao número de amostras classificadas em cada intervalo.

4 RESULTADOS

4.1 AMOSTRAS

Das 298 amostras estudadas, 224 (75,17%) possuíam concentração de PSA abaixo de 4,00 ng/mL de acordo com o ensaio de quimioluminescência, enquanto que 74 (24,83%) eram superiores a este valor (tabela 3).

Tabela 3 – Distribuição de amostras por faixa de concentração de PSA

Concentração de PSA (ng/mL)	<i>n</i>	%
0,01 – 0,99	124	41,61%
1,00 – 3,99	100	33,56%
4,00 – 10,00	45	15,10%
> 10,00	29	9,73%
Total	298	100%

Fonte: O autor, 2015.

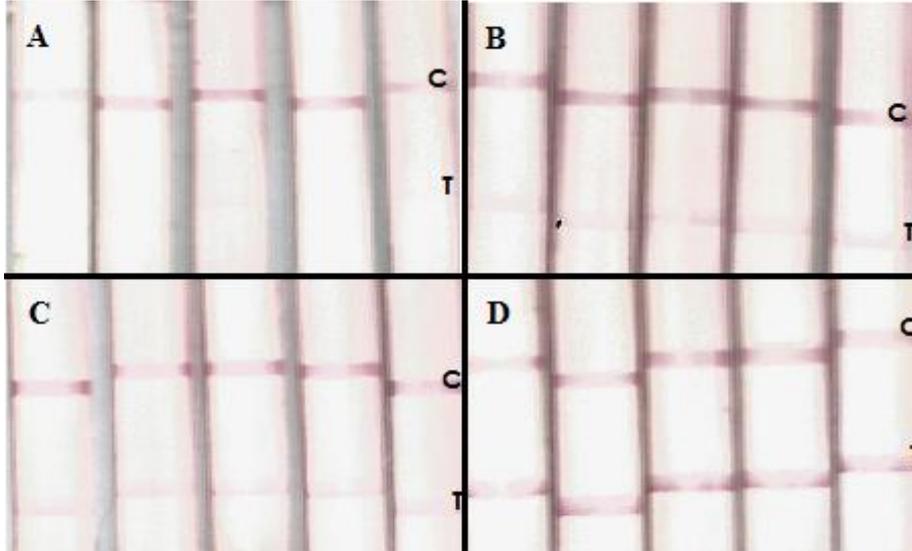
4.2 REPRODUTIBILIDADE

Todas as cinco repetições de cada amostra escolhida apresentaram intensidade de cor idêntica na linha teste, como mostra a figura 5. Todos os testes tiveram marcação da linha controle e as linhas mostraram-se homogêneas.

4.3 CURVA ROC

Após a geração da curva ROC, foi constatado que o *cut-off* onde há melhor relação sensibilidade/especificidade para o teste rápido em estudo foi no nível C da escala de cores, como mostra a gráfico 1 e a tabela 4.

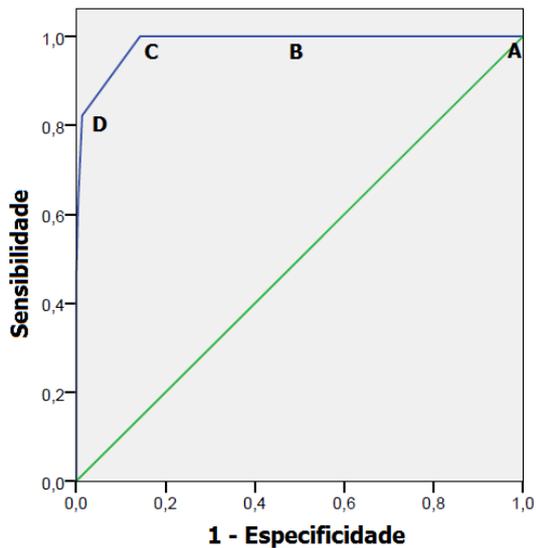
Figura 5 – Resultado do ensaio de reprodutibilidade



Fonte: O autor, 2015.

