



Centro de Biotecnologia  
Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional  
**IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES  
URINÁRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DO  
CÂNCER DE PRÓSTATA**

Raiane Medeiros Pinheiro, Karina Mariante Monteiro

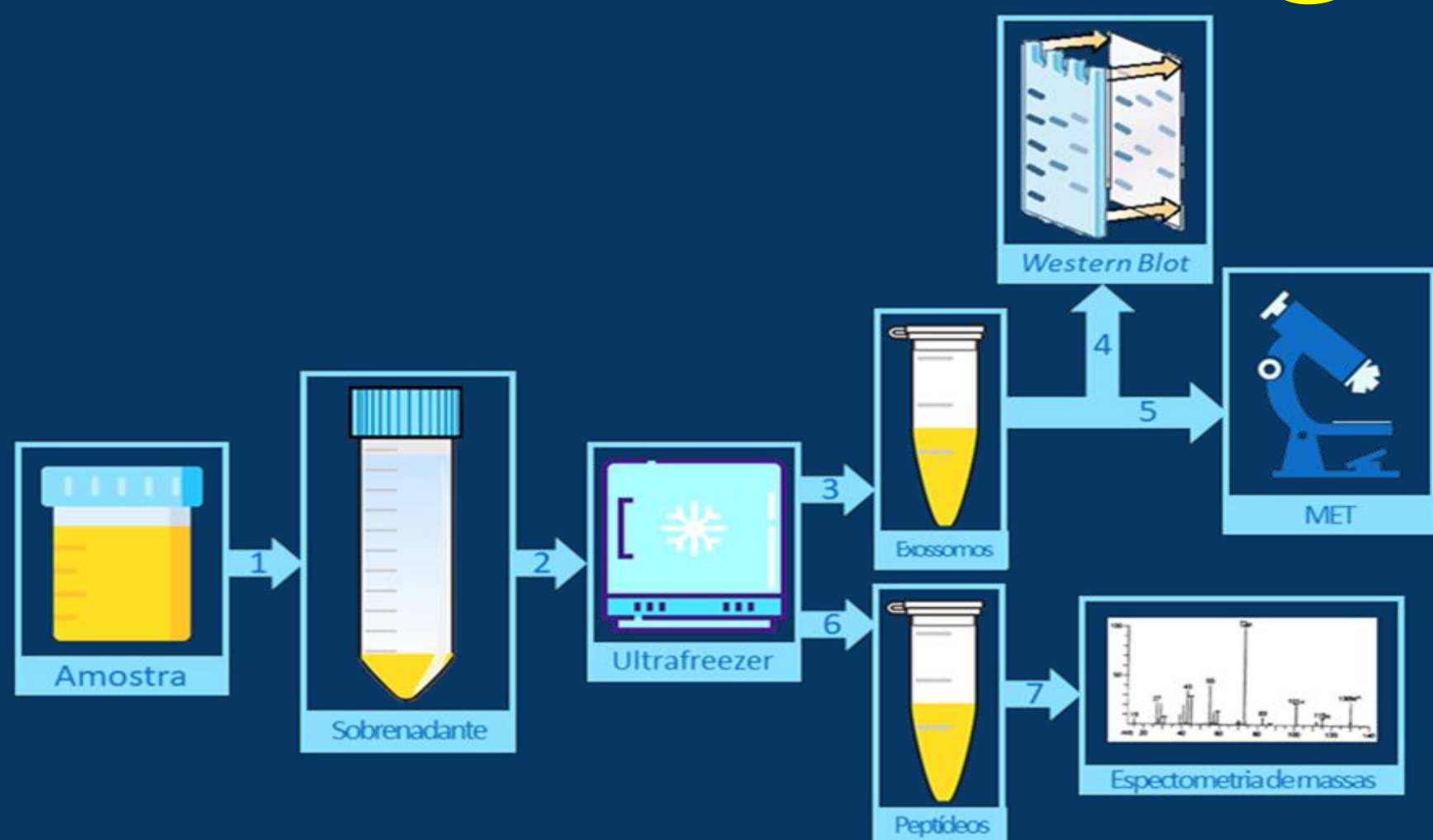
### INTRODUÇÃO:

O câncer de próstata (CaP) é considerado um problema de saúde pública no mundo. O CaP é classificado como um tumor de bom prognóstico se diagnosticado precocemente, porém os exames utilizados atualmente apresentam limitações importantes, como baixa especificidade e diagnóstico impreciso. Estudos apontam que a urina é uma fonte interessante para a detecção de biomarcadores de tumores urológicos, pois sua composição reflete o estado fisiológico/patológico dos principais tecidos urológicos.

### OBJETIVO:

Análise em larga escala de peptídeos e miRNAs circulantes na urina de pacientes com CaP, hiperplasia prostática benigna (HPB) e indivíduos saudáveis (sem diagnóstico de CaP ou HPB) para a identificação de potenciais biomarcadores para o CaP.

### METODOLOGIA:



1. As amostras de urina de pacientes com CaP, HPB e indivíduos saudáveis foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos.
2. O sobrenadante foi fracionado e armazenado em ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .
3. Exossomos urinários foram isolados utilizando o reagente *Total exosome isolation* (Thermo Fisher Scientific), a partir de diferentes volumes de urina (3, 5 e 10 mL).
4. O isolamento de exossomos foi confirmado por *western blot* utilizando anticorpos anti-CD63
5. Os exossomos isolados foram visualizados por microscopia eletrônica de transmissão (MET).
6. Os peptídeos urinários foram isolados por precipitação de proteínas com solventes orgânicos e ultrafiltração (membrana de 20 e 30 kDa). Ambos os protocolos foram testados em condições desnaturantes e não desnaturantes.
7. Os peptídeos resultantes de cada condição foram dessalinizados utilizando cartucho HLB OASIS (Waters) e analisados por espectrometria de massas.

### RESULTADOS:

#### 1. Coleta de amostras de urina de pacientes com CaP, HPB e indivíduos saudáveis:

Os dados de história pregressa dos pacientes com suspeita de CaP ou HPB são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. História Pgressa dos pacientes com suspeita de CaP ou HPB.

Variáveis	Número de pacientes	%
Histórico familiar de câncer de próstata		
Não	71	61,7
Sim	40	34,8
Ignorado	4	3,5
Histórico de infecção no trato urinário		
Não	88	76,5
Sim	20	17,4
Ignorado	7	6,1
Realizou exame de PSA		
Não	0	0
Sim	111	96,5
Ignorado	4	3,5
Realizou exame de biópsia		
Não	10	8,7
Sim	105	91,3
Toque retal suspeito		
Não	42	36,5
Sim	41	35,7
Ignorado	32	27,8
Número total de pacientes = 115		

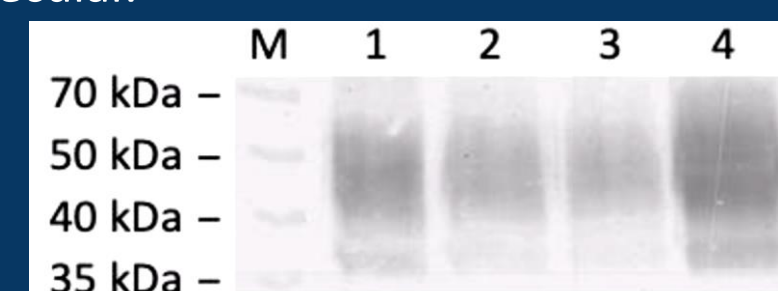
#### 2. Purificação de peptídeos urinários:

Foi realizada padronização das metodologias de isolamento de peptídeos urinários a fim de identificar as condições que resultassem na maior quantidade de peptídeos. Ambos os protocolos foram testados em condições desnaturantes (8 M uréia, 50 mM HEPES e 20 mM DTT) e não desnaturantes (PBS, 137 mM NaCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2,7 mM KCl e 1,8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Foi obtido melhor rendimento (maior número de peptídeos e maior intensidade) utilizando o protocolo de ultrafiltração em condições desnaturantes e filtro 30 kDa.

