



Universidade de
Aveiro

2018

Departamento de Química

**STÉPHANIE PEREIRA
REIS**

**PESQUISA DE BIOMARCADORES DE CANCRO DA
PRÓSTATA PELA ANÁLISE PROTEÓMICA DA
URINA**

**SEARCHING FOR PROSTATE CANCER
BIOMARKERS THROUGH URINE PROTEOMICS**



**STÉPHANIE PEREIRA
REIS**

**PESQUISA DE BIOMARCADORES DE CANCRO DA
PRÓSTATA PELA ANÁLISE PROTEÓMICA DA
URINA**

**SEARCHING FOR PROSTATE CANCER
BIOMARKERS THROUGH URINE PROTEOMICS**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica Clínica, realizada sob a orientação científica da Doutora Rita Maria Pinho Ferreira, professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Doutor Rui Miguel Pinheiro Vitorino, investigador principal do Departamento de Ciências Médicas da Universidade de Aveiro.

Apoio financeiro de fundos de
Investimento Europeus
FEDER/COMPETE/POCI– *Operational
Competitiveness and
Internacionalization Programme*, ao
Projeto POCI-01-0145-FEDER-016728
e fundo da FCT – Fundação para a
Ciência e Tecnologia ao projeto
PTDC/DTP-DES/6077/2014.

Dedico este trabalho aos meus pais. Com eterna saudade MÃE!

o júri

presidente

Prof. Doutor Brian James Goodfellow
professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Rui Miguel Pinheiro Vitorino
investigador principal do Departamento de Ciência Médicas da Universidade de Aveiro

Doutora Rita Marisa Nogueira Ferreira
investigadora auxiliar do Departamento de Cirurgia e Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

agradecimentos

Ao professor Doutor Adelino Leite Moreira, Diretor do Departamento de Cirurgia e Fisiologia do Centro de Investigação Médica da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, pela oportunidade de realizar o meu trabalho nesta instituição.

Aos meus orientadores, Professor Doutor Rui Vitorino e Professora Doutora Rita Ferreira, agradeço a oportunidade de realizar este trabalho e todo o saber e orientação científica que me proporcionaram. Agradeço ainda o incentivo que me deram e toda a paciência que tiveram ao longo desta fase.

À Doutora Rita Nogueira Ferreira pela orientação e inserção no laboratório e pela disponibilidade e acompanhamento incansáveis na parte experimental do meu trabalho.

Às restantes pessoas que fazem parte do Departamento de Cirurgia e Fisiologia do Centro de Investigação Médica da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto por toda a ajuda prestada. Agradeço pela simpatia com que me receberam.

Aos meus amigos, em especial à Ana Beatriz Ferreira pelo companheirismo, paciência e incentivo. Um agradecimento especial ao meu namorado, pela ajuda incansável e por estar sempre presente nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, irmão e avó pelo apoio incansável, por nunca me deixarem desistir e sempre me incentivarem na realização dos meus sonhos. Sem vocês nada seria possível.

UM MUITO OBRIGADA A TODOS.

palavras-chave

Cancro da próstata, biomarcador, urina, proteoma, proteómica, diagnóstico, prognóstico.

resumo

O cancro da próstata (PCa) representa um dos tipos de cancro mais incidente em indivíduos do sexo masculino a nível mundial e em Portugal não existindo, atualmente, nenhum tratamento eficaz quando o diagnóstico é feito num estadio avançado da doença. A quantificação sérica do antigénio específico da próstata (PSA) continua a ser a metodologia mais utilizada para o diagnóstico precoce do PCa. Todavia, o aumento dos níveis de PSA não é específico do PCa, sendo observado em outras condições patológicas da próstata. Assim, com a finalidade de identificar novos biomarcadores de PCa em amostras obtidas de forma não invasiva, foi utilizada uma abordagem proteómica, baseada em espectrometria de massa e na deteção de proteínas específicas por imunoblot, para análise de amostras de urina obtidas de um modelo animal de PCa induzido pela administração sequencial de flutamida, propionato de testosterona, *N*-metil-*N*-nitrosureia e a colocação de implantes subcutâneos de testosterona cristalina. Na experiência consideraram-se dois estadios da doença, 27 e 54 semanas após a indução de PCa, os grupos PCa1 e PCa2, respetivamente. Amostras de animais com idade correspondente, mas sem doença, CONT1 e CONT2, também foram incluídas neste estudo.

A análise por GeLC-MS/MS permitiu a identificação de 319 proteínas distintas, 246 das quais estavam presentes em pelo menos três animais de cada grupo experimental. Destas, 172 proteínas eram comuns a todos os animais, estando a maioria envolvida em processos de proteólise e metabolismo. A maioria destas proteínas é de origem extracelular, de vesículas ou exossomas ligados à membrana (de acordo com STRING v10.5). O “transporte de vitaminas” está entre os processos biológicos mais representativos do grupo PCa1, enquanto na urina dos animais do grupo PCa2 prevalecem os processos relacionados com “inflamação” e “metabolismo do colagénio”. Entre as proteínas características do estadio inicial de PCa estão a glutatona sintetase, o precursor da proteína secretora da vesícula seminal 2, a MMP-9 e a vinculina. A glutatona S-transferase alfa-3, a S100-A8, a APE-1 e a MMP-2 parecem ser específicas dos estadios avançados do PCa. Em geral, os resultados obtidos destacam potenciais marcadores que quando analisados em conjunto poderão ser aplicados ao diagnóstico e prognóstico de PCa com elevada especificidade e sensibilidade. Estudos futuros serão importantes para validar o valor de diagnóstico destes marcadores no Homem.

keywords

Prostate cancer, biomarker, urine, proteome, proteomics, diagnosis, prognosis.

abstract

Prostate cancer (PCa) is one of the most common types of cancer in males worldwide. Currently, there is no effective treatment when the diagnosis is made at an advanced stage of the disease. The serum quantification of prostate specific antigen (PSA) remains the most commonly used methodology for the early diagnosis of PCa. However, increased PSA levels are not specific of PCa, being observed in other diseases of the prostate. Envisioning the identification of novel biomarkers of PCa in non-invasively obtained samples, proteomics based on mass spectrometry and on immunoblot was applied to the analysis of urine samples collected from an animal model of PCa induced by the sequential administration of flutamide, testosterone propionate, N-methyl-N-nitrosureia and the placement of subcutaneous crystalline testosterone implants. Two time-points of the disease were considered, 27 and 54 weeks after PCa induction, PCa1 and PCa2 groups, respectively. Age-matched controls were also considered, Cont1 and Cont2 groups.

GeLC-MS/MS analysis allowed the identification of 319 distinct proteins, 246 of each were present in at least three animals of each experimental group. From these, 172 proteins were common to all animals, most of which are involved in proteolysis and metabolism. The majority of these proteins are of extracellular origin, from membrane-bound vesicles or exosomes (according to STRING v10.5). The "transport of vitamins" is among the most representative biological processes of PCa1, while in the PCa2 the "inflammatory response" and "collagen metabolism" prevailed. Among the unique proteins characteristic of each disease state are glutathione synthetase, seminal vesicle secretory protein 2 precursor, MMP-9 and vinculin for PCa1 and glutathione S-transferase alpha-3, S100-A8, APE-1 and MMP-2 for PCa2. In overall, data highlight putative protein markers that when analysed together might allow the diagnosis and prognosis of PCa with high specificity and sensitivity. Future studies will be important to validate the diagnosis value of multimarker panels involving these proteins in humans.

LISTA DE ABREVIATURAS

2DE	Eletoforese em gel bidimensional
ADAM-12	<i>Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 12</i>
ADAMTS-7	<i>Disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-7</i>
ADIRF	<i>Adipogenesis regulatory factor</i>
AMACR	<i>Alpha methylacyl moenzyme A racemase</i>
AMBP	<i>Alfa-1-microglobulina/ bikunina precursor</i>
AR	Recetor de androgénios
BPH	Hiperplasia benigna da próstata
CD105 ou ENG	Endoglina
CD90	Glicoproteína de membrana thy-1
CDK6	Cinase dependente de ciclina 6
CE-MS	Eletoforese capilar acoplada a espectrometria de massa
CHMP4A	<i>Charged multivesicular body protein 4a</i>
CNV	Variação do número de cópias
DHT	Dihidrotestosterona
DJ-1 ou PARK7	Deglicase associada ao parkinsonismo
DPD	Deoxipiridinolina
DRE	Exame por toque retal
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EN2	<i>Engrailed-2</i>
ESI	Ionização por <i>electrospray</i>
ETS	<i>E26 Transformation-specific</i>
F2	Protrombina
FABP5	Proteína de ligação de ácidos gordos 5
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
GS	<i>Gleason Score</i>
HGPIN	Neoplasia intra-epitelial prostática de alto grau
HP	Haptoglobina
HPLC	Cromatografia líquida de alta resolução
ICAT	<i>Isotope-coded affinity tag</i>
IGFBP3	Proteína de ligação ao fator de crescimento insulínico 3

ITIH4f	Cadeia pesada 4 do inibidor da inter-alfa-tripsina
ITIL	Cadeias leves inibidoras de inter-alfa-tripsina
iTRAQ	<i>Isobaric tags for relative and absolute quantitation</i>
LAMTOR	<i>Late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator</i>
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa
LDH	L-lactato desidrogenase
LG3BP	Proteína de ligação a galectina-3
MALDI-TOF	Ionização – dessorção a laser assistida por matriz acoplada a espectrometria de tempo de voo
MARS	Sistema de remoção de afinidade múltipla
MCM	Manutenção de minicromossoma
MMP-2	Colagenase de 72 kDa tipo IV
MMP-9	Metaloproteinase de matriz 9
MMPs	Metaloproteases de matriz
MRP-14	Proteína relacionada a mieloide 14
MS	Espectrometria de massa
MUC3	Mucina intestinal pequena MUC3
NGAL	Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos
PAP	Fosfatase ácida da próstata
PCa	Cancro da próstata
PCA3	Antigénio de cancro da próstata 3
PGA3	Pepsinogéneo 3, grupo I
PHI	Índice de saúde da próstata
PIN	Neoplasia intra-epitelial prostática
PSA	Antigénio específico da próstata
PTMs	Modificações pós-traducionais
PYD	Piridinolina
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio
SELDI	Ionização e dessorção por laser de superfície
SPP1 ou OPN	Osteopontina
SPR1	<i>Psoriasis susceptibility 1 candidate gene 2 protein</i>

SRM/MRM	Monitoração de reação selecionada/ monitorização de reações múltiplas
TF	Transferrina
TIMP-1	Inibidor de metaloproteinase 1
TM256	Proteína transmembranar 256
TP53INP2	<i>Tumor protein P53 inducible nuclear protein 2</i>
VATL	Subunidade proteolipídica ATPase 16 kDa de protão do tipo V
VCL	Vinculina
ZAG	α 2-glicoproteína de zinco
αHGF	Fator de crescimento de hepatócitos α
β2M	β -2-microglobulina
β-MSMB	β -microseminoproteína

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO GERAL-----	1
1.1. Biomarcadores de Cancro da Próstata identificados em urina: realidade ou ficção? (submetido para publicação)-----	2
Resumo-----	3
Palavras-chave: biomarcadores, urina, proteómica, cancro da próstata -----	3
Abstract -----	4
Keywords: biomarker, urine, proteomics, prostate cancer -----	4
Introdução -----	5
Biomarcadores identificados em amostras de urina: vantagens e limitações -----	5
Aplicação da Proteómica à pesquisa de biomarcadores na urina-----	6
Análise crítica dos potenciais biomarcadores de cancro da próstata identificados em amostras de urina -----	8
<i>Alfa-1-microglobulina</i> -----	9
<i>Osteopontina</i> -----	9
<i>α2-glicoproteína de zinco</i> -----	10
<i>Vinculina, fosfatase ácida da próstata e galectina-3</i> -----	11
<i>CDK6</i> -----	12
<i>EN2 e CD105</i> -----	13
<i>FABP5</i> -----	14
Conclusões-----	14
Conflito de interesses -----	15
Agradecimentos-----	15
Referências -----	21
2. OBJETIVOS -----	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS -----	35
3.1. Protocolo animal-----	35
3.2. Recolha e preparação de urina -----	36
3.3. Separação de proteínas por SDS-PAGE-----	37
3.4. Digestão em gel -----	37
3.5. Análise por LC-MS/MS e ID da proteína -----	38
3.6. <i>Immunoblot</i> -----	38

3.7. Zimografia -----	39
3.8. Análise estatística de dados -----	40
4. RESULTADOS -----	41
4.1. Caraterização do modelo animal de cancro da próstata -----	41
4.2. Efeito do PCa no perfil proteico da urina avaliado por GeLC-MS/MS -----	42
4.3. Efeito do PCa no teor de proteínas alvo avaliado por imunoblot -----	47
4.4. Efeito do PCa na atividade proteolítica da urina -----	49
5. DISCUSSÃO -----	51
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS -----	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	58
8. ANEXOS -----	65

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Fluxograma em que evidencia as várias etapas necessárias para a identificação de biomarcadores de CPa na urina. A origem provável das proteínas propostas como biomarcadores de CPa na urina é também apresentada. A abreviatura das proteínas tem correspondência na Tabela I. Figura realizada com o *Servier Medical Art*. 20
- Figura 1:** Esquema representativo do protocolo experimental implementado para pesquisa de biomarcadores de PCa na urina (sem: semanas; t₀: *time point zero* – indução de PCa; t₁: *time point 1* – 27 sem após t₀; t₂: *time point 2* – 54 sem após t₀). ----- 35
- Figura 2:** SDS-PAGE representativo da separação do proteoma da urina dos animais dos quatro grupos experimentais em estudo (M-marcador de peso molecular). ----- 42
- Figura 3:** Análise comparativa do proteoma da urina entre os diferentes grupos experimentais efetuada com a ferramenta jvenn.¹³ ----- 43
- Figura 4:** Análise comparativa dos processos biológicos modulados na urina por PCa1 (A) e PCa2 (B), efetuada com a ferramenta Cytoscape (Abril de 2018). Os nodos a vermelho representam os processos biológicos mais representativos de PCa enquanto a verde estão representados os processos biológicos prevalentes nos CONT. ----- 46
- Figura 5:** Análise do teor das proteínas vinculina (A), proteína C-reativa (B), MMP-9 (C), MMP-2 (D), APE-1 (E), ERG (F) e galectina-3 (G) na urina avaliada por imunoblot. Os valores são apresentados como média da densidade ótica (DO) ± desvio padrão (n=5) e expressos em unidades arbitrárias. Uma imagem representativa de cada imunoblot obtido é apresentada acima dos respetivos histogramas. (**p*<0,05 vs. CONT + 27 sem; #*p*<0,05 vs. CONT + 54 sem; ¥*p*<0,05 vs. PCa + 27 sem).----- 48
- Figura 6:** Análise por zimografia das amostras de urina dos grupos experimentais em estudo (A). Valores das médias das densidades óticas (DO) ± desvio padrão da *lane* total e das bandas proteolíticas 1, 2, 3, 4, e 5, resultantes da análise de amostras por grupo (n=4) e expressos em unidades arbitrárias (B). (#*p*<0,05 vs. CONT + 54 sem; **p*<0,05 vs. CONT + 27 sem; ***p*<0,01 vs. CONT + 27 sem). ----- 50

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I: Resumo dos biomarcadores proteicos de CPa identificados na urina.....	16
Tabela 1: Efeito do PCa no peso corporal, na massa da próstata e no rácio massa da próstata/peso corporal. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão, (n=5).	41
Tabela 2: Lista de proteínas únicas identificadas na urina dos ratos de cada grupo experimental.	44
Tabela suplementar S1: Proteínas identificadas na urina por análise LC-MS/MS (com pelo menos 2 péptidos, grau de confiança superior a 95% e FDR inferior a 1%).....	65

1. INTRODUÇÃO GERAL

O desenvolvimento e melhoramento das plataformas tecnológicas nas áreas das Ómicas veio fomentar a pesquisa de novos biomarcadores de doença, a fim de melhorar o diagnóstico e a monitorização da terapêutica. Pela sua elevada incidência e mortalidade associada,¹ o cancro da próstata tem sido bastante estudado neste contexto uma vez que o biomarcador atualmente usado, o PSA, é pouco específico desta doença.² Entre as Ómicas aplicadas ao estudo do cancro da próstata é de destacar a Proteómica baseada em espectrometria de massa (MS) para caracterização global do proteoma e em anticorpos para pesquisa de proteínas alvo. Enquanto a primeira abordagem é sobretudo usada para identificação de proteínas moduladas pela doença que possam ter valor de diagnóstico,^{3,4} a segunda abordagem tem sido mais usada para validação e quantificação de proteínas previamente selecionadas.⁵ Entre as técnicas baseadas em anticorpos mais utilizadas na análise de fluidos biológicos é de salientar o teste de ELISA pela sua elevada sensibilidade e poder quantitativo.⁶

A proteómica tem sido aplicada à caracterização do perfil proteico de vários tipos de amostras biológicas entre as quais fluidos biológicos. No contexto do cancro da próstata, a urina constitui uma amostra particularmente interessante, pelo facto de que, a uretra atravessa a glândula prostática e funde-se com os ductos ejaculatórios, através dos quais o fluido prostático é expelido para a uretra.⁷ Espera-se que as proteínas específicas do tumor da próstata exibam alterações na urina, como resultado de mudanças quantitativas na expressão de proteínas no tecido, devido a mutações, translocações, amplificação de genes, aumento da atividade transcripcional ou ativação induzida por ligando em células tumorais.³ Assim, a proximidade anatómica da urina à próstata e a presença de células tumorais na urina, aparentemente enriquecida após massagem prostática, tornam possível a análise dos marcadores na urina para o diagnóstico do PCa.^{8,9} Os estudos dedicados à pesquisa de biomarcadores em amostras de urina baseiam-se sobretudo em eletroforese bidimensional (2DE) ou eletroforese capilar (CE) acopladas a MALDI-TOF/TOF ou a ESI-MS/MS,^{10,11} e em técnicas dependentes de anticorpos, como ELISA e *Western blot*.⁵ Com estas abordagens foram já propostas cerca de 50 proteínas diferentes como potenciais biomarcadores de PCa. No entanto, a maioria destes não é específico deste tipo de cancro, encontrando-se alterados em outras doenças. Na sub-seção seguinte é feita uma análise crítica e integrada do estado de arte sobre biomarcadores de cancro da próstata pesquisados em amostras de urina utilizando abordagens proteómicas (artigo de revisão submetido para publicação).