Legenda: **A**: 0,65 ng/mL; **B**: 3,96 ng/mL; **C**: 9,02 ng/mL; **D**: 47,68 ng/mL; **c**: Linha Controle; **T**: Linha Teste.

Gráfico 1 – Curva ROC



Fonte: O autor, 2015.

Tabela 4 – Pontos da curva ROC

Níveis	Sensibilidade	1 - Especificidade
A	1,000	1,000
B	1,000	0,504
C	1,000	0,143
D	0,824	0,013
E	0,630	0,004
F	0,452	0,000
G	0,288	0,000
H	0,164	0,000

4.4 DADOS ESTATÍSTICOS

Admitindo como *cut-off* para o teste rápido o nível C da escala de cores, as amostras foram classificadas conforme a figura 4, exibida anteriormente no item 3.5.1. A figura 6 demonstra os resultados encontrados.

Figura 6 – Número de amostras classificadas com *cut-off* nível C

		Quimioluminescência	
		≥ 4 ng/mL	< 4 ng/mL
Teste Rápido	C - H	74	32
	A - B	0	192

Fonte: O autor, 2015.

A partir destes dados, o teste apresentou os seguintes parâmetros:

- Sensibilidade = 100%
- Especificidade = 85,71%
- Valor Preditivo Positivo = 69,81%
- Valor Preditivo Negativo = 100%

De um total de 224 amostras com concentração inferior a 4,00 ng/mL, 32 destas (14,29%) foram classificadas com intensidade de cor na linha teste acima do *cut-off*, representando resultados “falso-positivos” (FP).

Dos 32 falso-positivos encontrados no estudo, aproximadamente dois terços delas ($n = 21$; 65,6%) ocorreram em amostras com concentração de PSA de 2,00 a 3,99 ng/mL, sendo o restante presente nas concentrações inferiores a 2,00 ng/mL (tabela 5).

Tabela 5 – Número de falso-positivos por faixa de concentração de PSA

Intervalo de Concentração de PSA (ng/mL)	FP	%
0,01 a 1,99	11	34,4
2,00 a 3,99	21	65,6
Total	32	100

Fonte: O autor, 2015.

Legenda: **FP**: falso-positivos; **%**: percentual.

Entretanto, foi constatada uma significativa diferença no percentual destes falso-positivos em relação ao número de amostras analisadas de cada respectivo intervalo. No intervalo mais baixo, foram 11 ocorrências em 176 amostras testadas (5,88%), enquanto que no outro, das 37 amostras, 21 destas (56,76%) apresentaram incoerências de resultado entre os dois métodos. Nesta faixa, inclusive, o número de falso-positivos foi superior ao de verdadeiros-positivos (VP): 21 contra 16 (tabela 6).

Tabela 6 – Número de verdadeiros-positivos e falso-positivos por faixa de concentração de PSA

Intervalo de Concentração de PSA (ng/mL)	<i>n</i>	VP (%)	FP (%)
0,01 a 1,99	187	176 (94,12)	11 (5,88)
2,00 a 3,99	37	16 (43,24)	21 (56,76)
Total	224	192	32

Fonte: O autor, 2015.

Legenda: **VP**: verdadeiros-positivos; **FP**: falso-positivos; **%**: percentual.

4.5 CONSIDERAÇÕES GERAIS DOS ENSAIOS

Durante a realização de todos os 298 testes, não houve registro de nenhum teste inválido (sem apresentação de coloração na linha controle). Ainda, todos os testes apresentaram marcação das linhas de forma homogênea.

5 DISCUSSÃO

Conforme os dados encontrados no ensaio de reprodutibilidade, o teste rápido apresentou uma alta capacidade de produzir resultados semelhantes quando testado sob as mesmas condições, em momentos distintos e sob quaisquer concentrações de PSA. A partir disto, pode-se admitir que o resultado encontrado em um teste único é significativo. Desta forma, foi possível realizar a validação utilizando apenas uma fita-teste por amostra, despendendo menor quantidade desta sem perder qualidade na obtenção dos resultados.