#### 3. Isolamento de exossomos urinários e análise por microscopia eletrônica e *western blot*:

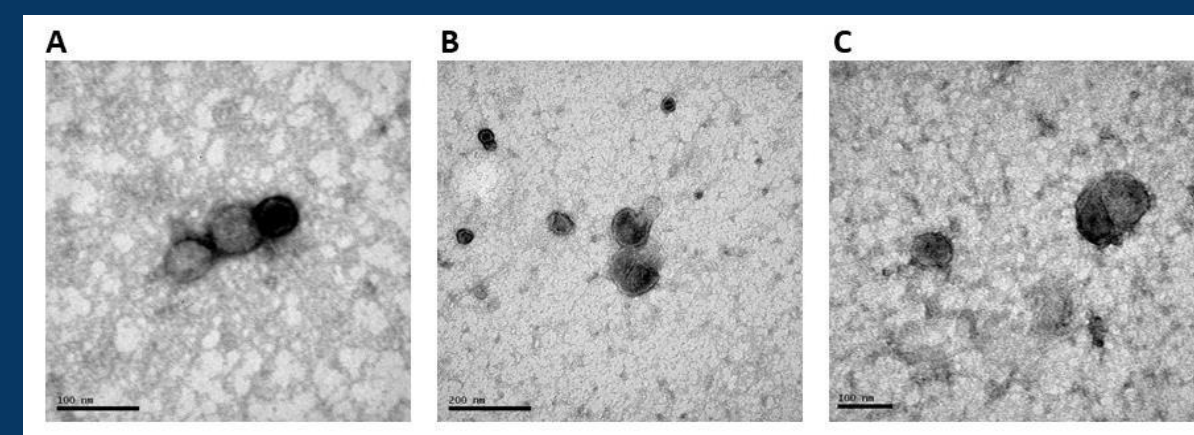
Foi confirmado o isolamento de exossomos urinários por *western blot* pela detecção da proteína CD63 nas diferentes preparações (Figura 1).

**Figura 1. Confirmação da presença da proteína CD63 nos exossomos isolados a partir de amostras de urina.** Os exossomos foram isolados a partir de diferentes volumes de urina (3, 5 e 10 mL) e as proteínas exossomais foram resolvidas por SDS-PAGE, transferidas para membrana de PVDF. 1: 13  $\mu\text{g}$ ; 2 e 3: 20  $\mu\text{g}$ ; 4: 50  $\mu\text{g}$  de proteínas exossomais totais. M=marcador de massa molecular.



Através de MET foi possível observar a presença de vesículas com característica típicas de exossomos (aproximadamente 100 nm), de acordo com o diâmetro e contraste das vesículas encontradas (Figura 2).

**Figura 2. Microscopia eletrônica de transmissão de exossomos urinários.** Exossomos isolados a partir de 5 (A e B) e 10 mL (C) de urina foram contrastados com acetato de uranila 2% e analisados por microscopia eletrônica de transmissão.



Esses resultados demonstram a eficiência da metodologia utilizada para a purificação de exossomos urinários.

### PERSPECTIVAS

Totalizar o número de amostras em 50 amostras/grupo. Isolar os peptídeos urinários nas amostras coletadas e realizar análises comparativas entre os grupos de estudo utilizando a técnica de peptidômica. Exossomos serão isolados de todas as amostras coletadas e o seu conteúdo de miRNAs será extraído e avaliado por RT-qPCR. Serão definidos e comparados os perfis qualitativos e quantitativos de peptídeos e miRNAs permitindo a identificação de potenciais biomarcadores para o CaP.

**FINANCIAMENTO:** PPSUS, DECIT/SCTIE/MS, CNPq, FAPERGS, SES-RS, BIC/UFRGS.