1.1. Biomarcadores de Cancro da Próstata identificados em urina: realidade ou ficção? (submetido para publicação)

Resumo

O cancro da próstata (CPa) representa um dos tipos de cancro mais incidente em indivíduos do sexo masculino a nível mundial e em Portugal. A quantificação sérica do antigénio específico da próstata (PSA) continua a ser a metodologia mais utilizada para o diagnóstico precoce do CPa. Todavia, o aumento dos níveis séricos de PSA não é específico do CPa, sendo observado em outras condições patológicas da próstata. As limitações inerentes às metodologias atualmente em uso na clínica para o diagnóstico/prognóstico da doença têm fomentado a pesquisa de novos biomarcadores em amostras obtidas de forma não invasiva como a urina. Neste sentido, a análise do proteoma da urina baseada em espectrometria de massa e/ou em anticorpos tem-se mostrado promissora para a identificação de proteínas moduladas pelo CPa.

Da pesquisa das bases de dados PubMed e Scopus constatou-se que mais de 50 proteínas diferentes foram propostas como biomarcadores de CPa, com base em estudos de proteómica. Apesar dos esforços da comunidade científica, estes marcadores estão limitados à fase de identificação, o que impossibilita a sua translação e implementação na clínica. Contudo, a associação destas proteínas à tumorigénese da próstata suporta a monitorização destas moléculas na urina para fins de diagnóstico e/ou prognóstico do CPa. Mais ainda, a integração de vários marcadores em painéis multiplex parece constituir uma alternativa promissora para a deteção precoce da doença com elevada especificidade e sensibilidade.

Palavras-chave: biomarcadores, urina, proteómica, cancro da próstata

Abstract

Prostate cancer (PCa) is one of the most common types of cancer in males worldwide and in Portugal. The serum quantification of prostate specific antigen (PSA) remains the most commonly used methodology for the early diagnosis of CPa. However, increased PSA levels are not specific of CPa, being observed in other pathological conditions of the prostate. The limitations underlying the clinic methodologies currently used for the diagnosis/prognosis of the disease make the identification of urinary biomarkers an attractive research area. In this set, urine proteomics based on mass spectrometry and/or antibodies has shown promise in the identification of proteins modulated by CPa.

From the critical analysis of information retrieved from PubMed e Scopus databases, it was found that more than 50 different proteins have already been proposed as probable biomarkers of CPa, based on proteomic studies. Despite the efforts of the scientific community, these putative biomarkers are limited to the identification phase, making difficult their translation to clinics. However, the association of these proteins with prostate tumorigenesis supports their potential application as disease markers to be clinically assessed for the diagnosis and/or prognosis of CPa. Moreover, the inclusion of several markers in multiplex panels appears to be a promising alternative for the disease screening with high sensitivity and specificity values.

Keywords: biomarker, urine, proteomics, prostate cancer

Introdução

O cancro da próstata (CaP) representa um dos tipos de cancro mais incidente em indivíduos do sexo masculino a nível mundial e em Portugal. A quantificação sérica do antigénio específico da próstata (PSA) continua a ser a abordagem mais utilizada para o diagnóstico precoce do CaP. O PSA existe no sangue na sua forma livre (fPSA) ou complexado com inibidores.¹ O fPSA pode aparecer em três isoformas moleculares: pro-PSA, PSA benigno (bPSA) e PSA intacto (iPSA).² A proporção de fPSA sobre PSA total (tPSA) demonstrou aumentar a especificidade na deteção de CaP.¹ No entanto, a variabilidade analítica observada na medição de fPSA tem limitado a sua aplicabilidade na monitorização da doença.³ Mais ainda, este marcador não é específico do CaP, sendo detetado em níveis elevados em outras condições patológicas da próstata. Para além do PSA, o índice de saúde da próstata (PHI, do inglês *Prostate Health Index*) e o antigénio de cancro da próstata 3 (PCA3, do inglês *Prostate Cancer Antigen 3*) são os biomarcadores atualmente aceites pela *US Food and Drug Administration* (FDA) para o diagnóstico de CaP.⁴ Embora a aplicação destes testes no diagnóstico e monitorização do CaP tenha levado a uma diminuição da mortalidade associada à doença, apresentam ainda limitações que questionam a sua aplicabilidade na clínica tais como os baixos valores de sensibilidade e/ou especificidade.⁵ Neste sentido, têm sido propostos novos marcadores com o intuito de aumentar a sensibilidade e especificidade no diagnóstico precoce do CaP.

Biomarcadores identificados em amostras de urina: vantagens e limitações

A pesquisa de marcadores de doença em amostras de tecido obtidas de biópsias tem sido amplamente usada na prática clínica. No entanto, a invasividade do processo e a morbilidade associada tem suscitado a procura de alternativas menos lesivas para o paciente.⁶ Os fluídos derivados do sangue (plasma ou soro) têm sido bastante usados mas a complexidade destas amostras, nomeadamente a elevada concentração de determinadas proteínas, como a albumina⁷ e o facto de estar em contacto com todos os órgãos, torna difícil a associação de biomarcadores a alterações em órgãos específicos. A urina tem sido usada em alternativa ao plasma ou soro para a pesquisa de biomarcadores de CaP.⁸ A facilidade na sua obtenção, bem como a não invasividade inerente à amostragem e as grandes quantidades que podem ser obtidas, representam as principais vantagens desta amostra. A elevada estabilidade e a baixa concentração de proteases suportam ainda a sua utilização para fins analíticos.⁹ No

entanto, a presença de proteínas provenientes do sistema renal e do plasma em elevada concentração⁷ e o alto teor em sal¹⁰ constituem limitações à análise de proteínas em amostras de urina. Para ultrapassar estas limitações têm sido propostas metodologias de fracionamento da urina que permitem a remoção dos sais e, eventualmente, das proteínas mais abundantes.¹¹ A pré-concentração da amostra é também essencial para o isolamento das proteínas de interesse. Os protocolos mais comuns baseiam-se em precipitação, ultracentrifugação, filtração e diálise seguida de liofilização (revisto em ¹²).

A grande variabilidade da concentração proteica da urina, devido, em parte, à ingestão diária de líquidos pode também condicionar a sua utilização para fins de diagnóstico. Esta desvantagem pode ser ultrapassada pela normalização aos valores de creatinina ou a péptidos presentes na urina, embora nem todos os investigadores concordem com esta aproximação metodológica.¹³

A colheita da urina é um passo determinante na análise de biomarcadores e, embora não seja consensual, tem-se dado preferência à parte intermédia da primeira urina da manhã.¹⁴ A urina de 24 horas seria a mais indicada para a pesquisa de marcadores biológicos,¹⁵ uma vez que as variações fisiológicas normais podem alterar o perfil proteico e de metabolitos da urina.¹⁰ No entanto, a conservação da amostra e o inconveniente para o paciente tornam difícil a implementação de testes de diagnóstico aplicados a urina de 24 horas. Alguns autores recomendam a colheita da porção intermediária da segunda urina do dia^{10,15} com o objetivo de evitar a contaminação por resíduos ou microrganismos. No entanto, a maior concentração de proteínas provenientes da próstata na primeira urina da manhã parece justificar a preferência por esta amostra.¹⁴

Aplicação da Proteómica à pesquisa de biomarcadores na urina

A análise de proteínas da urina tem sido aplicada à pesquisa de biomarcadores de doença, particularmente de patologias do trato urinário.^{16,17} Diferentes abordagens baseadas em espectrometria de massa (MS) têm sido implementadas para a caracterização do proteoma da urina, nomeadamente eletroforese bidimensional (2DE), cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) ou eletroforese capilar (CE) acopladas a MS, nomeadamente a MALDI-TOF/TOF ou a ESI-MS/MS.^{11,18} Pelo seu poder quantitativo, a monitorização de reações múltiplas (MRM ou SRM) tem permitido dosear proteínas específicas em amostras complexas como a urina.¹⁹ Alternativamente, podem ser usados métodos baseados em

anticorpos, tais como ELISA e *Western blots* para deteção de proteínas alvo.¹⁹ O fluxograma das diversas etapas subjacentes à pesquisa de biomarcadores na urina é apresentado na Figura I.

A análise do perfil de proteínas baseada em MS tem a vantagem de possibilitar a identificação de proteínas diferencialmente expressas na doença, bem como a capacidade de detetar modificações de proteínas tais como glicosilação ou fosforilação.^{20,21} A 2DE-MS é uma abordagem robusta e, embora não seja muito prática para a análise de um grande número de amostras,²² tem sido utilizada para a separação e identificação de proteínas.²²⁻²⁴ Esta técnica apresenta como principais vantagens a capacidade de detetar proteínas relativamente grandes (aproximadamente 150 kDa), a possibilidade de estimar o peso molecular e o ponto isoelétrico (*pI*) de proteínas e investigar modificações pós-traducionais (PTMs) e isoformas de proteínas.^{17,25,26} De facto, vários biomarcadores propostos para monitorização de CaP foram identificados por 2DE-MS (Tabela I). No entanto, a elevada quantidade de amostra requerida (cerca de 250-400 µg de proteína/gel), a incapacidade de analisar proteínas extremamente ácidas ou básicas (com *pI* inferiores a 4 e superiores a 9), a dificuldade em analisar proteínas hidrofóbicas e a falta de reprodutibilidade têm suscitado a procura de alternativas técnicas.^{11,25} A LC-MS possibilita a deteção de proteínas com elevada precisão (Tabela I) e abrange uma gama maior de pesos moleculares e pontos isoelétricos, comparativamente ao 2DE-MS.²³ Esta técnica permite identificar proteínas menos abundantes e hidrofóbicas, não detetadas por 2DE-MS sendo, por isso, considerada uma abordagem complementar.¹¹ O elevado tempo requerido para a análise por LC-MS e a sensibilidade a compostos interferentes (por exemplo, sais) têm limitado o uso desta técnica para fins de diagnóstico.²⁷ A preparação da amostra e o pré-fracionamento são procedimentos fundamentais na pesquisa de biomarcadores por LC-MS.^{25,28}

A CE-MS constitui uma técnica complementar para análise do perfil de proteínas da urina. Esta abordagem apresenta como vantagens a rapidez, reprodutibilidade, seletividade, sensibilidade, não necessitar de otimização de programas de corrida com gradientes de tampões e insensibilidade a proteínas precipitantes e lípidos.^{11,29} Estas vantagens permitem o uso de CE-MS não apenas como uma plataforma de identificação de proteínas e de validação de outras metodologias, mas também para fins de diagnóstico.¹⁴ Contudo, a

capacidade reduzida para separar proteínas de peso molecular superior a 20 kDa e pouco abundantes, limitam a sua utilização na pesquisa de biomarcadores.¹¹

A SRM é uma das abordagens de eleição para a validação de potenciais biomarcadores devido à sua elevada sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade.²³ No entanto, por questões de disponibilidade de equipamento e, por vezes, dos protocolos de preparação da amostra, os imunoensaios como ELISA e *Western blot* continuam a ser os mais comumente usados na clínica para a validação de proteínas candidatas a biomarcadores (Tabela I).¹⁹ A compatibilidade com o equipamento do laboratório clínico, a rapidez na obtenção do resultado e a elevada sensibilidade fazem da técnica de ELISA a metodologia mais usada na análise quantitativa de biomarcadores.²⁵ Contudo, os testes de ELISA não possibilitam o controlo da especificidade do anticorpo adsorvido à placa pelo que a abordagem por SRM é preferível.¹⁹

Apesar dos esforços da comunidade científica, a translação dos resultados obtidos na pesquisa de biomarcadores de CaP para a clínica não tem sido bem-sucedida. A maioria dos biomarcadores propostos (Tabela I) estão limitados à fase de identificação. Efetivamente, o caminho para a implementação clínica de um biomarcador é complexo e moroso.³⁰ Numa versão simplificada, a proposta de um novo biomarcador pressupõe quatro passos cruciais: i) estudos exploratórios pré-clínicos para identificação de biomarcadores promissores; ii) desenvolvimento e validação de um método para medição do analito na amostra clínica; iii) quantificação do biomarcador utilizando amostras de pacientes armazenadas em bancos de amostras (necessidade de um grande número de amostras que reflitam a variabilidade biológica da população alvo); iv) avaliação em testes prospetivos.³⁰ A capacidade limitada de validação e a escassez de dados que demonstrem uma contribuição clara para o diagnóstico (ou superior às práticas clínicas existentes), têm limitado a translação dos resultados obtidos experimentalmente para a clínica.³⁰

Análise crítica dos potenciais biomarcadores de cancro da próstata identificados em amostras de urina

Da pesquisa das bases de dados PubMed e Scopus utilizando as palavras “*prostate cancer*”, “*urine*”, “*biomarker*”, “*protein*” e/ou “*proteome*” selecionaram-se 33 estudos publicados nos últimos 15 anos. Da análise destes estudos resultaram cerca de 50 proteínas

diferentes propostas como potenciais biomarcadores de CaP (Tabela I), algumas das quais são discutidas a seguir.

Alfa-1-microglobulina

A AMBP é das poucas proteínas propostas como biomarcador de CaP em estudos diferentes. Esta proteína é precursora da α -1-microglobulina e da *bikunin* (ou ITIL) e desempenha funções anti-inflamatórias, estando presente no líquido amniótico, no plasma e na urina.³¹ A AMBP é responsável por inibir a atividade da tripsina, da elastase granulocítica lisossómica e da plasmina, bem como pela alteração da expressão de uroquinase, possivelmente via cascata de sinalização MAPK.³² O aumento do teor desta proteína na urina de doentes com CaP reflete alterações sistémicas pouco específicas da doença, uma vez que o seu aumento também tem sido descrito em condições de infeção, doença renal, doença vascular, coagulação e diabetes.³³ No contexto do CaP, a AMBP, quantificada nos exossomas da urina por SRM, demonstrou estar relacionada diretamente com o estadiamento do CaP. Efetivamente, níveis significativamente aumentados desta proteína foram observados em doentes com um *score* de Gleason elevado.³⁴ Os péptidos resultantes da proteólise da região ITIL de AMBP, mais concretamente as AMBPf1 e AMBPf2, foram identificados em níveis mais baixos em doentes com CaP. No entanto, apenas a AMBPf2 permitiu discriminar pacientes com CaP de indivíduos com hiperplasia benigna da próstata.²²

Osteopontina

A OPN é uma glicoproteína de ligação à integrina, expressa em muitos tecidos e secretada em fluídos corporais como a urina.³⁵ Apesar de ser uma proteína que faz parte do proteoma da urina como reflexo das suas ações fisiológicas, nomeadamente na remodelação óssea e inflamação,³⁵ foi demonstrada a sua associação à tumorigénese, com papel na proliferação celular, invasão, angiogénese e inibição da apoptose.³⁶ A OPN parece estar envolvida na modificação de componentes estruturais, facilitando a invasão das células tumorais através da integrina $\alpha\beta$ 3.³⁷ A OPN pode também regular as vias de sinalização TGF β /BMP-SMAD4 e PI3K-AKT.^{38,39} Recentemente, a deteção do gene de fusão *TMPRSS2-ERG* foi associada à sobre-expressão do OPN no CaP, e o *ERG* mostrou promover a transcrição de OPN.⁴⁰ De facto, as alterações mais prevalentes nos genomas de

tumores da próstata são as fusões de promotores regulados por androgénios como o gene *ERG*, ou outros membros da família ETS, com especial importância o gene de fusão *TMPRSS2-ERG* (revisto em ⁴¹). Este gene de fusão parece ter valor prognóstico e correlaciona-se com uma maior agressividade do tumor e risco de metastização.^{41,42} Os dados publicados⁴¹ evidenciam a interação do gene de fusão *TMPRSS2-ERG* com outras vias envolvidas no processo de tumorigénese. Alterações da regulação da atividade de metaloproteases da matriz (MMPs) podem estar na base molecular do processo de invasão tumoral.⁴³ Mais ainda, o *ERG* está associado à inativação do *PTEN* e resulta em fenótipos clínicos mais agressivos da doença.⁴⁴ A associação do rearranjo do gene *ERG* às alterações epigenéticas, tais como PTMs específicas das histonas⁴⁵ ou modificação do padrão de metilação,⁴⁶ foi também descrita.

A OPN tem duas variantes principais, a intracelular e a extracelular que estão sujeitas a *splicing* alternativo e a modificações pós-traducionais, tais como fosforilação, glicosilação e clivagem proteolítica.³⁶ As variantes específicas de cancro são OPN-a, OPN-b e OPN-c, com papéis distintos, mas não conhecidos, no processo de malignidade.³⁶ A principal isoforma de OPN identificada por LC-MS/MS em níveis mais baixos na urina de doentes com o fenótipo mais agressivo da doença, comparativamente a indivíduos com BPH, foi a variante OPN-a.²⁸ Os dados apresentados em outro estudo recente,⁴⁷ baseado em ELISA, evidenciaram níveis de OPN mais elevados em amostras de urina de doentes com metástases em comparação a indivíduos com doença localizada e sem doença.⁴⁷ Apesar de não ser referido pelos autores, as variantes de OPN provavelmente detetadas foram as b e c uma vez que a sobre-expressão de OPN-b e OPN-c em células tumorais da próstata está associada à proliferação, migração e invasão celular, bem como ao aumento da expressão de MMPs e VEGF.⁴⁸

α 2-glicoproteína de zinco

Vários autores têm usado técnicas baseadas em anticorpos para a quantificação de marcadores proteicos em amostras de urina. Uma das proteínas analisadas na urina de 127 indivíduos por *Western blot* foi a α 2-glicoproteína de zinco (ZAG), tendo-se detetado níveis significativamente aumentados em indivíduos com CaP.⁴⁹ A ZAG é uma glicoproteína secretada pelo epitélio saudável e maligno da próstata⁵⁰ e está naturalmente presente na maioria dos fluidos corporais, como a urina.⁵¹ A função específica de ZAG no CaP é

desconhecida. O mecanismo mais aceite propõe que a proteína estimula a lipólise nos adipócitos com libertação de glicerol e aumento do metabolismo lipídico.⁵¹ Estudos efetuados com amostras de tumor sugerem uma diminuição dos níveis da proteína em casos mais graves da doença.^{49,52} A perda de expressão de ZAG foi associada à progressão da doença para um fenótipo mais agressivo e independente de androgénios.⁵³ Os resultados contraditórios obtidos para os níveis da proteína em amostras de tecido e de urina podem ser explicados pela ligação de ZAG a α -2-globulinas o que torna a sua deteção na urina mais difícil.⁵⁰ A ligação de ZAG ao epitélio da próstata e, possivelmente, a conjugação com o próprio PSA pode justificar os níveis baixos da proteína no tecido.⁵⁰ Mais ainda, a ZAG produzida pelas células tumorais pode infiltrar-se no estroma e, em seguida, nas células linfáticas contribuindo para os níveis sistémicos de ZAG.⁵⁰ O facto da excreção de ZAG não ser específica do tecido tumoral da próstata⁵⁴ torna questionável o seu valor de diagnóstico e de prognóstico do CaP.