Os resultados obtidos utilizando o nível C na escala de cores expressaram dados estatísticos de desempenho satisfatórios. Primeiramente, a sensibilidade do teste rápido encontrada foi de 100%, onde todas 74 amostras com concentração de PSA acima de 4,00 ng/mL – segundo o método de quimioluminescência – foram classificadas acima do *cut-off* no teste rápido. Ou seja, todas foram consideradas “verdadeiras positivas”, não apresentando nenhum resultado “falso-negativo”. Desta forma, o valor preditivo negativo também foi de 100%. Criando uma hipótese e assumindo que em concentrações de PSA a partir de 4,00 ng/mL há risco de possuir câncer de próstata, todos os pacientes pertencentes a este grupo seriam encaminhados corretamente para a realização de outros testes e nenhum seria liberado erroneamente.

No caso da especificidade, o valor encontrado foi de 85,71%. Hipoteticamente, 32 pacientes que deveriam ser liberados seriam encaminhados para testes posteriores sem necessidade, caracterizando diagnósticos falso-positivos. Uma vez que o número de amostras falso-positivas foi elevado, o valor preditivo positivo encontrado foi de 69,81%.

De acordo com as tabelas 5 e 6, é perceptível que a faixa de concentração de PSA com maior incidência de erros é de 2,00 a 3,99 ng/mL. Este fato se deve basicamente a dois fatores:

1. A intensidade de cor obtida em uma concentração de 2,00 ng/mL é muito próxima da coloração encontrada em uma amostra de concentração 3,00 ng/mL, podendo causar leituras errôneas;

2. O *cut-off* utilizado no teste (nível C da escala de cores) corresponde a 2,00 ng/mL de PSA sérico, havendo uma lacuna entre os métodos comparados nesta faixa de concentração.

Utilizando a análise ROC, uma alternativa para reduzir a incidência de resultados falso-positivos e, conseqüentemente, melhorar a especificidade seria elevar o *cut-off* utilizado no

teste. Para fins de comparação, se fosse aplicado o *cut-off* no estudo utilizando o nível D da escala de cores (correspondente a 4,00 ng/mL), os resultados seriam os seguintes:

Figura 7 – Número de amostras classificadas com *cut-off* nível D

		Quimioluminescência	
		≥ 4 ng/mL	< 4 ng/mL
Teste Rápido	D - H	61	3
	A - C	13	221

Fonte: O autor, 2015.

- Sensibilidade = 82,43%
- Especificidade = 98,66%
- Valor Preditivo Positivo = 95,31%
- Valor Preditivo Negativo = 94,44%

Nesta situação, os valores da especificidade e valor preditivo positivo seriam aumentados significativamente, enquanto o contrário aconteceria com a sensibilidade e valor preditivo negativo. Tendo em vista a importância do diagnóstico precoce do câncer de próstata e que este é um teste de triagem (*screening*), é preferível que este seja mais sensível, mesmo que haja uma queda na especificidade. Em outras palavras, visando à saúde do paciente, é preferível que pacientes sejam submetidos a exames desnecessários do que liberados de forma equivocada.

Vale ressaltar que este é apenas um estudo preliminar do produto. Em um produto atualmente no mercado, por exemplo, os valores da sensibilidade e especificidade foram de 98,7% e 98,5%, respectivamente (IMUNOCROM, 2014).

No período da realização dos testes, foram encontradas limitações que demandam alterações e novos métodos de avaliação para que o teste rápido possa ser introduzido à prática de saúde pública e comercialização.

Como limitação, podemos abordar, primeiramente, a amostragem utilizada, onde o número de amostras de concentração de PSA acima ($n = 74$; 24,83%) e abaixo ($n = 224$; 75,17%) de 4,00 ng/mL foi reduzido devido à dificuldade de acesso a estas. Além disto, foram testadas apenas amostras de soro enquanto que em uma situação prática (análise em consultórios médicos ou postos de saúde, por exemplo) se faz uso de sangue total por não precisar de tratamento prévio de amostra. Em estudo similar, foram utilizadas 156 e 270, respectivamente nos mesmos intervalos, sendo elas de plasma e sangue total (IMUNOCROM, 2014).

Outra limitação constatada foi de que as intensidades de cor obtidas entre alguns níveis da escala foram semelhantes. Em outras palavras, a intensidade de cor obtida em um teste classificado como B era próxima a C, assim como esta era próxima a D, dificultando a leitura dos resultados. Este fato representa a dificuldade de se utilizar testes imunocromatográficos para semi-quantificação de analitos, uma vez que a interpretação dos resultados é dada visualmente a olho nu.

Entretanto, existem *scanners* que possuem a capacidade de quantificar esta intensidade de cor (KARIM *et al*, 2007) e auxiliar na interpretação dos resultados obtidos nos testes imunocromatográficos. Se estes dispositivos forem aliados à ubiquidade dos aparelhos celulares, a “saúde móvel” pode surgir como uma ferramenta de oportunidade.

Conhecida em inglês como *mHealth*, o termo “saúde móvel” pode ser definido como a integração de uma tecnologia móvel, bem como computação móvel e dispositivos portáteis, como *smartphones*, *tablets* e *laptops*, em prol da geração ou aprimoramento da assistência médica (BARTON, 2012; KLASNJA *et al*, 2012; KUMAR *et al*, 2013; KVEDAR *et al*, 2011; IWAYA *et al*, 2013).

Uma vez que o ensaio e o sistema de detecção sejam padronizados, um estudo clínico utilizando esta metodologia em associação com o exame de toque retal poderia ser desenhado. A avaliação de sensibilidade e especificidade clínica (detecção de CaP) é uma variável que deveria ser incluída nesta análise, bem como as questões fármaco-econômicas (GUIMARÃES *et al*, 2007).

6 CONCLUSÃO

Através dos dados obtidos a partir deste estudo preliminar, o teste rápido desenvolvido por uma empresa brasileira mostrou-se amplamente funcional e satisfatoriamente seguro. Mais estudos se fazem necessários para otimização destes ensaios, além de se desenvolver um sistema que possa quantificar a intensidade de cor das linhas, associando a algum tipo de dispositivo de *mHealth*.

Se aplicado à saúde pública brasileira, o teste rápido pode trazer uma vasta gama de benefícios. Uma vez que se trata de uma metodologia de baixo custo e simples execução, o produto pode auxiliar na melhora da disponibilidade ao diagnóstico em regiões onde o atendimento à população é restrito por diversos fatores. Ainda, visto que o resultado é interpretado em poucos minutos, é possível realizar uma triagem dos pacientes em consultórios médicos ou postos de saúde, reduzindo o número de exames e consultas desnecessárias.

Como consequência destes elementos, torna-se viável a desobstrução e desoneração de estabelecimentos, assim como a descentralização da saúde no país.

REFERÊNCIAS

ANGIE, Michelle A. Accurate use of prostate-specific antigen in determining risk of prostate cancer. **The Journal for Nurse Practicioners**, v. 6, p. 177-185, Mar. 2010.

BARBATZAS, C; DELLIS, A; GRIVAS, I; TRAKAS, N; EKONOMOU, A; KOSTAKOPOULOS, A. Colonoscopy effects on serum prostate specific antigen levels. **International Urology and Nephrology**, v. 36, p. 203-206, 2004.

BARTON, Amy J. The regulation of mobile health applications. **BMC Medicine**, v. 10, p. 46-50, 2012.

BIAGINI, Raymond E; SAMMONS, Deborah L; SMITH, Jerome, P; MACKENZIE, Barbara A; STRILEY, Cynthia A. F; SNAWDER, John E; *et al.* Rapid, sensitive and lateral-flow immunochromatographic device to measure anti-anthrax protective antigen immunoglobulin G in serum and whole blood. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 5, p. 541-546, May. 2006.

BOTCHORISHVILI, George; MATIKAINEN, Mika P; LILJA, Hans. Early prostate-specific antigen changes and the diagnosis and prognosis of prostate cancer. **Current Opinion in Urology**, v. 19, p. 221-226, May. 2009.