Vinculina, fosfatase ácida da próstata e galectina-3

Entre as proteínas com origem no tumor identificadas na urina como potenciais biomarcadores de CaP destacam-se as proteínas vinculina, a fosfatase ácida da próstata (PAP) e a galectina-3 que, segundo alguns autores, permitem distinguir pacientes com e sem CaP e com e sem recidiva da doença.⁵⁵ Os dados obtidos por SRM foram ainda validados por *Western blot*, tendo-se verificado níveis de vinculina significativamente mais elevados na urina de pacientes com CaP em relação a indivíduos sem tumor. A vinculina é uma proteína do citoesqueleto associada às junções célula-célula mediadas por caderina e célula-matriz mediadas por integrina, estando ainda envolvida na ancoragem da F-actina à membrana.⁵⁶ Assim, a vinculina é normalmente vista como um supressor de tumor ao impedir a migração e invasão celular.⁵⁶ No entanto, a sobre-expressão de vinculina foi associada ao aumento da proliferação de células tumorais.⁵⁷ A elevada rigidez da matriz extracelular promovida, em parte, pelo aumento da expressão de vinculina, mostrou induzir a progressão tumoral, com envolvimento da via de sinalização PI3K/AKT.⁵⁸

A fosfatase ácida da próstata também foi sugerida como biomarcador de CaP uma vez que os seus níveis aumentam proporcionalmente à progressão do CaP.^{55,59} No entanto, a existência de duas formas da PAP com origem nas células epiteliais da próstata, uma intracelular e outra secretada, sugere a coexistência de níveis baixos da proteína no tumor e

níveis elevados no soro de indivíduos com a doença.⁶⁰ Efetivamente, a PAP presente na urina de doentes com CaP parece ter origem na circulação sistémica. Esta tirosina fosfatase neutra é capaz de desfosforilar HER-2/ErbB-2/Neu. A diminuição da expressão desta variante nas células epiteliais da próstata correlaciona-se com a hiperfosforilação de HER-2 em resíduos de tirosina e a subsequente ativação da via de sinalização ERK/MAPK, que ativa o crescimento celular independente de androgénios e promove a progressão de CaP.⁶⁰ A atividade biológica da variante secretada não é conhecida.

Níveis significativamente baixos de galectina-3 foram observados na urina de indivíduos com CaP. Esta proteína está envolvida em processos celulares de adesão célula-célula e interação célula-matriz,⁶¹ podendo ser encontrada no citosol ou no núcleo.⁶² Curiosamente, a sua localização celular parece definir a sua ação como supressor ou promotor do tumor.⁶² A galectina-3 extracelular modula interações importantes entre as células epiteliais e a matriz extracelular e desempenha um papel no desenvolvimento embrionário dos ductos coletores.⁶³ A galectina-3 intracelular é importante para a sobrevivência celular devido à sua capacidade em bloquear a via intrínseca da apoptose.⁶³ A expressão da galectina-3 encontra-se diminuída em tumores da próstata, estando presente apenas no citoplasma (sem expressão no núcleo).⁶² Esta alteração da expressão proteica está associada ao desenvolvimento e/ou progressão de CaP por regulação da angiogénese e da apoptose e indução de *splicing* de mRNA.⁶¹ Atendendo ao seu papel na adesão celular, a perda da função desta proteína pode permitir que as células invadam tecidos adjacentes. Mais ainda, a diminuição dos níveis de galectina-3 em amostras de urina de pacientes com recidiva após prostatectomia radical, sugere que a ausência da proteína nas células tumorais da próstata confere capacidade às mesmas para invadirem os tecidos adjacentes e metastizarem à distância.⁶² A existência de um polimorfismo funcional no gene da galectina-3 foi associado ao aumento da suscetibilidade à clivagem por MMPs e parece ser parcialmente responsável pelo crescimento do tumor, angiogénese e resistência à apoptose em modelos animais.⁶⁴

CDK6

A cinase 6 dependente de ciclina (CDK6) foi proposta como biomarcador de diagnóstico e prognóstico de CaP.⁶⁵ Esta proteína foi detetada em amostras de urina de indivíduos com margens cirúrgicas positivas para CaP, não estando presente na urina de indivíduos com

margens negativas.⁶⁵ Esta cinase, altamente expressa em tecidos tumorais, está envolvida na proliferação e diferenciação celular,⁶⁶ por regular a progressão da fase G1 e a transição G1/S do ciclo celular ao fosforilar a proteína retinoblastoma com repercussões na expressão génica.⁶⁶ O aumento dos níveis desta proteína foi relacionado com a progressão do CaP.⁶⁷ Nas células tumorais da próstata, a CDK6 pode ligar-se aos AR e estimular a sua atividade transcripcional na presença de DHT.⁶⁷ No entanto, a sobre-expressão de CDK6 foi descrita em mais de 80% dos tumores no Homem,⁶⁶ o que questiona a sua aplicabilidade como biomarcador isolado de CaP.

EN2 e CD105

As proteínas *engrailed-2* (EN2)⁶⁸ e endoglina (CD105 ou ENG)⁶⁹ foram também sugeridas para deteção de CaP através da análise da urina. A presença de EN2 na urina decorre da sua libertação na uretra,⁷⁰ e parece correlacionar-se com o estadio tumoral (com níveis mais elevados em estadios mais avançados da doença) e volume do tumor, avaliado após-prostatectomia radical.⁶⁸ Efetivamente, esta proteína demonstrou uma elevada especificidade, de aproximadamente 90%, na predição de CaP.^{68,70} A EN2 é um fator de transcrição envolvido no desenvolvimento embrionário precoce que é, subsequentemente, reexpresso no CaP. O facto de ser expresso e segregado em tecido de CaP e não em tecido prostático ou estroma saudáveis suporta o seu valor de diagnóstico.⁷⁰ No entanto, em homens com um fenótipo mais agressivo da doença (GS=8), os níveis teciduais de EN2 encontraram-se diminuídos.⁶⁸ Como a EN2 é secretada pelas células tumorais em ácinos e ductos, com o aumento do GS a desdiferenciação pode afetar o processo de secreção. O seu papel na carcinogénese da próstata ainda não está elucidado, mas mostrou ser um potencial oncogene, regulado pelo gene *PAX2* (que codifica para um fator de transcrição que regula o desenvolvimento e diferenciação celular em embriões), implicado na diferenciação, proliferação e migração de células cancerígenas e na diminuição da apoptose.⁷¹

Os níveis aumentados de CD105 na urina de pacientes com CaP em comparação com controlos suporta a sua utilização em testes de diagnóstico de CaP.⁶⁹ A deteção de endoglina em amostras de urina recolhidas após DRE sugere que esta proteína na urina tem origem prostática e não na circulação sistémica.⁶⁹ A endoglina é altamente expressa em células endoteliais durante a angiogénese e a inflamação tumoral,⁷² estando associada à microvasculatura da próstata.⁷³ No entanto, a análise imuno-histoquímica mostrou que a

endoglina não é expressa apenas pelo endotélio do tumor, mas também por algumas células da neoplasia intra-epitelial prostática e por células epiteliais do CaP.⁷³

FABP5

Outra das proteínas propostas como biomarcador de CaP e com origem no tumor é a proteína de ligação de lípidos, FABP5, envolvida na captação de ácidos gordos, transporte intracelular e metabolismo lipídico.³⁴ A alteração do metabolismo dos ácidos gordos é uma característica do cancro,⁷⁴ uma vez que a disponibilidade de ácidos gordos controla a proliferação das células cancerígenas.⁷⁵ A FABP5 encontra-se sobre-expressa na maioria dos carcinomas da próstata e está associada ao transporte excessivo de ácidos gordos para o núcleo, onde estimulam a PPAR γ .⁷⁶ Este fator de transcrição modula a expressão de genes que promovem a proliferação celular, inibem a apoptose e estimulam a angiogénese.⁷⁶ A FABP5 foi identificada por LC-MS em exossomas da urina com origem nas células epiteliais da próstata, e subsequentemente validada por SRM. A elevada especificidade (de 100%) associada à sua presença na urina de doentes com GS superior ou igual a 7 esteve na base da sua sugestão como biomarcador de diagnóstico e prognóstico de CaP.³⁴

A identificação de proteínas em exossomas da urina constitui uma aproximação recente ao estudo do CaP pelo que existem poucos dados publicados.⁷⁷ A dificuldade técnica na obtenção de exossomas em quantidade suficiente para a caracterização do perfil proteico⁷⁸ também justifica o reduzido número de estudos de proteómica baseada em MS com este tipo de amostra. No entanto, a elevada concentração de metabolitos com origem nas células tumorais⁷⁹ parece justificar os esforços que se têm observado em ultrapassar as limitações metodológicas inerentes ao isolamento e caracterização dos exossomas.^{78,80}

Conclusões

Apesar dos progressos efetuados na procura de biomarcadores de CaP decorrentes, sobretudo, dos avanços científicos e técnicos verificados na área da proteómica, a maioria dos biomarcadores propostos (Tabela I) estão associados a várias outras doenças. Mais ainda, a perceção generalizada da inexistência de um biomarcador específico de CaP tem fomentado, mais recentemente, a sugestão de painéis *multiplex* de biomarcadores com o intuito de aumentar a sensibilidade e especificidade na deteção da doença. Mais do que a deteção simultânea de 3-5 proteínas, foram sugeridos painéis de 12 biomarcadores (proteínas

de identidade desconhecida), bem como a deteção simultânea de picos em espectros de MS de massa/carga (m/z) específicos. No entanto, alguns obstáculos parecem limitar a implementação clínica destes painéis devido, em parte, à incapacidade de validação em um grande número de amostras. Sendo uma doença muito heterogénea, o CaP apresenta uma ampla gama de fenótipos clínicos, o que torna a pesquisa de biomarcadores ainda mais desafiadora. Assim, e apesar dos vários biomarcadores propostos, estudos adicionais são necessários e devem ter em consideração as questões pré-analíticas, analíticas e pós-analíticas na caracterização proteómica da urina de doentes com os vários fenótipos de CaP, não tratados e submetidos às diferentes terapias utilizadas no tratamento desta doença.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao FEDER/COMPETE/POCI - *Operational Competitiveness and Internationalization Programme* pelo financiamento do projeto POCI-01-0145-FEDER-006958 e à Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) pelo financiamento do projeto PTDC/DTP-DES/6077/2014.

Tabela I: Resumo dos biomarcadores proteicos de CPa identificados na urina.

<i>Biomarcador</i>	<i>Varição</i>	<i>Resultados</i>	<i>Técnica de detecção/validação</i>	<i>Grupos analisados</i>	<i>Aplicação Clínica</i>	<i>Ref</i>
VCL	↑	SN=54,2% e ES=85,7%	SRM, <i>Western blot</i>	PCa após prostatectomia radical sem reincidência (n=33), PCa com reincidência (n=15) e controlos saudáveis (n=14)	Diagnóstico	55
PAP	↑	PCa Vs. controlos (p=0,012)		PCa após prostatectomia radical sem reincidência (n=9), PCa com reincidência (n=7) e controlos saudáveis (n=7)		
Galectina 3	↓	Deteção de reincidência (p=0,017)				
MMP-2	↑	SN=55% e ES=100%	Zimografia, SDS-PAGE, Imunoprecipitação, MS/MS	PCa localizado (n=103) e controlos saudáveis (n=45)	Diagnóstico	81
MMP-9	↑	SN=58% e ES=82%				
ADAMTS-7	↑	-----				
MMP-9/NGAL	↑	SN=50% e ES=96%				
MMP-9/TIMP-1	↑	-----				
ADAM-12	↑	Deteção de PCa (p=0,013)	ELISA	PCa localizado (n=40), PCa localizado avançado (n=20), PCa metastático (n=6) e controlos saudáveis (n=14)	Diagnóstico	82
Saposina B	↓	-----	2DE - MALDI-TOF, <i>Western blot</i>	PCa estadio I/II (n=13), BPH (n=20) e controlos saudáveis (n=15)	Diagnóstico	22
AMBPF1	↓					
AMBPF2	↓					
ITIH4f	↑					
AMBPF	↑	SN=93,8% e ES=50%	2DE-DIGE - MALDI-TOF, Imunoturbidimetria	Identificação de marcadores: PCa (n=8) e BPH (n=16); Validação dos marcadores: PCa (n=16) e BPH (n=16)	Diagnóstico/PCa Vs. BPH	24
TF	↓	SN=56,3% e ES=93,8%				
HP	↓	SN=93,8% e ES=56,3%				
β2M	↑	AUC=0,658 (p<0,001)	iTRAQ, LC-MS, <i>Western blot</i>	PCa localizado - adenocarcinoma da próstata (n=90) e BPH (n=83)	Diagnóstico/PCa Vs. BPH	83
PGA3	↑	AUC=0,623 (p=0,006)				
MUC3	↑	AUC=0,605 (p=0,018)				
β2M + PGA3 + MUC3	↑	AUC=0,710 (p<0,001)				
β2M + PGA3 + MUC3 + PSA	↑	AUC=0,812 (p<0,001)				
TP53INP2	↓	SN=75% e ES=7%	LC-MS/MS, qRT-PCR	PCa (n=8), BPH (n=12) e controlos saudáveis (n=10)	Diagnóstico/PCa Vs. BPH	84
Fibronectina	↓	SN=75% e ES=50%				
Painel de 12 biomarcadores*	-----	SN=89% e ES=51%	CE-MS	Amostras pós-DRE: Identificação de marcadores: PCa (n=51) e	Diagnóstico/PCa Vs. BPH	14
ATPase de transporte de sódio/potássio γ	↓	-----				

PESQUISA DE BIOMARCADORES DE CANCRO DA PRÓSTATA PELA ANÁLISE PROTEÓMICA DA URINA

Colagéneo α -1 (III)	↓				lesões benignas (n=35); Validação dos marcadores: PCa (n=118), lesões benignas (n=95) e controlos saudáveis (n=138)	
Colagéneo α -1 (I)	↓					
SPR1	↓					
Painel de 12 biomarcadores**	-----	SN=86%, ES=59%, VPP=92%, VPP=43% e AUC=0,72	CE-MS	PCa (n=49) e BPH (n=135)	Diagnóstico/ PCa Vs. BPH	85
Uromodulina + Semenogelina I	↓, ↑	PCa Vs. BPH: SN=67,4% e ES=71,2%; PCa Vs. HGPIN: SN=81% e ES=80,8%; BPH Vs. HGPIN: SN=69,2% e ES=73,6%	HPLC - MALDI-TOF	1º Estudo: PCa (n=89), HGPIN (n=52), BPH (n=87) e controlos saudáveis (n=38); 2º Estudo: PCa (103) e controlos saudáveis (n=38)	Diagnóstico/ PCa Vs. BPH Vs. HGPIN	86
FABP5	↑	SN=60%, ES=100% e AUC=0,757			Diagnóstico/ Prognóstico	
Granulina		Deteção de PCa (p=0,011)	iTRAQ, LC-MS/MS, SRM/MRM	Amostras pós-DRE: PCa com GS 8-9 (n=6), PCa com GS 6 (n=6) e controlos saudáveis (n=6)	Prognóstico	34
AMBP	↑ só em GS elevado	Deteção de PCa associada a GS (p=0,014)				
CHMP4A e C		Associados a GS (p=0,016 e 0,042)				
CDK6	↑		2D-PAGE - MALDI-TOF	Margens cirúrgicas positivas para PCa com GS's e estadios tumorais diferentes (n=15) e margens cirúrgicas negativas para PCa (n=15)	Diagnóstico/ Prognóstico	65
LG3BP	↑					
LDH	↑					
TM256	↑	SN=94% e ES=100%	LC-MS, Western blot	PCa (n=16) e controlos saudáveis (n=15)	Diagnóstico	87
LAMTOR	↑	SN=81% e ES=100%				
VATL	↑	SN=75% e ES=100%				
ADIRF	↑	SN=81% e ES=100%				
TM256 + LAMTOR	↑	SN=100% e ES=100%				
Flotillin 2 + TM256 + Rab3B + LAMTOR	↑	SN=88% e ES=94%	Western blot	PCa (n=26) e controlos saudáveis (n=16)	Diagnóstico	88
Flotillin 2 + PARK7	↑	SN=68% e ES=93%	ELISA			
SPP1/OPN	↓	PD entre 0,65-0,77	LC-MS	Amostras pós-DRE: PCa (n=28), BPH (n=20) e controlos saudáveis (n=6)	Diagnóstico	28
	↑	AUC=0,68	ELISA	PCa localizado (n=65), PCa metastático (n=36) e controlos saudáveis (n=19)	Prognóstico	47
F2	↓	PD entre 0,68-0,72		Amostras pós-DRE: PCa (n=28), BPH (n=20) e controlos saudáveis (n=6)	Diagnóstico	
PYD	↑	PCa Vs. BPH (p=0,001) e níveis distintos em diferentes	LC-MS		Prognóstico/ PCa Vs. BPH	28
DPD	↑					

PESQUISA DE BIOMARCADORES DE CANCRO DA PRÓSTATA PELA ANÁLISE PROTEÓMICA DA URINA

		GS's e estadios de PCa (p=0,04)				
β-MSMB	↓	SN=28% e ES=100%	C18 ZipTip® - MALDI-TOF	Amostras pós-DRE: PCa (n=25) e Lesões benignas (BPH + prostatites + atrofia) (n=27)	Diagnóstico/ PCa Vs. lesões benignas	89
		AUC=0,77	ELISA	PCa (n=89) e Lesões benignas + controlos (n=215)		90
Fragmento C-terminal de PSA	↑	SN=86%, ES=57,9% e AUC=0,747	HPLC - MALDI-DIT-TOF	Amostras pós-DRE: PCa (n=50) e controlos saudáveis (n=19)	Diagnóstico	91
CD90	Presente em PCa e ausente pós-prostatectomia radical	-----	ICAT, LC-MS, SRM	PCa (n=3) e pós-prostatectomia radical (n=3)	Diagnóstico	92
Sarcosina	↑	AUC entre 0,57-0,71	LC-MS, GC-MS	PCa (n=59) e controlos saudáveis (n=51)	Diagnóstico	93
Painel de 72 biomarcadores***	49 ↑ e 23 ↓	SN=91,7% e ES=83,3%	SELDI-TOF	Amostras pós-DRE: PCa (n=57) e Lesões benignas (n=56)	Diagnóstico	94
Calgranulina B/MRP-14	Presente em PCa e não em BPH	-----	2D-PAGE - MALDI-TOF	Amostras pós-DRE: PCa(n=6) e BPH (n=6)	PCa Vs. BPH	95
ZAG	↑	SN=78,6%, ES=60% e AUC=0,68	Western blot	PCa (n=42), HGPIN (n=29) e controlos saudáveis (n=56)	Diagnóstico	49,52
EN2	↑	Correlação entre EN2 urinária, volume da próstata (p=0,006) e estadios tumorais T1 e T2 (p=0,027)		PCa com GS's diferentes (n=125)	Diagnóstico/ Prognóstico	68
		SN=66% e ES=88,2%	ELISA	PCa (n=82) e controlos saudáveis (n=102)	Diagnóstico	70
EN2	↑	PCa Vs. BPH com AUC=0,814 (valor dependente da massagem prostática)		PCa com GS's diferentes e estadios tumorais diferentes (n=66, 33 antes e 33 depois da massagem prostática) e BPH (n=76, 38 antes e 38 depois da massagem prostática)	Diagnóstico/ Prognóstico	96
		SN=73%, ES=63% e AUC=0,72	ELISA	Amostras pós-DRE: PCa (n=99), Sem PCa e baixo risco para a doença (n=20) e PCa após prostatectomia radical (n=69, com 30 pT2 e 39 pT3)	Diagnóstico/ Prognóstico	69
Anexina A3	↓	AUC entre 0,60-0,83	Western blot	Amostras pós-DRE: PCa - adenocarcinoma da próstata (n=368), PIN + BPH + controlos (n=223)	Diagnóstico	97
AMACR	↑	SN=100%, ES=58%	Western blot	PCa - adenocarcinoma da	Diagnóstico	98

PESQUISA DE BIOMARCADORES DE CANCRO DA PRÓSTATA PELA ANÁLISE PROTEÓMICA DA URINA

			VPN=88% e VPP=72%		próstata (n=12), Biópsia atípica (n=2) e controlos saudáveis (n=12)	
MCM5	↑		SN=82% e ES entre 73-93%	Imunofluorimetria	Amostras pós- DRE; PCa (n=88), Lesões benignas (n=331) e controlos saudáveis (n=28)	Diagnóstico ⁹⁹
αHGF	↑		AUC=0,75		PCa localizado (n=65), PCa metastático (n=36)	Diagnóstico ⁴⁷
IGFBP3	↑		AUC=0,74	ELISA	e controlos saudáveis (n=19)	
c-Met	↑		AUC=0,90	ELISA	PCa localizado (n=75) e PCa metastático (n=81)	Prognóstico ¹⁰⁰

Notas: ↑ Níveis proteicos aumentados; ↓ Níveis proteicos diminuídos; Vs. Distinção; + Combinação de biomarcadores. **Abreviaturas:** SN – Sensibilidade; ES – Especificidade; VPN – Valor preditivo negativo; VPP – Valor preditivo positivo; AUC – Área sob a curva; PD – Precisão de diagnóstico; PCa – Cancro da próstata; BPH – Hiperplasia benigna da próstata; HGPIN – Neoplasia intra-epitelial prostática de alto grau; DRE – Exame por toque retal; GS – Gleason Score; VCL – Vinculina; PAP – Fosfatase ácida da próstata; MMP-2 – Colagenase de 72 kDa tipo IV; MMP-9 – Metaloproteinase de matriz 9; ADAMTS-7 – *Disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-7*; NGAL – Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos; TIMP-1 – Inibidor de metaloproteinase 1; ADAM-12 – *Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 12*; AMBP – *Alfa-1-microglobulina/ bikunina precursor*; ITIH4f – Cadeia pesada 4 do inibidor da inter-alfa-tripsina; TF – Transferrina; HP – Haptoglobina; β2M – β-2-microglobulina; PGA3 – Pepsinogéneo 3, grupo I; MUC3 – Mucina intestinal pequena; PSA – Antígeno específico da próstata; TP53INP2 – *Tumor protein P53 inducible nuclear protein 2*; SPR1 – *Psoriasis susceptibility 1 candidate gene 2 protein*; fPSA – PSA livre; FABP5 – Proteína de ligação de ácidos gordos 5; CHMP – *Charged multivesicular body protein*; CDK6 – Cinase dependente de ciclina 6; LG3BP – Proteína de ligação a galectina-3; LDH – Cadeia C de L-lactato desidrogenase; TM256 – Proteína transmembranar 256; LAMTOR – *Late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK And MTOR activator*; VATL – Subunidade proteolípídica ATPase 16 kDa de protão do tipo V; ADIRF – *Adipogenesis regulatory factor*; Rab3B – Proteína relacionada com Ras; PARK7 – Deglicase associada ao parkinsonismo; SPP1/OPN – Múltiplos péptidos derivados de osteopontina; F2 – Protrombina; PYD – Piridinolina; DPD – Deoxipiridinolina; β-MSMB – β-microseminoproteína; CD90 – Glicoproteína de membrana thy-1; ZAG – α2-glicoproteína de zinco; EN2 – Engrailed-2; CD105 – Endoglin; AMACR – *Alpha methylacyl coenzyme A racemase*; MCM5 – Manutenção de minicromossoma 5; αHGF – Fator de crescimento de hepatócitos α; IGFBP3 – Proteína de ligação ao fator de crescimento insulínico 3; c-Met – Recetor de tirosina cinase para HGF; MS – Espectrometria de massa; 2DE – Eletroforese em gel bidimensional; iTRAQ – *Isobaric tags for relative and absolute quantitation*; ICAT – *Isotope-coded affinity tag*; MALDI-TOF – Adsorção/ionização por laser assistida por matriz – Espectrometria de massa de tempo de voo; SELDI – Ionização e dessorção por laser de superfície; LC-MS – Cromatografia líquida acoplada a MS; GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada a MS; CE-MS – Eletroforese capilar acoplada a MS; SRM/MRM – Monitoração de reação selecionada/monitoramento de reação múltipla; ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*; SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sódio; RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real.

* Polipéptidos com Massa (Da): 1552,56; 1584,58; 1680,82; 1714,62; 1725,66; 1925,90; 2282,07; 3092,00; 3409,72; 3425,68; 3765,54; 10770,20.

** Marcadores inseridos no painel não referidos pelos autores.

*** Picos identificados como sobre-expressos no PCa, m/z: 2670; 2776; 2797; 2978; 3003; 3023; 3174; 3204; 3272; 3375; 3461; 3496; 3721; 3773; 3786; 3851; 3897; 3938; 3997; 4026; 4028; 4056; 4478; 4544; 4582; 4761; 4763; 4781; 4828; 4862; 4968; 5017; 5817; 6200; 6481; 8030; 8037; 8202; 8309; 8871; 9098; 9102; 9207; 9281; 9780; 9905; 9990. Picos identificados como sub-expressos no PCa, m/z: 4702; 4827; 5333; 5339; 5384; 5395; 7281; 7589; 7764; 10668; 10677; 10678; 10778; 10782; 10788; 10888; 10985; 10995; 11201; 11397; 13909; 28094; 38025.

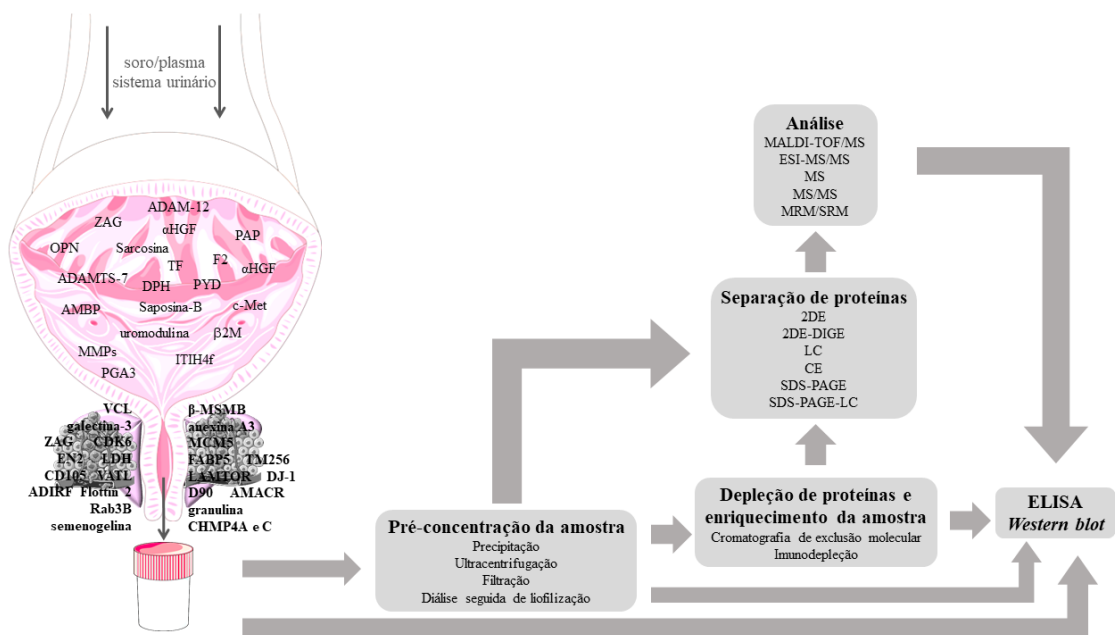


Figura I: Fluxograma em que evidencia as várias etapas necessárias para a identificação de biomarcadores de CPa na urina. A origem provável das proteínas propostas como biomarcadores de CPa na urina é também apresentada. A abreviatura das proteínas tem correspondência na Tabela I. Figura realizada com o *Servier Medical Art*.

Referências

1. Roddam AW, Duffy MJ, Hamdy FC, et al. Use of prostate-specific antigen (PSA) isoforms for the detection of prostate cancer in men with a PSA level of 2-10 ng/ml: systematic review and meta-analysis. *Eur Urol* 2005; 48(3): 386-399; discussion 398-399. Disponível em: [http://www.europeanurology.com/article/S0302-2838\(05\)00260-5/fulltext](http://www.europeanurology.com/article/S0302-2838(05)00260-5/fulltext)
2. Mikolajczyk SD, Marks LS, Partin AW, Rittenhouse HG. Free prostate-specific antigen in serum is becoming more complex. *Urology* 2002; 59(6): 797–802. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12031356>
3. Khan MA, Sokoll LJ, Chan DW, et al. Clinical utility of proPSA and «benign» PSA when percent free PSA is less than 15%. *Urology* 2004; 64(6): 1160–4. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090429504007903>
4. Saini S. PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. *Cell Oncol Dordr* 2016; 39(2): 97–106. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4821699/>
5. Van der Kwast TH, Lopes C, Martikainen PM, et al. Report of the Pathology Committee: false-positive and false-negative diagnoses of prostate cancer. *BJU Int* 2003; 92 Suppl 2: 62–5. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14983958>
6. Good DM, Thongboonkerd V, Novak J, et al. Body fluid proteomics for biomarker discovery: lessons from the past hold the key to success in the future. *J Proteome Res* 2007; 6(12): 4549–55. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/pr070529w>
7. Thongboonkerd V. Urinary proteomics: towards biomarker discovery, diagnostics and prognostics. *Mol Biosyst* 2008; 4(8): 810–5. Disponível em: <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2008/MB/b802534g#!divAbstract>
8. Sedic M, Gethings LA, Vissers JPC, et al. Label-free mass spectrometric profiling of urinary proteins and metabolites from paediatric idiopathic nephrotic syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 452(1): 21–6. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X14014223?via%3Dihub>

9. Lee RS, Monigatti F, Briscoe AC, Waldon Z, Freeman MR, Steen H. Optimizing sample handling for urinary proteomics. *J Proteome Res* 2008; 7(9): 4022–30. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/pr800301h>
10. Mischak H, Julian B A, Novak J. High-resolution proteome/peptidome analysis of peptides and low-molecular-weight proteins in urine. *Proteomics Clin Appl*. 2007; 1(8): 792-814. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2811330/>
11. Kalantari S, Jafari A, Moradpoor R, Ghasemi E, Khalkhal E. Human Urine Proteomics: Analytical Techniques and Clinical Applications in Renal Diseases. *Int J Proteomics* 2015; 2015(782798): 1-17. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4677025/>
12. Olszowy P, Buszewski B. Urine sample preparation for proteomic analysis. *J Sep Sci* 2014; 37(20): 2920–8. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jssc.201400331/abstract;jsessionid=66EAB6746FAB8A17895E6CBF7D8653F7.f02t02>
13. Mischak H, Massy ZA, Jankowski J. Proteomics in uremia and renal disease. *Semin Dial* 2009; 22(4): 409–16. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1525-139X.2009.00591.x/abstract>
14. Theodorescu D, Schiffer E, Bauer HW, et al. Discovery and validation of urinary biomarkers for prostate cancer. *Proteomics Clin Appl* 2008; 2(4): 556–70. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2744126/>
15. Thongboonkerd V. Practical points in urinary proteomics. *J Proteome Res* 2007; 6(10): 3881–90. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/pr070328s>
16. Klein J, Bascands J-L, Mischak H, Schanstra JP. The role of urinary peptidomics in kidney disease research. *Kidney Int* 2016; 89(3): 539–45. Disponível em: [http://www.kidney-international.theisn.org/article/S0085-2538\(15\)00124-6/fulltext](http://www.kidney-international.theisn.org/article/S0085-2538(15)00124-6/fulltext)
17. Kim MJ, Frankel AH, Tam FWK. Urine proteomics and biomarkers in renal disease. *Nephron Exp Nephrol* 2011; 119(1): e1-7. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/324223>
18. Thomas S, Hao L, Ricke WA, Li L. Biomarker Discovery in Mass Spectrometry-based Urinary Proteomics. *Proteomics Clin Appl* 2016; 10(4): 358–70. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4888976/>

19. Mermelekas G, Vlahou A, Zoidakis J. SRM/MRM targeted proteomics as a tool for biomarker validation and absolute quantification in human urine. *Expert Rev Mol Diagn* 2015; 15(11): 1441–54. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14737159.2015.1093937>
20. Frantzi M, Latosinska A, Merseburger AS, Mischak H. Recent progress in urinary proteome analysis for prostate cancer diagnosis and management. *Expert Rev Mol Diagn* 2015; 15(12): 1539–54. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14737159.2015.1104248>
21. Han X, Aslanian A, Yates JR. Mass Spectrometry for Proteomics. *Curr Opin Chem Biol* 2008; 12(5): 483–90. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2642903/>
22. Jayapalan JJ, Ng KL, Shuib AS, Razack AHA, Hashim OH. Urine of patients with early prostate cancer contains lower levels of light chain fragments of inter-alpha-trypsin inhibitor and saposin B but increased expression of an inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4 fragment. *Electrophoresis* 2013; 34(11): 1663–9. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elps.201200583/abstract>
23. Di Meo A, Pasic MD, Yousef GM. Proteomics and peptidomics: moving toward precision medicine in urological malignancies. *Oncotarget* 2016; 7(32): 52460–74. Disponível em: [http://www.oncotarget.com/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path\[\]=8931&path\[\]=27000](http://www.oncotarget.com/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path[]=8931&path[]=27000)
24. Davalieva K, Kiprijanovska S, Komina S, Petrusevska G, Zografska NC, Polenakovic M. Proteomics analysis of urine reveals acute phase response proteins as candidate diagnostic biomarkers for prostate cancer. *Proteome Sci* 2015; 13(1): 2-18. Disponível em: <https://proteomesci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12953-014-0059-9>
25. Frantzi M, Bhat A, Latosinska A. Clinical proteomic biomarkers: relevant issues on study design & technical considerations in biomarker development. *Clin Transl Med* 2014; 3: 7. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3994249/>