CATALONA, William J; RAMOS, Christian G; CARVALHAL, Gustavo F; YAN, Yan. Lowering PSA cutoffs to enhance the chance of curable prostate cancer. **Urology**, v. 55, p. 791-795, 2000.

CASEY, R. G; HEGARTY, P. K; CONROY, R; REA, D; BUTLER, M. R; GRAINGER, R; MCDERMOTT, Ted; THORNHILL, J. A. The Distribution of PSA age-specific profiles in healthy irish men between 20 and 70. **ISRN Oncology**, v. 2012, 4 p., 2012.

CASTRO, Hugo Alexandre Sócrates de; IARED, Wagner; SHIGUEOKA, David Carlos; MOURÃO, José Eduardo; AJZEN, Sérgio; *et al.* Contribuição da densidade do PSA para predizer o câncer da próstata em pacientes com valores de PSA entre 2,6 e 10,0 ng/mL. **Radiologia Brasileira**, v. 44, p. 205-209, Jul/Ago. 2011.

COHN, Joshua A; WANG, Chihsiung E; LAKEMAN, Justin C; SILVERSTEIN, Jonathan C; BRENDLER, Charles B; *et al.* Primary care physician PSA screening practices before and after the final U.S. Preventive Pervices Task Force recommendation. **Urologic Oncology**, p. 1-8, 2013.

DATASUS. Departamento de Informática do SUS, Brasil. **Informações epidemiológicas e morbidade**, 2015. Disponível em:
<<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sia/cnv/qauf.def>> Acesso em: 27 Abr. 2015.

DYKMAN, Lev; KHLEBTSOV, Nikolai. Gold nanoparticles in medical applications: recent avances and perspectives. **Chemical Society Reviews**, v. 41, 2256-2282, 2012.

GJERTSON, Carl K; ALBERTSEN, Peter C. Use and assessment of PSA in prostate cancer. **Medical Clinics of North America**, n. 95, p. 199-200, 2011.

GORYACHEVA, Irina Yu; LENAIN, Pieterjan; SAEGER, Sarah De. Nanosized labels for rapid immunotests. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 46, p. 30-43, 2013.

GREENE, Kirsten L; ALBERTSEN, Peter C; BABAIAN, Richard J; CARTER, H. Ballentine, GAHN, Peter H; *et al.* Prostate specific antigen best practice statement: 2009 update. **The Journal of Urology**, v. 189, p. S2-S11, 2013.

GRETZER, Matthew B; PARTIN, Alan W. PSA levels and the probability of prostate cancer on biopsy. **European Urology Supplements**, v. 1, p. 21-27, 2002.

GUIMARÃES, Hélio Penna; BARBOSA, Lílian Mazza; LARANJEIRA, Lígia Nasi; AVEZUM, Álvaro. Estudos de farmacoeconomia e análises econômicas: conceitos básicos. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 14(4), p. 265-268, 2007.

GUIMARÃES, M. Carolina S. Exames de laboratório: sensibilidade, especificidade, valor Preditivo positivo, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n. 18(2), p. 117-120, 1985.

HEALY, Declan A; HAYES, Conor J; LEONARD, Paul; MCKENNA, Louise; O'KENNEDY, Richard; *et al.* Biosensor developments: application to prostate-specific antigen detection. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 125-132, Jan. 2007.

HAMILTON, Robert J; GOLDBERG, Kenneth C; PLATZ, Elizabeth A; FREEDLAND, Stephen J. The influence of statin medications on prostate-specific antigen levels. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 200, i. 21, 1511-1518, 2008.

IMUNOCROM. **Instruções de uso – PSA**, r. 04, p. 1-2, 2014.

INGLE, S. P; INGLE, Ramona; SUKESH. The efficiency of the sérum prostate-specific antigen in diagnosing prostatic enlargements. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, p. 82-84, 2013.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Ministério da Saúde, Brasil. **Incidência de câncer no Brasil**, 2015. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>> Acesso em: 27 Abr. 2015.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Ministério da Saúde, Brasil. **Câncer de próstata**, 2015. Disponível em <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata>> Acesso em: 27 Abr. 2015.