26. Decramer S, Gonzalez de Peredo A, Breuil B, et al. Urine in clinical proteomics. *Mol Cell Proteomics MCP* 2008; 7(10): 1850–62. Disponível em: <http://www.mcponline.org/content/7/10/1850>
27. Fliser D, Novak J, Thongboonkerd V, et al. Advances in urinary proteome analysis and biomarker discovery. *J Am Soc Nephrol JASN* 2007; 18(4): 1057–71. Disponível em: <http://jasn.asnjournals.org/content/18/4/1057>
28. Li C, Zang T, Wrobel K, Huang JT-J, Nabi G. Quantitative urinary proteomics using stable isotope labelling by peptide dimethylation in patients with prostate cancer. *Anal Bioanal Chem* 2015; 407(12): 3393–404. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00216-015-8569-6>
29. Mischak H, Vlahou A, Ioannidis JPA. Technical aspects and inter-laboratory variability in native peptide profiling: the CE-MS experience. *Clin Biochem* 2013; 46(6): 432–43. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912012005553?via%3Dihub>
30. Pavlou MP, Diamandis EP, Blasutig IM. The long journey of cancer biomarkers from the bench to the clinic. *Clin Chem* 2013; 59(1): 147–57. Disponível em: <http://clinchem.aaccjnls.org/content/59/1/147>
31. Kobayashi H, Suzuki M, Hirashima Y, Terao T. The protease inhibitor bikunin, a novel anti-metastatic agent. *Biol Chem* 2003; 384(5): 749–54. Disponível em: <https://www.degruyter.com/view/j/bchm.2003.384.issue-5/bc.2003.083/bc.2003.083.xml>
32. Tsui K-H, Tang P, Lin C-Y, Chang P-L, Chang C-H, Yung BY-M. Bikunin loss in urine as useful marker for bladder carcinoma. *J Urol* 2010; 183(1): 339–44. Disponível em: [http://www.jurology.com/article/S0022-5347\(09\)02322-2/fulltext](http://www.jurology.com/article/S0022-5347(09)02322-2/fulltext)
33. Pugia MJ, Valdes R, Jortani SA. Bikunin (urinary trypsin inhibitor): structure, biological relevance, and measurement. *Adv Clin Chem* 2007; 44: 223–45. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17682344>
34. Fujita K, Kume H, Matsuzaki K, et al. Proteomic analysis of urinary extracellular vesicles from high Gleason score prostate cancer. *Sci Rep* 2017; 7: 42961. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5314323/>

35. Thoms JW, Dal Pra A, Anborgh PH, et al. Plasma osteopontin as a biomarker of prostate cancer aggression: relationship to risk category and treatment response. *Br J Cancer* 2012; 107(5): 840–6. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3425969/>
36. Shevde LA, Samant RS. Role of osteopontin in the pathophysiology of cancer. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol* 2014; 37: 131–41. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0945053X14000444?via%3Dihub>
37. Desai B, Ma T, Chellaiah MA. Invadopodia and Matrix Degradation, a New Property of Prostate Cancer Cells during Migration and Invasion. *J Biol Chem.* 2008; 283(20): 13856–66. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2376228/>
38. Ding Z, Wu C-J, Chu GC, et al. SMAD4-dependent barrier constrains prostate cancer growth and metastatic progression. *Nature* 2011; 470(7333): 269–73. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature09677>
39. Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 2005; 436(7051): 725–30. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1939938/>
40. Flajollet S, Tian TV, Flourens A, et al. Abnormal expression of the ERG transcription factor in prostate cancer cells activates osteopontin. *Mol Cancer Res MCR* 2011; 9(7): 914–24. Disponível em: <http://mcr.aacrjournals.org/content/9/7/914>
41. Abou-Ouf H, Zhao L, Bismar TA. ERG expression in prostate cancer: biological relevance and clinical implication. *J Cancer Res Clin Oncol* 2016; 142(8): 1781–93. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00432-015-2096-x>
42. Cancer Genome Atlas Research Network. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell* 2015; 163(4): 1011–25. Disponível em: [http://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(15\)01339-2?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867415013392%3Fshowall%3Dtrue](http://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(15)01339-2?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867415013392%3Fshowall%3Dtrue)
43. Tian TV, Tomavo N, Huot L, et al. Identification of novel TMPRSS2:ERG mechanisms in prostate cancer metastasis: involvement of MMP9 and PLXNA2.

- Oncogene 2014; 33(17): 2204–14. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/onc2013176>
44. Ahearn TU, Pettersson A, Ebot EM et al. A Prospective Investigation of PTEN Loss and ERG Expression in Lethal Prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst* 2016; 108(2):djv346. Disponível em: <https://academic.oup.com/jnci/article/108/2/djv346/2457815>
45. Iljin K, Wolf M, Edgren H, et al. TMPRSS2 fusions with oncogenic ETS factors in prostate cancer involve unbalanced genomic rearrangements and are associated with HDAC1 and epigenetic reprogramming. *Cancer Res* 2006; 66(21): 10242–6. Disponível em: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/66/21/10242>
46. Börno ST, Fischer A, Kerick M, et al. Genome-wide DNA methylation events in TMPRSS2-ERG fusion-negative prostate cancers implicate an EZH2-dependent mechanism with miR-26a hypermethylation. *Cancer Discov* 2012; 2(11): 1024–35. Disponível em: <http://cancerdiscovery.aacrjournals.org/content/2/11/1024>
47. Prager AJ, Peng CR, Lita E, et al. Urinary aHGF, IGFBP3 and OPN as diagnostic and prognostic biomarkers for prostate cancer. *Biomark Med* 2013; 7(6): 831–41. Disponível em: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/bmm.13.112>
48. Tilli TM, Mello KD, Ferreira LB, et al. Both osteopontin-c and osteopontin-b splicing isoforms exert pro-tumorigenic roles in prostate cancer cells. *The Prostate* 2012; 72(15): 1688–99. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pros.22523/abstract>
49. Katafigiotis I, Tyrizis SI, Stravodimos KG, et al. Zinc α 2-glycoprotein as a potential novel urine biomarker for the early diagnosis of prostate cancer. *BJU Int* 2012; 110(11 Pt B): E688-693. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1464-410X.2012.11501.x/abstract>
50. Hale LP, Price DT, Sanchez LM, Demark-Wahnefried W, Madden JF. Zinc alpha-2-glycoprotein is expressed by malignant prostatic epithelium and may serve as a potential serum marker for prostate cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2001; 7(4): 846–53. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11309332>

51. Hirai K, Hussey HJ, Barber MD, Price SA, Tisdale MJ. Biological evaluation of a lipid-mobilizing factor isolated from the urine of cancer patients. *Cancer Res* 1998; 58(11): 2359–65. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9622075>
52. Katafigioti A, Katafigiotis I, Sfoungaristos S, et al. In the search of novel urine biomarkers for the early diagnosis of prostate cancer. Intracellular or secreted proteins as the target group? Where and how to search for possible biomarkers useful in the everyday clinical practice. *Arch Ital Urol Androl Organo Uff Soc Ital Ecogr Urol E Nefrol* 2016; 88(3): 195–200. Disponível em: <http://www.pagepressjournals.org/index.php/aiua/article/view/aiua.2016.3.195>
53. Henshall SM, Horvath LG, Quinn DI, et al. Zinc-alpha2-glycoprotein expression as a predictor of metastatic prostate cancer following radical prostatectomy. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98(19): 1420–4. Disponível em: <https://academic.oup.com/jnci/article/98/19/1420/2521820>
54. Sánchez LM, López-Otín C, Bjorkman PJ. Biochemical characterization and crystallization of human Zn-alpha2-glycoprotein, a soluble class I major histocompatibility complex homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(9): 4626–30. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9114041>
55. Geisler C, Gaisa NT, Pfister D, et al. Identification and validation of potential new biomarkers for prostate cancer diagnosis and prognosis using 2D-DIGE and MS. *BioMed Res Int* 2015; 2015(454256): 1-23. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/454256/>
56. Peng X, Nelson ES, Maiers JL, DeMali KA. New insights into vinculin function and regulation. *Int Rev Cell Mol Biol* 2011; 287: 191–231. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123860439000050?via%3Dihub>
57. Ruiz C, Holz DR, Oeggerli M, et al. Amplification and overexpression of vinculin are associated with increased tumour cell proliferation and progression in advanced prostate cancer. *J Pathol* 2011; 223(4): 543–52. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/path.2828/abstract>
58. Rubashkin M, Cassereau L, Bainer R, et al. Force engages vinculin and promotes tumor progression by enhancing PI3-kinase activation of phosphatidylinositol

- (3,4,5)-triphosphate. *Cancer Res* 2014; 74(17): 4597–611. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4191931/>
59. Gunia S, Koch S, May M, Dietel M, Erbersdobler A. Expression of prostatic acid phosphatase (PSAP) in transurethral resection specimens of the prostate is predictive of histopathologic tumor stage in subsequent radical prostatectomies. *Virchows Arch Int J Pathol* 2009; 454(5): 573–9. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00428-009-0759-1>
60. Veeramani S, Yuan T-C, Chen S-J, et al. Cellular prostatic acid phosphatase: a protein tyrosine phosphatase involved in androgen-independent proliferation of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12(4): 805–22. Disponível em: <http://erc.endocrinology-journals.org/content/12/4/805>
61. Merseburger AS, Kramer MW, Hennenlotter J, et al. Involvement of decreased Galectin-3 expression in the pathogenesis and progression of prostate cancer. *The Prostate* 2008; 68(1): 72–7. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pros.20688/abstract>
62. Knapp JS, Lokeshwar SD, Vogel U, et al. Galectin-3 expression in prostate cancer and benign prostate tissues: correlation with biochemical recurrence. *World J Urol* 2013; 31(2): 351–8. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00345-012-0925-y>
63. Chen S-C, Kuo P-L. The Role of Galectin-3 in the Kidneys. *Int J Mol Sci* 2016; 17(4): 565-74. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4849021/>
64. Nangia-Makker P, Wang Y, Raz T, et al. Cleavage of galectin-3 by matrix metalloproteases induces angiogenesis in breast cancer. *Int J Cancer* 2010; 127(11): 2530–41. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.25254/abstract>
65. Heger Z, Michalek P, Guran R, et al. Differences in urinary proteins related to surgical margin status after radical prostatectomy. *Oncol Rep* 2015; 34(6): 3247–55. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2015.4322>
66. Tadesse S, Yu M, Kumarasiri M, Le BT, Wang S. Targeting CDK6 in cancer: State of the art and new insights. *Cell Cycle Georget Tex* 2015; 14(20): 3220–30.

- Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15384101.2015.1084445>
67. Lim JTE, Mansukhani M, Weinstein IB. Cyclin-dependent kinase 6 associates with the androgen receptor and enhances its transcriptional activity in prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(14): 5156–61. Disponível em: <http://www.pnas.org/content/102/14/5156>
 68. Pandha H, Sorensen KD, Orntoft TF, et al. Urinary engrailed-2 (EN2) levels predict tumour volume in men undergoing radical prostatectomy for prostate cancer. *BJU Int* 2012; 110(6 Pt B): E287-292. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1464-410X.2012.11208.x/abstract>
 69. Fujita K, Ewing CM, Chan DYS, et al. Endoglin (CD105) as a urinary and serum marker of prostate cancer. *Int J Cancer* 2009; 124(3): 664–9. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.24007/abstract>
 70. Morgan R, Boxall A, Bhatt A, et al. Engrailed-2 (EN2): a tumor specific urinary biomarker for the early diagnosis of prostate cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2011; 17(5): 1090–8. Disponível em: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/17/5/1090>
 71. Bose SK, Bullard RS, Donald CD. Oncogenic Role of Engrailed-2 (En-2) in Prostate Cancer Cell Growth and Survival. *Transl Oncogenomics* 2008; 3: 37–43. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3022358/>
 72. Nassiri F, Cusimano MD, Scheithauer BW, et al. Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer Res* 2011; 31(6): 2283–90. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21737653>
 73. Kassouf W, Ismail HRA, Aprikian AG, Chevalier S. Whole-mount prostate sections reveal differential endoglin expression in stromal, epithelial, and endothelial cells with the development of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2004; 7(2): 105–10. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/4500716>
 74. Santos CR, Schulze A. Lipid metabolism in cancer. *FEBS J* 2012; 279(15): 2610–23. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1742-4658.2012.08644.x/abstract>

75. Kawaguchi K, Senga S, Kubota C, Kawamura Y, Ke Y, Fujii H. High expression of Fatty Acid-Binding Protein 5 promotes cell growth and metastatic potential of colorectal cancer cells. *FEBS Open Bio* 2016; 6(3): 190–9. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4794781/>
76. Bao Z, Malki MI, Forootan SS, et al. A novel cutaneous Fatty Acid-binding protein-related signaling pathway leading to malignant progression in prostate cancer cells. *Genes Cancer* 2013; 4(7–8): 297–314. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1947601913499155>
77. Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009; 9(8): 581–93. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri2567>
78. Szatanek R, Baran J, Siedlar M, Baj-Krzyworzeka M. Isolation of extracellular vesicles: Determining the correct approach (Review). *Int J Mol Med* 2015; 36(1): 11–7. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2015.2194>
79. Fonseca P, Vardaki I, Occhionero A, Panaretakis T. Metabolic and Signaling Functions of Cancer Cell-Derived Extracellular Vesicles. *Int Rev Cell Mol Biol* 2016; 326: 175–99. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1937644816300363?via%3Dihub>
80. Li P, Kaslan M, Lee SH, Yao J, Gao Z. Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics* 2017; 7(3): 789–804. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5327650/>
81. Roy R, Louis G, Loughlin KR, et al. Tumor-specific urinary matrix metalloproteinase fingerprinting: identification of high molecular weight urinary matrix metalloproteinase species. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2008; 14(20): 6610–7. Disponível em: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/14/20/6610>
82. Bilgin Doğru E, Dizdar Y, Akşit E, Ural F, Şanlı Ö, Yasasever V. EMMPRIN and ADAM12 in prostate cancer: preliminary results of a prospective study. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med* 2014; 35(11): 11647–53. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13277-014-2514-8>

83. Jedinak A, Curatolo A, Zurakowski D, et al. Novel non-invasive biomarkers that distinguish between benign prostate hyperplasia and prostate cancer. *BMC Cancer* 2015; 15:259. Disponível em: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-015-1284-z>
84. Haj-Ahmad TA, Abdalla MA, Haj-Ahmad Y. Potential Urinary Protein Biomarker Candidates for the Accurate Detection of Prostate Cancer among Benign Prostatic Hyperplasia Patients. *J Cancer* 2014; 5(2): 103–14. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3909765/>
85. Schiffer E, Bick C, Grizelj B, Pietzker S, Schöfer W. Urinary proteome analysis for prostate cancer diagnosis: cost-effective application in routine clinical practice in Germany. *Int J Urol Off J Jpn Urol Assoc* 2012; 19(2): 118–25. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1442-2042.2011.02901.x/abstract>
86. M’Koma AE, Blum DL, Norris JL, et al. Detection of pre-neoplastic and neoplastic prostate disease by MADI profiling of urine. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 353(3): 829–34. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2562600/>
87. Øverbye A, Skotland T, Koehler CJ, et al. Identification of prostate cancer biomarkers in urinary exosomes. *Oncotarget* 2015; 6(30): 30357–76. Disponível em: [http://www.oncotarget.com/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path\[\]=4851&path\[\]=11040](http://www.oncotarget.com/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path[]=4851&path[]=11040)
88. Wang L, Skotland T, Berge V, Sandvig K, Llorente A. Exosomal proteins as prostate cancer biomarkers in urine: From mass spectrometry discovery to immunoassay-based validation. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci* 2017; 98: 80–5. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098716303888?via%3Dihub>
89. Flatley B, Wilmott KG, Malone P, Cramer R. MALDI MS profiling of post-DRE urine samples highlights the potential of β -microseminoprotein as a marker for prostatic diseases. *The Prostate* 2014; 74(1): 103–11. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pros.22736/abstract>
90. Whitaker HC, Kote-Jarai Z, Ross-Adams H, et al. The rs10993994 risk allele for prostate cancer results in clinically relevant changes in microseminoprotein-beta

- expression in tissue and urine. *PloS One* 2010; 5(10): e13363. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0013363>
91. Nakayama K, Inoue T, Sekiya S, et al. The C-terminal fragment of prostate-specific antigen, a 2331 Da peptide, as a new urinary pathognomonic biomarker candidate for diagnosing prostate cancer. *PloS One* 2014; 9(9): e107234. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0107234>
 92. True LD, Zhang H, Ye M, et al. CD90/THY1 is overexpressed in prostate cancer-associated fibroblasts and could serve as a cancer biomarker. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* 2010; 23(10): 1346–56. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/modpathol2010122>
 93. Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM, et al. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature* 2009; 457(7231): 910–4. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature07762>
 94. Okamoto A, Yamamoto H, Imai A, et al. Protein profiling of post-prostatic massage urine specimens by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry to discriminate between prostate cancer and benign lesions. *Oncol Rep* 2009; 21(1): 73–9. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19082445>
 95. Rehman I, Azzouzi AR, Catto JWF, et al. Proteomic analysis of voided urine after prostatic massage from patients with prostate cancer: a pilot study. *Urology* 2004; 64(6): 1238–43. Disponível em: [http://www.goldjournal.net/article/S0090-4295\(04\)00831-3/fulltext](http://www.goldjournal.net/article/S0090-4295(04)00831-3/fulltext)
 96. Marszałł MP, Sroka W, Adamowski M, et al. Engrailed-2 protein as a potential urinary prostate cancer biomarker: a comparison study before and after digital rectal examination. *Eur J Cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ ECP* 2015; 24(1): 51–6. Disponível em: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00008469-201501000-00008>
 97. Schostak M, Schwall GP, Poznanović S, et al. Annexin A3 in urine: a highly specific noninvasive marker for prostate cancer early detection. *J Urol* 2009; 181(1) :343–53. Disponível em: [http://www.jurology.com/article/S0022-5347\(08\)02411-7/fulltext](http://www.jurology.com/article/S0022-5347(08)02411-7/fulltext)

98. Rogers CG, Yan G, Zha S, et al. Prostate cancer detection on urinalysis for alpha methylacyl coenzyme a racemase protein. *J Urol* 2004; 172(4 Pt 1): 1501–3. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15371879>
99. Dudderidge TJ, Kelly JD, Wollenschlaeger A, et al. Diagnosis of prostate cancer by detection of minichromosome maintenance 5 protein in urine sediments. *Br J Cancer* 2010; 103(5): 701–7. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/6605785>
100. Russo AL, Jedlicka K, Wernick M, et al. Urine analysis and protein networking identify met as a marker of metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2009; 15(13): 4292–8. Disponível em: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/15/13/4292>

2. OBJETIVOS

As limitações inerentes às metodologias atualmente em uso na clínica para o diagnóstico/prognóstico de cancro da próstata (PCa) têm fomentado a pesquisa de novos biomarcadores em amostras obtidas de forma não invasiva como a urina. Neste sentido, a presente dissertação teve como objetivo principal identificar novos potenciais biomarcadores de PCa em amostras de urina e relacionar com o estadio da doença. Para o efeito, utilizou-se um modelo animal de PCa e coletaram-se amostras de urina em dois estadios da doença para análise por GeLC-MS/MS, seguida da análise dos resultados com ferramentas bioinformáticas. Adicionalmente, analisaram-se alvos proteicos selecionados com base na análise da literatura descrita na seção 1.1.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

De forma a concretizar o objetivo da presente dissertação delineou-se o desenho experimental resumido na Figura 1. Na seção seguinte é feita uma descrição mais detalhada do protocolo implementado.