IWAYA, L. H; GOMES, M. A. L; SIMPLÍCIO, M. A; CARVALHO, T. C. M. B; DOMINICINI, C. K; *et al.* Mobile health in emerging countries: A survey of research initiatives in Brazil. **International Journal of Medical Informatics**, v. 82, p. 283-298, 2013.

KARIM, O; RAO, A; EMBERTON, M; COCHRANE, D; PARTRIDGE, M; EDWARDS, P; WALKER, I; DAVIDSON, I. Point-of-care PSA testing: an evaluation of PSAwatch. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases - Nature Publishing Group**, v. 10, p. 270-273, 2007.

KIM, Hyoung Woo; KO, Young Hwii; KANG, Seok Ho; LEE, Jeong Gu. Predictive factors for prostate cancer in biopsy of patients with prostate-specific antigen levels equal to or less than 4 ng/mL. **Korean Journal of Oncology**, v. 52, p. 166-171, Feb. 2011.

KLASNJA, Predrag; PRATT, Wanda. Healthcare in the pocket: mapping the space of mobile-phone health interventions. **Journal of Biomedical Informatics**, v. 45, p. 184-198, Feb. 2012.

KVEDAR, Joseph C; NESBITT, Thomas; KVEDAR, Julie G; DARKINS, Adam. E-patient connectivity and the near term future. **Journal of General Intern Medicine**, v. 26 (suppl 2), p. 636-638, 2011.

KUMAR, Santosh; NILSEN, Wendy J; ABERNETHY, Amy; ATIENZA, Audie; PATRICK, Kevin; *et al.* Mobile health technology evaluation. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 45, p. 228-236, 2013.

LEE, Sangdae; KIM, Giyoung; MOON, Jihea. Performance improvement of the one-dot lateral flow immunoassay for aflatoxin B1 by using a smartphone-based Reading system. **Sensors**, v. 13, p. 5109-5116, 2013.

LI, Jun; THOMPSON, Trevor; JOSEPH, Djenaba A; MASTER, Viraj A. Association between smoking status and free, total and percent free PSA. **The Journal of Urology**, v. 187, p. 1228-1233, 2012.

LILJA, Hans; ULMERT, David; BJORK, Thomas; BECKER, Charlotte; SERIO, Angel M; *et al.* Long-term prediction of prostate cancer up to 25 years before diagnosis of prostate cancer using prostate kallikreins measured at age 44 to 50 years. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 4, p. 431-437, 2007.

LIMA, Nelson Gianni de; SOARES, Daniel de Freitas Gomes; RHODEN, Ernani Luis. Importance of prostate-specific antigen (PSA) as a predictive factor for concordance between the Gleason scores of prostate biopsies and radical prostatectomy specimens. **Clinics**, v. 68, p. 820-824, 2013.

MILLIPORE CORPORATION. **Rapid lateral flow test strips: considerations for product development**, p. 1-42, 2008.

NA, Rong; WU, Yishuo; XU, Jianfeng; JIANG, Haowen; DING, Qiang. Age-specific prostate specific antigen cutoffs for guiding biopsy decision in Chinese population. **Plos One**, v. 8, i. 6, p. 1-9, Jun. 2013.

PALL CORPORATION. **Immunochromatographic, Lateral flow or Strip tests development ideas**, 7p, 1998.

PÉREZ, Lilian; ZULUETA, Orlando; MELCHOR, Antonio; HERNÁNDEZ, Liliana; LÓPEZ, Raquel; CAZANAVE, Julliette; BÉQUER, Dunia. Purification of human PSA from seminal plasma by immunoaffinity chromatography using a monoclonal antibody anti total PSA. **Hyberidoma**, v. 30, n. 3, p. 247-253, 2011.

PIRONEN, Timo; VILLOUTREIX, Bruno O; BECKER, Charlotte; HOLLINGSWORTH, Kelly; VIHINEN, Mauno; *et al.* Determination and analysis of antigenic epitopes of prostate

specific antigen (PSA) and human glandular kallikrein 2 (hK2) using synthetic peptides and computer modeling. **Protein Science**, v. 7, p. 259-269, 1998.