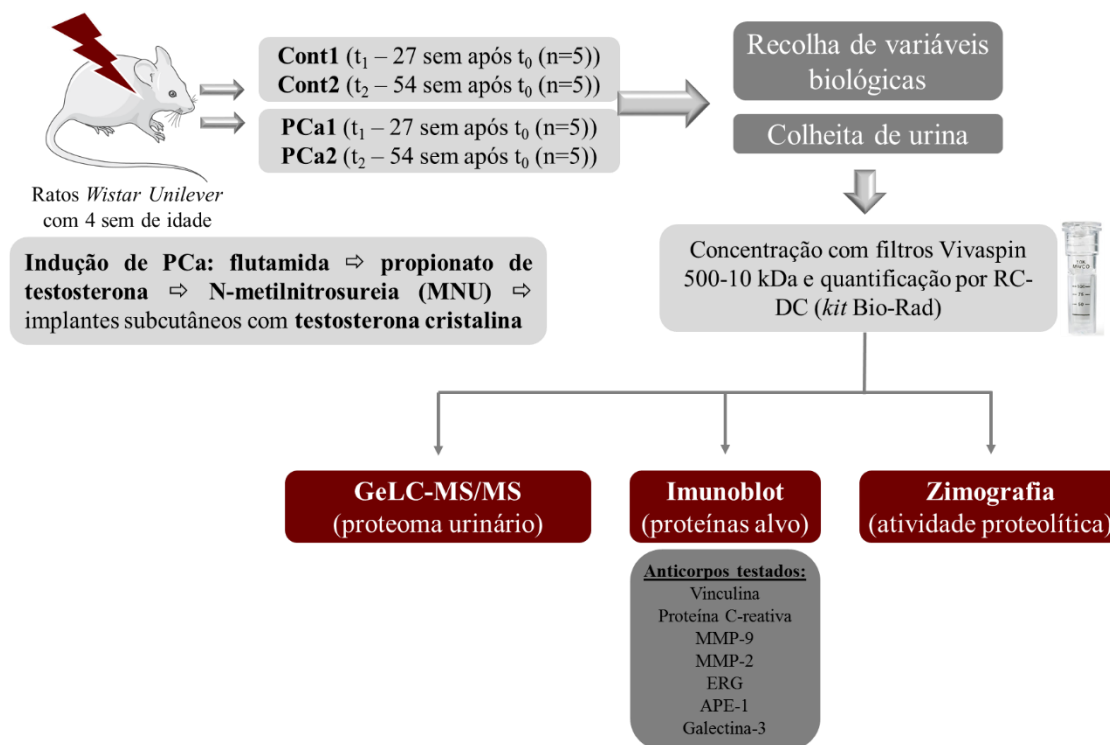


Figura 1: Esquema representativo do protocolo experimental implementado para pesquisa de biomarcadores de PCa na urina (sem: semanas; t_0 : *time point* zero – indução de PCa; t_1 : *time point* 1 – 27 sem após t_0 ; t_2 : *time point* 2 – 54 sem após t_0).

3.1. Protocolo animal

Neste trabalho foram utilizados 20 ratos machos da estirpe *Wistar Unilever* (WU) com 4 semanas de idade. Os animais foram adquiridos à empresa Charles River Laboratories (França). Após a sua chegada, os ratos foram colocados em quarentena durante duas semanas, sendo distribuídos aleatoriamente, cinco por gaiola. Os animais foram mantidos no biotério da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD) em condições ambientais controladas: temperatura $18 \pm 2^\circ\text{C}$, luz de 12 horas de dia e 12 horas de noite e humidade relativa de $55 \pm 5\%$. Este protocolo animal foi autorizado pelo Órgão Responsável pelo Bem-Estar Animal da UTAD e pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (licença nº 021326).

De forma a induzir-se quimicamente lesões da próstata a 10 ratos (grupos PCa), procedeu-se à administração subcutânea de flutamida (20 mg/Kg, preparada em 10% propilenoglicol e 5% etanol) durante 21 dias consecutivos. Dois dias após a administração de flutamida, injetou-se subcutaneamente propionato de testosterona (100 mg/Kg, dissolvido em óleo de milho (Sigma)). Após dois dias, administrou-se intraperitonealmente N-metilnitrosureia (MNU, 30 mg/Kg preparada em tampão citrato 0,1 M pH 4,8). Quinze dias após a administração da MNU, procedeu-se à colocação de implantes subcutâneos com testosterona cristalina (Sigma) na região interescapular, através uma pequena incisão seguida da sutura. Este procedimento foi realizado sob anestesia (75 mg/Kg ketamina e 10 mg/Kg xilazina) e os implantes (Dow Corning) foram preparados com tubos de silicone médico, 4 cm preenchidos com a testosterona, e cujas extremidades foram seladas com cola médica (G.E. RTV-108).

Após 27 semanas do início do protocolo, metade dos animais controlo (CONT1, n=5) e metade dos animais PCa (PCa1, n=5) foram eutanaziados através de uma sobredosagem de anestésicos (associação de ketamina com xilazina), administrada por via intraperitoneal, seguida de exsanguinação por punção cardíaca. Recolheram-se as próstatas para análise macroscópica e histopatológica (realizada na UTAD no âmbito de um projeto de investigação).

Após 54 semanas do início do protocolo, procedeu-se à eutanásia dos restantes animais (CONT2, n=5 e PCa2, n=5) através de uma sobredosagem dos mesmos anestésicos, por via intraperitoneal, seguida de exsanguinação por punção cardíaca. Recolheram-se as próstatas para análise macroscópica e histopatológica (realizada na UTAD no âmbito de um projeto de investigação).

3.2. Recolha e preparação de urina

Para a recolha da urina, na semana que precedeu a eutanásia dos animais, estes foram colocados em gaiolas metabólicas durante a noite. As amostras foram centrifugadas a 1000g durante 10 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi guardado a -80°C até ser analisado. Um volume de 400 µL de sobrenadante foi concentrado utilizando filtros de 10 kDa (Vivaspin 500-10 kDa, Sartorius Biotech). O retentato foi suspenso em 100 µL de Tris 0,5 M pH 6,8 e 4% de SDS. O teor de proteína total foi estimado usando o *kit* comercial RC-DC (Bio-Rad, Hercules, Califórnia) que se baseia no método de Lowry. Para a preparação da curva de calibração

utilizaram-se soluções de albumina sérica bovina (BSA) na gama de concentrações 0,15-10 mg/mL.

3.3. Separação de proteínas por SDS-PAGE

Procedeu-se à separação das proteínas de urina por aplicação de 20 µg ou 50 µg de amostra de cada grupo experimental em um gel SDS-PAGE 12,5%, preparado como anteriormente descrito.¹² Resumidamente, ao volume de amostra equivalente a 20 µg de proteína foi adicionado tampão Tris-HCl 0,5M pH 6,8 até um volume final de 7 µL. O tampão de carga (Tris-HCl 0,5M pH 6,8, 15% glicerol, 4% SDS, 20% 2-mercaptoetanol e pós de azul de bromofenol) foi adicionado às amostras na proporção de 1:1 (v/v) tendo-se, posteriormente, aquecido a mistura a 100°C durante 5 minutos e, subsequentemente, aplicado no gel. O gel de separação continha 12,5% Acrilamida/Bis-acrilamida (37,5:1), tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 0,1% SDS, 0,05% persulfato de amónia e 0,05% TEMED. O gel de empacotamento foi preparado com 4% Acrilamida/Bis-acrilamida (37,5:1), tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 0,1% SDS, 0,05% persulfato de amónia e 0,1% TEMED. O tampão de corrida utilizado foi Tris-glicina (25 mM Tris, 192 mM glicina e 0,1% (v/v) SDS, pH 8,6) e a separação eletroforética das proteínas foi feita durante 45 minutos a 200 V. As proteínas foram fixadas no gel durante 1 hora com solução 10% (v/v) ácido acético e 40% (v/v) metanol. O gel foi corado *overnight* com *Colloidal Coomassie Blue G250* (0,4% (m/v) em 50% (v/v) de etanol e 10% (v/v) de ácido acético), e descorado com uma solução de 25% (v/v) metanol. As imagens foram adquiridas usando o *scanner* da Li-Cor Odyssey (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska).

3.4. Digestão em gel

Cada *lane* do gel foi cortada em 7 porções, posteriormente tratadas com 100 mM NH₄HCO₃ e acetonitrilo para remoção da solução corante. As proteínas foram ainda reduzidas com ditioneitol (10 mM DTT durante 30 min a 60°C), alquiladas no escuro com iodoacetamida (55 mM IAA durante 30 min a 25°C) e novamente tratadas com 100 mM NH₄HCO₃ e acetonitrilo antes de serem digeridas com tripsina (Pierce, Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) na proporção de 1:25 durante 16 h a 37°C. Os péptidos resultantes foram extraídos com 10% ácido fórmico (FA) e com uma solução de 10% FA: acetonitrilo (1:1), após o que foram secos sob vácuo. Os péptidos foram ressuspensos em 5% acetonitrilo e 0,5% ácido trifluoroacético e purificados com recurso a colunas Pierce® C18

Spin (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) seguindo as instruções do fornecedor. Os péptidos foram posteriormente concentrados sob vácuo e congelados a -80°C até análise por MS.

3.5. Análise por LC-MS/MS e ID da proteína

Os péptidos presentes em cada uma das 7 bandas do gel foram ressuspensos em 30 μL de tampão A (2% acetonitrilo e 0,1% FA), combinados e analisados por cromatografia de fase reversa com recurso a um sistema nanoLC (Dionex UltiMate) equipado com uma pré-coluna C18 (Acclaim C18 PepMap 100; 300 $\mu\text{m} \times 5 \text{ mm}$, 5- μm *beads*, 100-Å poro) e com uma coluna analítica C18 (C18 PepMap 100; 75 $\mu\text{m} \times 15 \text{ cm}$, 3- μm *beads*, 100-Å poro). Os péptidos foram eluídos com um gradiente de acetonitrilo 5-50% em 90 min. Os péptidos eluídos foram analisados por nano-*electrospray* em modo positivo em um espectrómetro de massa do tipo Orbitrap (Q-Exactive; Thermo Scientific, Massachusetts, EUA), a uma voltagem de 2 kV, temperatura do capilar de 200°C e na gama de m/z 400-2000. Os 20 iões mais abundantes de cada ciclo de MS foram submetidos a análise MS/MS.

Os espectros de MS foram processados com recurso à base de dados UniProt e com o *software* ProteinDiscovery (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA). As pesquisas foram realizadas para a espécie *Rattus norvegicus* (obtida em fevereiro 2018). As seguintes modificações foram consideradas: modificação da cisteína (carboxiamidometilação, +57,0214 Da), modificação da metionina (oxidação, +15,9949 Da). A tolerância de massa do ião precursor considerada foi de 10 ppm e dos iões fragmento foi de 1 Da. Consideraram-se os péptidos com o score Xcorr (*charge state and proteolytic cleavage-dependent cross-correlation*) de 1,7 para $[M+H]^{1+}$, 2,2 para $[M+2H]^{2+}$ e 3,5 para $[M+3H]^{3+}$, bem como uma correlação delta (Cn) mínima de 0,08. Apenas se consideraram para análise bioinformática as proteínas cuja identificação se baseou em pelo menos 2 péptidos.

A comparação do proteoma da urina entre os diferentes grupos de animais foi feita recorrendo às ferramentas bioinformáticas jvenn,¹³ STRING v10.5,¹⁴ Cytoscape v3.6.1¹⁵ (com os *plugins* ClueGo+CluePedia).

3.6. Immunoblot

A análise do teor de proteínas específicas na urina foi realizada por *slot blot* de acordo com o descrito por Caseiro *et al.*¹⁶ Resumidamente, as amostras de urina depois de

processadas (como descrito em 7.2) foram diluídas em *Tris-Buffered Saline* 1x (TBS; 10 mM Tris, 0,15 mM NaCl, pH 8,0) para uma concentração final de proteína de 0,1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ e um volume de 100 μL foi transferido para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-ECL; Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) sob vácuo utilizando um sistema de *slot-blot*. As membranas foram bloqueadas com uma solução de 5% (m/v) de leite em pó magro diluído em TBS-T (TBS com 0,5% *Tween* 20). Procedeu-se à incubação das membranas com os anticorpos primários [*anti-APE1 antibody* (ab137708; Abcam), *anti-ERG antibody* [EPR3864] (ab92513; Abcam), *anti-galectin 3 antibody* [A3A12] (ab2785; Abcam) e *anti-C reactive protein antibody* [y284] (ab32412; Abcam) diluídos em uma proporção de 1:1000 em solução de bloqueamento, o anticorpo *anti-vinculin antibody* [EPR8185] (ab129002; Abcam) diluído em uma proporção de 1:10000 em solução de bloqueamento, o anticorpo *anti-MMP9 antibody* (ab38898; Abcam) diluído em uma proporção de 1:500 em solução de bloqueamento e o anticorpo *anti-MMP2 antibody* (ab37150; Abcam) diluído em uma proporção de 1:2000 em solução de bloqueamento] durante 1 hora a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas três vezes, 10 minutos cada, com TBS-T e incubadas 1 hora com anticorpo secundário – IRDye® 800 CW Goat (*polyclonal*) Anti-Rabbit IgG (H+L) (926-32211) (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska) ou IRDye® 800 CW Goat (*polyclonal*) Anti-Mouse IgG (H+L) (926-32210) (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska), diluídos em uma proporção de 1:10000 em solução de bloqueamento. Por fim, as membranas foram lavadas três vezes, 10 minutos cada, com TBS-T e a detecção foi realizada com fluorescência de acordo com as instruções do fabricante (LI-COR Biosciences). As imagens foram adquiridas usando o *scanner* da Li-Cor Odyssey (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska) e a análise quantitativa da densidade ótica (DO) foi realizada com o Software de Análise *Image Studio™ Lite* (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska).

3.7. Zimografia

A análise da atividade de proteases da urina foi efetuada por zimografia de acordo com Caseiro *et al.*¹⁷ Em resumo, as proteínas da amostra (20 μg) foram separadas em um gel de separação SDS-PAGE a 10% com 0,1% (m/v) de gelatina. Ao volume de amostra equivalente a 20 μg de proteína foi adicionado tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 até um volume final de 7 μL . O tampão de carga (Tris-HCl 0,1M pH 6,8, 20% glicerol, 5% SDS e pós de

azul de bromofenol) foi adicionado às amostras em uma proporção de 1:1 (v/v), sendo a mistura incubada à temperatura ambiente durante 10 minutos. O gel de separação continha 10% Acrilamida/Bis-acrilamida (37,5:1), tampão 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,05% persulfato de amónia e 0,05% TEMED com 0,1% de gelatina. O gel de empacotamento foi preparado com 4% Acrilamida/Bis-acrilamida (37,5:1), tampão 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,05% persulfato de amónio e 0,1% TEMED. O tampão de corrida utilizado foi Tris-Bicina com 0,1% (m/v) SDS e a separação eletroforética das proteínas foi feita a 120 V durante 1 hora. Após a corrida, os géis foram incubados em tampão de renaturação (2,5% (v/v) de Triton X-100) durante 30 minutos à temperatura ambiente e sob agitação suave. Em seguida, os géis foram incubados em tampão de desenvolvimento (50 mM Tris, 5 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 1 µM ZnCl₂, 0,02% (v/v) Triton X-100, pH 7,4) durante 30 minutos sob agitação suave. Seguidamente, os géis foram incubados *overnight* a 37°C em tampão de desenvolvimento. Os géis de zimografia foram corados, durante 4 horas e 30 minutos sob agitação com *Coomassie Blue G250* (0,4% (m/v) preparado em 50% (v/v) de etanol e 10% (v/v) de ácido acético). Por último, foram descorados em solução com 25% (v/v) de etanol e 5% (v/v) de ácido acético e digitalizados usando o sistema ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad, Hercules, Califórnia). A densidade ótica (DO) foi determinada com recurso ao Software de Análise Image Lab™ (Bio-Rad, Hercules, Califórnia).

3.8. Análise estatística de dados

Os resultados obtidos das análises efetuadas por imunoblot e zimografia são apresentados como média ± desvio padrão. O teste Kolmogorov Smirnov foi aplicado para verificar a normalidade dos dados. A análise estatística para as demais variáveis foi determinada usando uma análise de variância two-way (ANOVA) seguida pelo teste post hoc de comparações múltiplas de Tukey. Os resultados foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada com o software Graph Pad Prism (versão 6.0).

4. RESULTADOS

4.1. Caraterização do modelo animal de cancro da próstata

Com o objetivo de caraterizar o modelo animal de cancro da próstata, durante o protocolo experimental foram recolhidas algumas variáveis biológicas, entre elas, o peso corporal e o peso da próstata (n=5). Os resultados encontram-se apresentados na Tabela 1. A análise dos dados permite inferir a existência de um peso corporal significativamente menor nos ratos do grupo PCa1 em comparação com os ratos controlo com a mesma idade ($p<0,05$). O mesmo não se verifica entre os ratos CONT2 e os animais do grupo PCa2. Os dados refletem também um aumento estatisticamente significativo do peso corporal dos animais CONT2 comparativamente aos ratos CONT1 ($p<0,001$), evidenciando o efeito da idade. Este efeito nota-se ainda na diferença significativa do peso corporal dos animais PCa2 em relação aos ratos do grupo PCa1 ($p<0,001$).