POSTHUMA-TRUMPIE, Geertruida A; KORF, Jakob; VAN AMERONGEN, Aart. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, p. 569-582, Aug. 2008.

SAWAYA, M. C. T; ROLIM, M. R. S. Antígeno específico da próstata em fluidos biológicos: aplicação forense. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 2, p. 109-116, Dez. 2004.

SEO, Hyung Seok; LEE, Nam Kyu. Predictors of PSA screening among men over 40 years of age who had ever heard about PSA. **Korean Journal of Urology**, v. 51, p. 391-397, May. 2010.

SHARIAT, Shahrokh; SEMJONOW, Axel; LILJA, Hans; SAVAGE, Caroline; VICKERS, Andrew J; BJARTELL; Anders. Tumor markers in prostate cancer: blood-based markers. **Acta Oncologica**, v. 50 (suppl 1), p. 61-75, Jun. 2011.

SOUZA, Magda Edinger de. **Influência da ingestão dietética de extrato de tomate nos níveis plasmáticos de antígeno prostático específico (PSA) em pacientes com hiperplasia benigna da próstata**. 2005. 200 f. Dissertação de Mestrado em Medicina – Faculdade de Medicina, UFRGS, Porto Alegre, 2005.

TANAKA, Ryo; YUHI, Teruko; NAGATANI, Naoki; ENDO, Tatsuro; KERMAN, Kagan; TAKAMURA, Yuzuru; TAMIYA, Eiichi. A novel enhancement assay for immunochromatographic test strips using gold nanoparticles. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 385, p. 1414-1420, Jul. 2006.

THOMPSON, Ian M; PAULER, Donna K; GOODMAN, Phyllis J; TANGEN, Catherine M; LUCIA, M. Scott; *et al.* Prevalence of prostate cancer among men with a PSA level <4,0 ng/mL. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 22, May. 2004.

THOMPSON JR, Ian M; LEACH, Robin J; ANKERST, Donna P. Prostate cancer detection: a view of the future. **European Urology**, v. 59, p. 191-193, Feb. 2011.

VICKERS, Andrew J; CRONIN, Angel M; ROOBOL, Monique J; HUGOSSON, Jonas; JONES, J. Stephens; *et al.* The relationship between prostate-specific antigen and prostate cancer risk: the prostate biopsy collaborative group. **Clinical Cancer Research**, v. 16, p. 4374-4381, Sep. 2010.

WARSKINE, Axel. Point-of-care testing of proteins. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, p. 1393-1405, Jan. 2009.

WILSON, Robert. The use of gold nanoparticles in diagnostics and detection. **Chemical Society Review**, v. 37, p. 2028-2045, 2008.

WINKLER, M. H; MAYER, E. K; CARTER, A; KULINSKAYA, E; GREEN J. S. A; *et al.* Age-specific PSA reference values based on a screening population of British men. **British Journal of Medical and Surgical Urology**, v. 1, p. 25-30, 2008.

WONG, Raphael; TSE, Harley. **Lateral Flow Immunoassay**. 1 ed. Lexington: Humana Press, 2012. 223 p.

XIANG, Tingxiu; JIANG, Zheng; ZHENG, Jian; LO, Chaoyu; TSOU, Harry; REN, Guosheng; ZHANG, Jun; HUANG, Ailong; LAI, GUOQI. A novel double antibody sandwich-lateral flow immunoassay for rapid and simple detection of hepatitis C virus. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 30, p. 1041-1047, Aug. 2012.

YOU, David J; PARK, Tu San; YOON, Jeong-Yeol. Cell-phone-based measurement of TSH using Mie scatter optimized lateral flow assays. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 40, p. 180-185, 2013.

ZELIADT, Steven B; BUIST, Diana S. M; REID, Robert J; GROSSMAN, David C; MA, Jian; ETZIONI, Ruth; *et al.* Biopsy follow-up of prostate-specific antigen testes. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 42, p. 37-43, Jan. 2012.