O peso da próstata aumentou significativamente nos ratos com PCa, comparativamente aos animais controlo com idade correspondente ($p<0,001$ para PCa1 vs. CONT1 e $p<0,01$ para PCa2 vs. CONT2). O rácio entre o peso da próstata total e o peso corporal revelou, de igual modo, diferenças estatisticamente significativas quando comparados os grupos de animais com PCa e os animais controlo com idade correspondente ($p<0,0001$ para PCa1 vs. CONT1 e $p<0,01$ para PCa2 vs. CONT2), não se verificando diferenças significativas entre os grupos PCa1 e PCa2. No entanto, os resultados histológicos evidenciaram uma maior incidência de lesões malignas nos animais PCa2 comparativamente com os animais PCa1 em que prevaleceram sinais de hiperplasia e displasia (dados não apresentados).

Tabela 1: Efeito do PCa no peso corporal, na massa da próstata e no rácio massa da próstata/peso corporal. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão, (n=5).

Grupo	Peso corporal (g)	Massa da próstata (mg)	Rácio $\frac{\text{Massa da próstata}}{\text{Peso corporal}}$ (mg/g)
CONT1	473,498 \pm 32,213	2663 \pm 428	5,605 \pm 0,638
PCa1	415,902 \pm 16,345*	4564 \pm 366***	10,999 \pm 1,151****
CONT2	557,012 \pm 14,151***	3096 \pm 819	5,543 \pm 1,358
PCa2	516,876 \pm 37,040 ^{YYY}	4597 \pm 464 ^{##}	8,971 \pm 1,427 ^{##}

(* $p<0,05$ vs. CONT1; *** $p<0,001$ vs. CONT1; **** $p<0,0001$ vs. CONT1;

^{YYY} $p<0,001$ vs. PCa1; ^{##} $p<0,01$ vs. CONT2)

4.2. Efeito do PCa no perfil proteico da urina avaliado por GeLC-MS/MS

O proteoma das amostras de urina, concentradas e dessalinizadas, foi analisado por SDS-PAGE (Figura 2). Os resultados mostram uma distribuição de bandas em toda a gama de pesos moleculares analisada, embora se notem bandas de maior intensidade na gama dos 10-20 kDa e 50-70 kDa. Da análise do perfil de bandas observado no gel SDS-PAGE, é ainda de salientar algumas variações biológicas inter-individuais, sobretudo na gama de peso molecular 40-100 kDa.

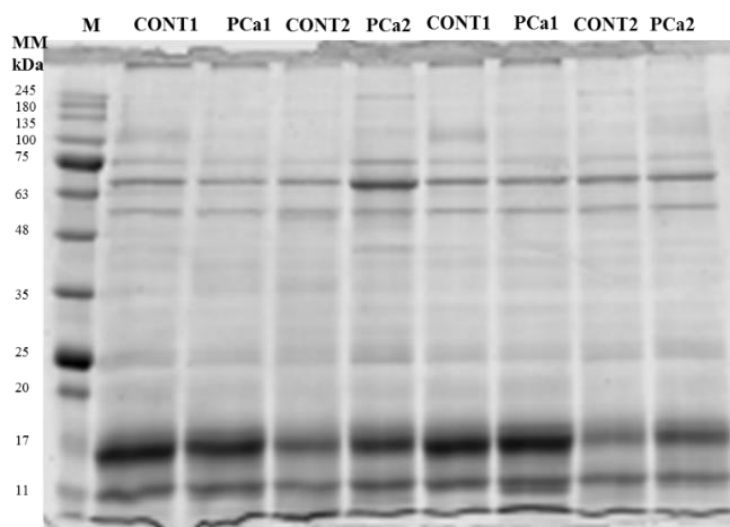


Figura 2: SDS-PAGE representativo da separação do proteoma da urina dos animais dos quatro grupos experimentais em estudo (M-marcador de peso molecular).

As bandas do gel foram digeridas com tripsina e analisadas por LC-MS/MS tendo sido identificadas um total de 319 proteínas distintas (com pelo menos 2 péptidos, grau de confiança superior a 95% e FDR inferior a 1%) (Tabela suplementar S1). Destas, 246 proteínas foram identificadas na urina de pelo menos 3 animais de cada grupo. A maioria destas proteínas é de origem extracelular ou de exossomas e estão envolvidas na “proteólise” (de acordo com a análise efetuada com a ferramenta STRING v10.5). Para este processo biológico contribuíram vários fatores da cascata de coagulação e do sistema de complemento, tais como C3, serpina 1, Plau, entre outros. Algumas proteínas metabólicas foram também encontradas na urina destes animais, nomeadamente a lactato desidrogenase e a gliceraldeído desidrogenase. Entre as proteínas características do proteoma da urina identificou-se a uromodulina e a MUP (*major urinary protein*).

A análise comparativa do proteoma da urina entre os diferentes grupos experimentais (Figura 3) evidenciou 172 proteínas comuns à urina de todos os animais analisados.



Figura 3: Análise comparativa do proteoma da urina entre os diferentes grupos experimentais efetuada com a ferramenta jvenn.¹³

A análise das proteínas exclusivas de cada grupo experimental (Tabela 2) evidenciou proteínas do metabolismo da glutatona na urina dos animais com PCa, mais concretamente glutatona sintetase (Gss) nos animais PCa1 e glutatona S-transferase alfa-3 (Gsta3) nos ratos PCa2. Nos animais CONT1, observou-se uma prevalência de proteínas envolvidas no metabolismo tais como a ATP sintase subunidade alfa, cetohecoxinase e fumarilacetoacetase.

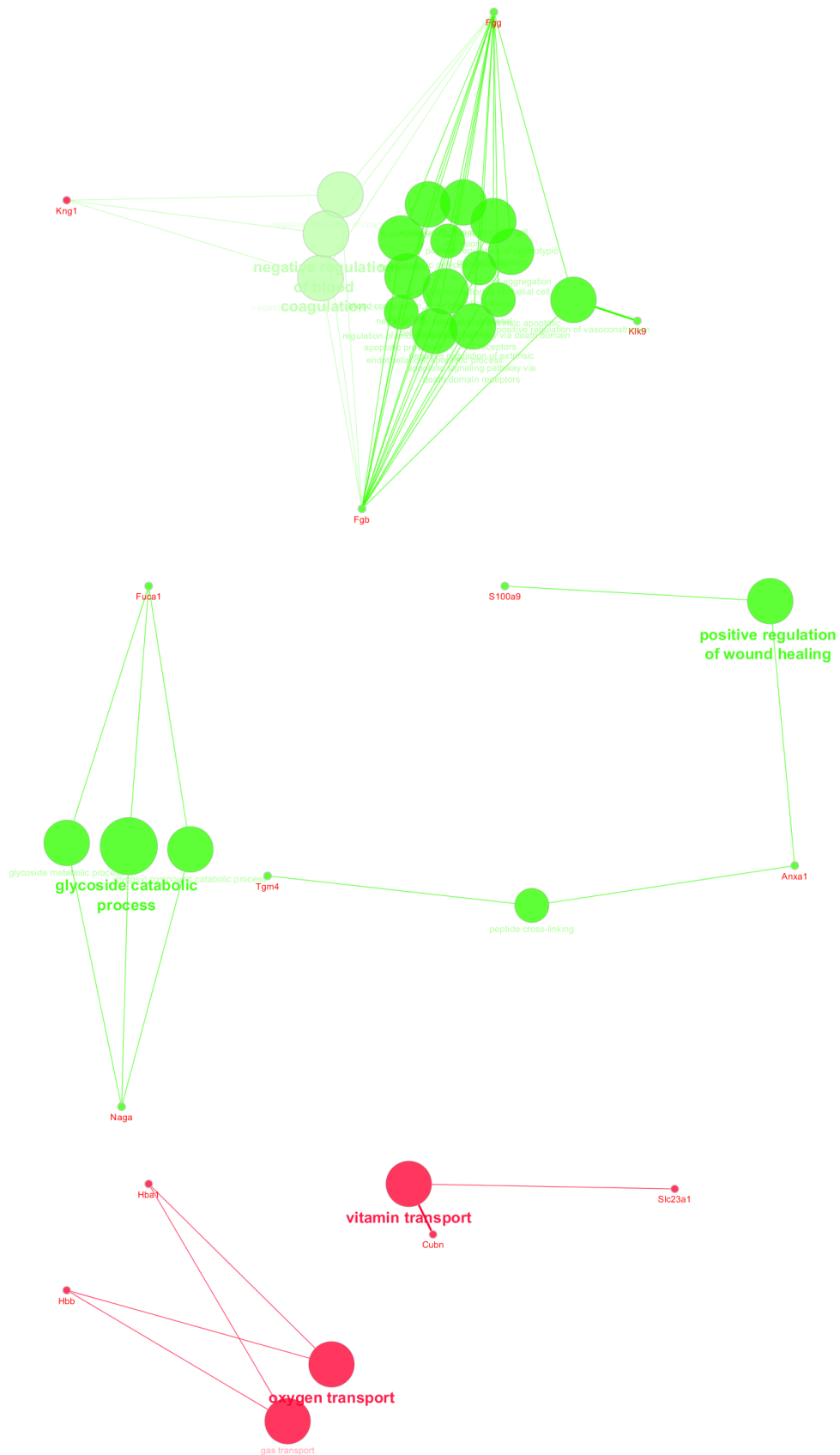
O efeito idade dos animais notou-se na presença de fosfoglicerato mutase (Pgam) na urina dos animais mais jovens (CONT1/PCa1) e de transcobalamina-2 (Tcn2) e proteína Rab11 relacionada com Ras (Rab11) nos animais mais velhos (CONT2/PCa2).

Tabela 2: Lista de proteínas únicas identificadas na urina dos ratos de cada grupo experimental.

Grupo experimental	Proteínas únicas presentes na urina
CONT1	Proteína de membrana associada a vesículas 8 (<i>Vamp8</i>); Proteína de membrana de vesícula sináptica homóloga de VAT-1 (<i>Vat1</i>); Tubulina beta-5 (<i>Tubb5</i>) (<i>Tubb4b</i> ; <i>Tubb3</i> ; <i>Tubb2b</i> ; <i>Tubb2a</i>); Membro da família de transportadores de aniões orgânicos – transportador de soluto 1A1 (<i>Slco1a1</i>); Fumarilacetoacetase (<i>Fah</i>); Cetohecoxinase (<i>Khk</i>); ATP sintase subunidade alfa (<i>Atp5a1</i>); Metilmalonato-semialdeído desidrogenase (<i>Aldh6a1</i>)
PCa1	Aldose redutase (<i>Akr1b1</i>); Proteína secretora de vesícula seminal 2 (<i>Svs.2</i>); Apolipoproteína A-IV (<i>Apoa4</i>); Membro 2 da subfamília G de transportadores de cassetes de ligação de ATP (<i>Abcg2</i>); Fosfolipase D3 (<i>Pld3</i>); Glutaciona sintetase (<i>Gss</i>); Kalirina (<i>Kalrn</i>)
CONT2	--
PCa2	Glutaciona S-transferase alfa-3 (<i>Gsta3</i>); Proteína S100-A8 (<i>S100a8</i>)

De forma a identificar os processos biológicos mais representativos de cada estadio da doença, procedeu-se à análise comparativa das proteínas presentes na urina em níveis significativamente diferentes, dos animais dos grupos PCa com os respetivos controlos, utilizando para o efeito a ferramenta bioinformática Cytoscape. Como se pode constatar da análise da Figura 4A, na urina dos animais CONT1 prevalecem os processos biológicos “catabolismo de glucosídeos” e “reparação”, enquanto nos animais PCa1 prevalece o transporte de vitaminas, para o qual contribuem as proteínas *solute carrier family 23 member 1* (*Slc23a1*) e cubilina (*Cubn*). Na urina dos animais do grupo PCa2 (Figura 4B) prevalecem os processos biológicos “metabolismo do colagénio” e processos relacionados com a resposta inflamatória. Nos animais CONT2 verifica-se a contribuição do processo “reparação”. Na urina dos animais de ambos os grupos PCa nota-se a contribuição de isoformas de hemoglobina, sugestiva de hematúria.

A



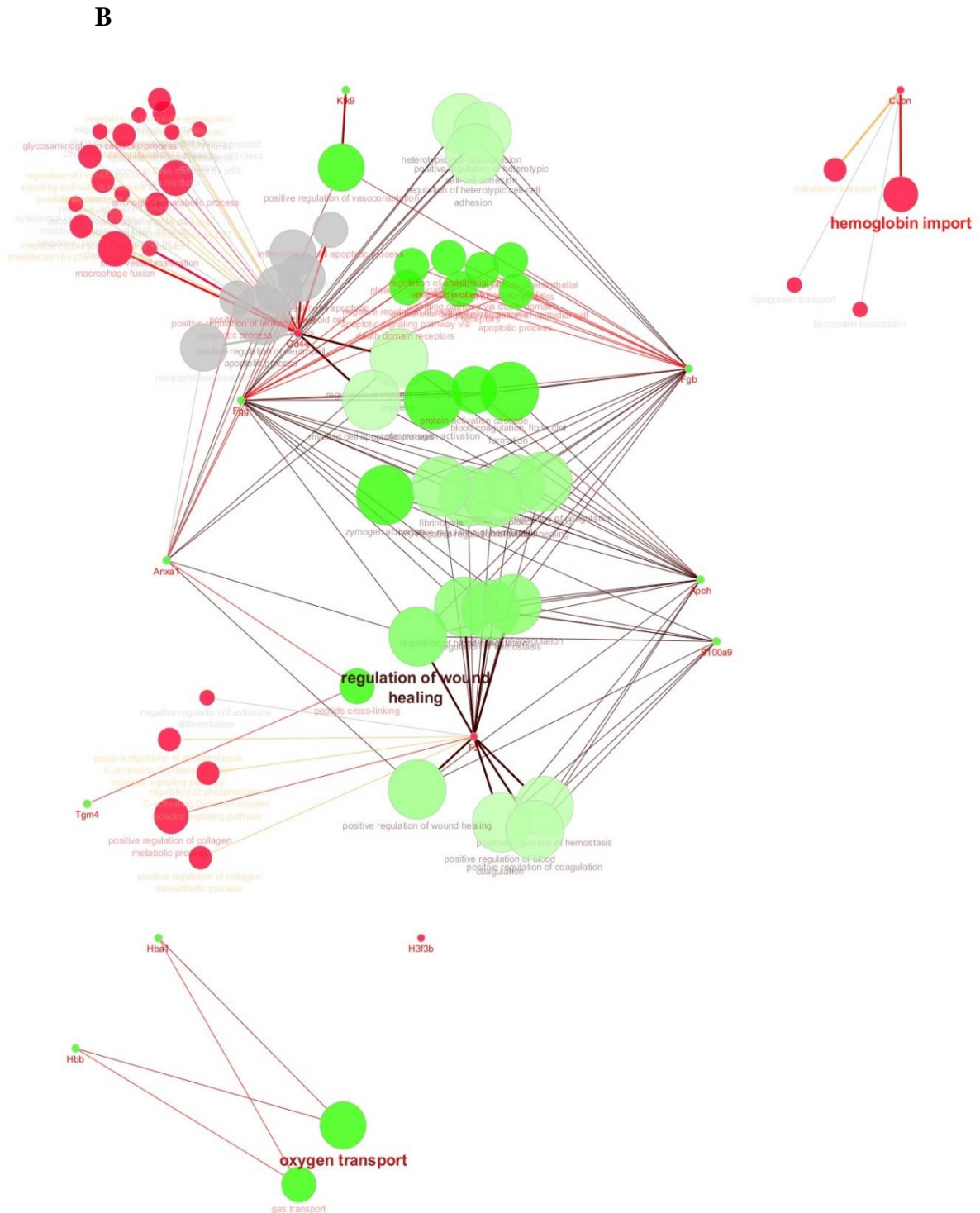


Figura 4: Análise comparativa dos processos biológicos modulados na urina por PCa1 (A) e PCa2 (B), efetuada com a ferramenta Cytoscape (Abril de 2018). Os nodos a vermelho representam os processos biológicos mais representativos de PCa enquanto a verde estão representados os processos biológicos prevalentes nos CONT.

4.3. Efeito do PCa no teor de proteínas alvo avaliado por imunoblot

De modo a complementar os resultados de GeLC-MS/MS, foi realizada a análise de proteínas alvo na urina por imunoblot (Figura 5). Os dados não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas do teor de proteína C-reativa (CRP) (Figura 5B) e da proteína ERG (Figura 5F) entre os quatro grupos em estudo. As proteínas vinculina (Figura 5A) e MMP-9 (Figura 5C) mostraram estar aumentadas na urina dos animais do grupo PCa1 comparativamente ao grupo CONT1 ($p < 0,05$). Os dados permitem ainda inferir uma diferença estatisticamente significativa do teor da protease MMP-2 (Figura 5D) entre os grupos PCa2 e CONT2 ($p < 0,05$). Similarmente, a proteína envolvida na reparação do DNA APE-1 encontrou-se aumentada no grupo PCa2 comparativamente a CONT2 (Figura 5E) ($p < 0,05$). A análise estatística revelou também um aumento desta endonuclease no grupo PCa2 comparativamente ao grupo PCa1 ($p < 0,05$). Por último, a proteína galectina-3 evidenciou um aumento significativo na urina dos animais do grupo PCa2 comparativamente a PCa1 (Figura 5G) ($p < 0,05$).

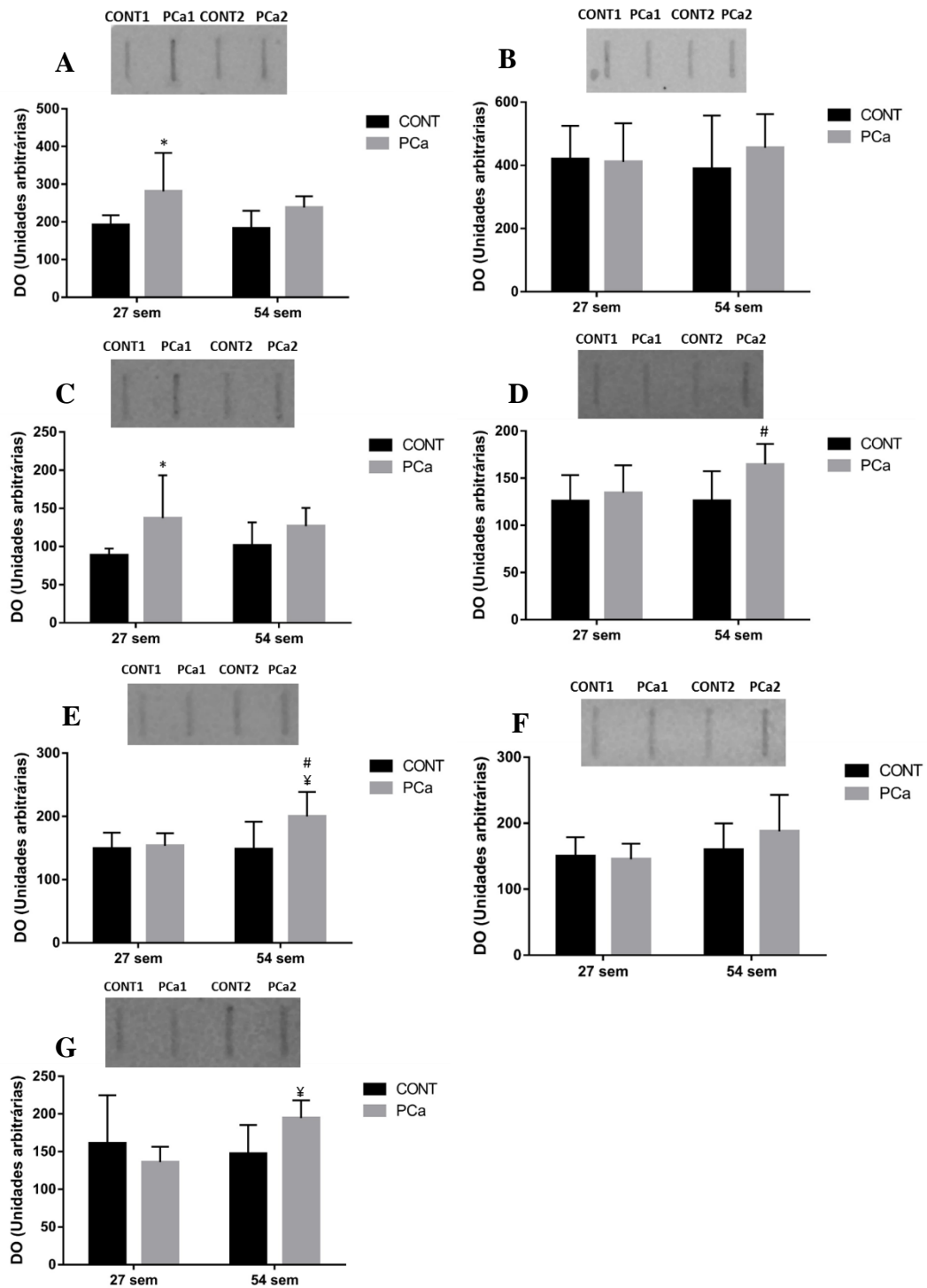


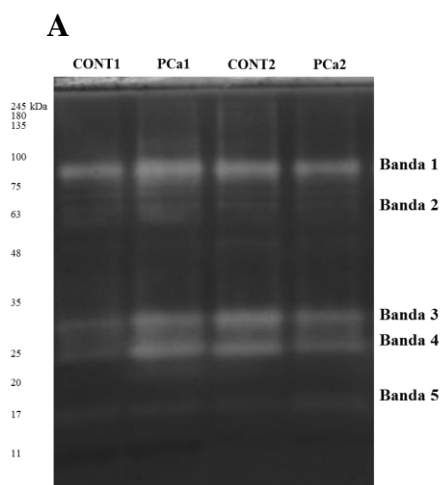
Figura 5: Análise do teor das proteínas vinculina (A), proteína C-reativa (B), MMP-9 (C), MMP-2 (D), APE-1 (E), ERG (F) e galectina-3 (G) na urina avaliada por imunoblot. Os valores são apresentados como média da densidade óptica (DO) \pm desvio padrão (n=5) e expressos em unidades arbitrárias. Uma imagem representativa de cada imunoblot obtido é apresentada acima dos respectivos histogramas. (* $p < 0,05$ vs. CONT + 27 sem; # $p < 0,05$ vs. CONT + 54 sem; ‡ $p < 0,05$ vs. PCa + 27 sem).

4.4. Efeito do PCa na atividade proteolítica da urina

A fim de avaliar a atividade proteolítica da urina dos animais dos quatro grupos incluídos no estudo, foi realizada uma análise por zimografia destas amostras. Os resultados obtidos evidenciaram um perfil semelhante entre os diferentes grupos experimentais, com 5 bandas com atividade gelatinolítica (Figura 6).

As bandas com atividade encontram-se nas gamas de peso molecular de aproximadamente 80 kDa (banda 1, Figura 6), 65 kDa (banda 2, Figura 6), 30 kDa (banda 3, Figura 6), 25 kDa (banda 4, Figura 6) e 17 kDa (banda 5, Figura 6). Atendendo ao peso molecular, pode-se sugerir a presença de MMP-9 (peso molecular previsto de 82 kDa) ou pro-MMP-9 (peso molecular previsto de 92 kDa) correspondente à banda 1, MMP-2 (peso molecular previsto de 66 kDa) ou pro-MMP-2 (peso molecular previsto 72 kDa) referente à banda 2, calicreína glandular 10 (KLK10) alusiva à banda 3 (peso molecular previsto 30 kDa) e calicreína 5 (KLK5) relativa à banda 4 (peso molecular previsto de 25 kDa), identificadas anteriormente na urina.¹⁷⁻²⁰ Não se encontrou informação na literatura que permita inferir qual a protease presente na urina com peso molecular de aproximadamente 17 kDa, embora possa representar um fragmento de uma das proteases acima referidas.

No entanto, apenas duas das bandas evidenciaram alterações de atividade entre grupos. As bandas 3 ($p<0,01$) e 4 ($p<0,05$) (Figura 6) exibiram uma maior atividade na urina de animais do grupo CONT2 comparativamente ao grupo CONT1. Mais ainda, a banda com aproximadamente 30 kDa (banda 3) demonstrou ter uma menor atividade no grupo PCa2 em comparação com o grupo CONT2 ($p<0,05$).



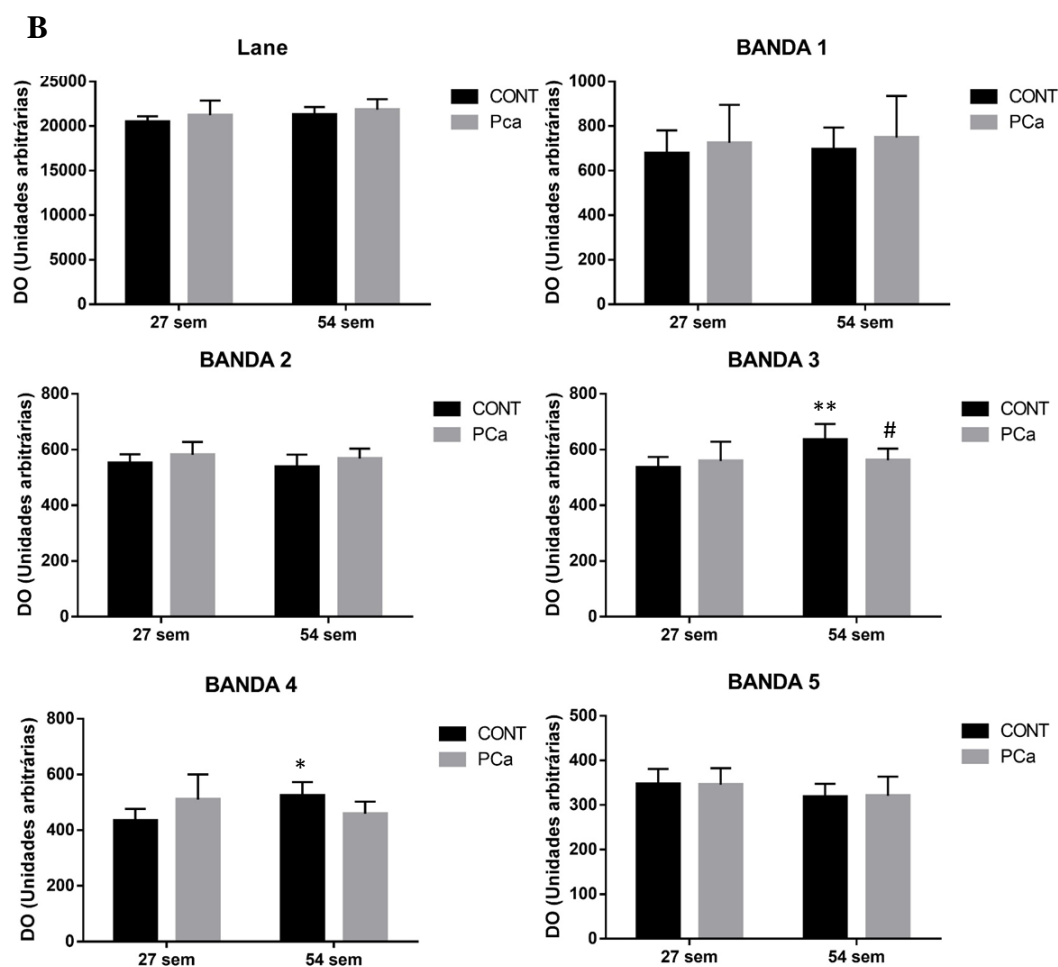


Figura 6: Análise por zimografia das amostras de urina dos grupos experimentais em estudo (A). Valores das médias das densidades óticas (DO) \pm desvio padrão da *lane* total e das bandas proteolíticas 1, 2, 3, 4, e 5, resultantes da análise de amostras por grupo (n=4) e expressos em unidades arbitrárias (B). (# $p < 0,05$ vs. CONT + 54 sem; * $p < 0,05$ vs. CONT + 27 sem; ** $p < 0,01$ vs. CONT + 27 sem).

5. DISCUSSÃO

Na presente dissertação explorou-se o potencial valor de diagnóstico da urina no cancro da próstata pela pesquisa dos processos biológicos subjacentes à carcinogénese da próstata, bem como de potenciais biomarcadores da doença. Para o efeito, utilizou-se um modelo animal de PCa induzido quimicamente, descrito previamente por Bosland.²¹ Os modelos animais apresentam vantagens tais como a possibilidade de acompanhar o desenvolvimento de tumores e relacioná-lo com a dinâmica do proteoma de amostras biológicas,²² o pequeno tamanho corporal, a facilidade de reprodução, o curto tempo de gestação, o custo-eficácia, a similaridade com o genoma humano (aproximadamente 95% idênticos) e a facilidade de manipulação genética.²³ No entanto, no contexto do PCa existem diferenças fundamentais entre a biologia da próstata humana e do roedor e dos mecanismos de carcinogénese.²⁴ Ao contrário da próstata humana, que é uni-lobular, a próstata de roedores está dividida em quatro lóbulos distintos, a próstata anterior, ventral, lateral e dorsal, que diferem significativamente ao nível histológico e relativamente à expressão de proteínas secretoras.²⁵ No entanto, neste modelo de PCa os animais desenvolvem lesões na região dorsolateral que mimetizam as que se observam na próstata de humanos.²²

Entre as variáveis biológicas analisadas (Tabela 1) é de realçar o aumento do peso da próstata em ratos com PCa1 em comparação com os ratos CONT1 que parece ser sugestiva de hiperplasia.²⁶ A BPH está de facto associada ao crescimento excessivo da próstata como resultado da estimulação androgénica e aumento do tónus adrenérgico, levando à contração do músculo liso.²⁷ A testosterona pode ser vista como um promotor de tumor para a próstata quando administrado após a injeção de MNU, um iniciador da tumorigénese.²¹ O mecanismo pelo qual a testosterona atua como agente promotor de tumor para o PCa neste modelo de rato não é conhecido, mas é possível que as células epiteliais da próstata adquiram hipersensibilidade aos androgénios.²¹ Tal pode proporcionar uma vantagem seletiva de crescimento dessas células e uma progressão para a malignidade.²¹ Os resultados suportam a utilidade deste modelo no estudo da progressão da doença, atendendo ao facto de, os animais do grupo PCa2 apresentarem mais lesões malignas comparativamente aos animais do grupo PCa1 (dados não apresentados). Assim, procedeu-se à análise da urina com o intuito de se identificarem os processos biológicos representativos da tumorigénese da próstata, bem como alvos proteicos indicativos dos mesmos. Os resultados sugerem a presença de hematúria nos animais de ambos os grupos de PCa, identificada pela presença

de isoformas de hemoglobina. Esta condição é, de facto, frequente no cancro da próstata.²⁸ A etiologia deste sintoma em indivíduos com PCa é controversa, podendo ser um resultado do facto da hiperplasia associada ao tumor causar um alargamento da próstata e uma pressão nas estruturas do trato urinário ou pode constituir um efeito colateral de tratamentos.^{28,29}

A análise do proteoma da urina destacou de uma forma integrada algumas vias moleculares subjacentes à progressão do PCa (Figura 4). Na urina de animais com menor grau histológico de malignidade observou-se um aumento do teor de proteínas aparentemente envolvidas em processos de detoxificação, tais como regulação do transporte de vitaminas (nodos vermelhos, Figura 4A), com especial contributo das proteínas *solute carrier family 23 member 1* (Slc23a1) e cubilina (Cubn). A proteína Slc23a1 é um co-transportador de sódio/ascorbato que medeia a captação eletrogénica de vitamina C.³⁰ No entanto, o papel desta vitamina na tumorigénese da próstata parece não estar esclarecido. A proteína Cubn é essencialmente encontrada em células epiteliais nos túbulos proximais do rim e células glandulares que revestem o intestino delgado.³¹ No intestino delgado, a Cubn está envolvida na captação de vitamina B₁₂ (ou cobalamina).³² Esta vitamina é essencial para a manutenção dos padrões de metilação, reparação e síntese do DNA. A sua associação ao PCa é, de igual modo, controversa.³³ A glutathione sintetase, proteína envolvida no metabolismo da glutathione, foi identificada exclusivamente na urina dos animais do grupo PCa1. A glutathione (GSH) é um tiol envolvido em vários processos celulares, cuja principal função é a desintoxicação celular.³⁴ A desregulação da homeostasia da glutathione está envolvida no aumento de suscetibilidade a *stress* oxidativo, implicado no desenvolvimento e progressão do PCa devido ao aumento de espécies reativas de oxigénio.³⁵

A apolipoproteína A-IV foi também identificada exclusivamente na urina dos animais do grupo PCa1. Atendendo ao potencial papel das lipoproteínas na angiogénese, vários autores têm visado entender o papel das apolipoproteínas na carcinogénese e no risco de desenvolvimento de cancro.³⁶ Para além das suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, e da capacidade de mediar o transporte reverso de colesterol, esta proteína parece estar intimamente ligada ao metabolismo relacionado com a ingestão de alimentos, obesidade e diabetes,³⁷ tendo também sido sugerida como potencial biomarcador de cancro do ovário.³⁸ Estas evidências salientam a pouca especificidade da apoA-IV no PCa. Outra das proteínas associada aos estadios iniciais de PCa foi a vinculina (Figura 5A). Esta proteína está envolvida na proliferação celular e progressão tumoral do PCa e alguns autores

observaram níveis de expressão baixos em casos de BPH e de PCa localizado.³⁹ De forma a melhor compreender a associação dos níveis desta proteína na urina com alterações da próstata, no futuro, será importante avaliar o teor desta proteína em seções da próstata.

Na urina dos animais PCa2 identificou-se a presença da isoforma de glutathione S-transferase (GST) alfa-3, também envolvida no metabolismo da glutathione, bem como a preponderância de proteínas envolvidas na regulação da inflamação e reparação. O regulamento de GST foi previamente estudado no contexto do PCa,⁴⁰ uma vez que, esta superfamília de enzimas protege as células normais ao catalisar as reações de conjugação de glutathione a compostos eletrofílicos e exógenos, incluindo agentes cancerígenos, reduzindo a sua reatividade e facilitando a sua depuração da célula.⁴⁰ Esta proteína catalisa reações de isomerização de ligação dupla de precursores de progesterona e testosterona que contribuem para a biossíntese de hormonas esteróides.⁴¹ Tal facto, acoplado ao papel preeminente da testosterona na tumorigénese da próstata,²¹ podem explicar o aumento desta proteína na urina de animais com maior grau histológico de malignidade.

A inflamação pode desempenhar um papel na carcinogénese da próstata por vários mecanismos: i) causando dano celular e genómico, contribuindo para o aparecimento ou progressão do tumor; ii) a resposta imune pode ser requerida pelo rápido crescimento do tumor e, portanto, muitos fatores inflamatórios são libertados; iii) pode causar tumorigénese ao promover um microambiente tumoral rico em moléculas bioativas, incluindo fatores de crescimento que induzem proliferação, fatores de sobrevivência que reduzem a morte celular, fatores pro-angiogénicos, enzimas modificadoras da matriz extracelular que estimulam a angiogénese, invasão e metastização e sinais indutivos que facilitam a transição epitélio-mesenquimal.^{42,43} As células imunes do sistema adaptativo e inato, as quimiocinas e as citocinas inflamatórias, como IL-8 e IL-6, parecem ter um papel na manutenção do crescimento e viabilidade das células tumorais e uma correlação significativa com a agressividade do PCa (revisto em⁴²). Os resultados de proteómica evidenciam a contribuição da proteína S100-A8 para a regulação de processos inflamatórios e resposta imune.⁴⁴ A S100-A8 parece ser sobre-expressa em células epiteliais de cancro da próstata em humanos, e aparenta estar associada à infiltração de células do sistema imunológico, especialmente neutrófilos.⁴⁵ Apesar dos resultados de GeLC-MS/MS evidenciarem a contribuição da inflamação para a tumorigénese da próstata, a análise específica da proteína pro-inflamatória

CRP por *Western blot* não aponta nesse sentido, dado que não se observaram alterações dos seus níveis (Figura 5B).

Relativamente à contribuição da reparação e metabolismo do colagénio para a tumorigénese da próstata, os resultados de GeLC-MS/MS e de *Western blot* são coerentes. Efetivamente, níveis elevados de MMPs foram detetados na urina dos animais com PCa. Estas enzimas têm sido detetadas na urina de pacientes com diferentes tipos de tumores, particularmente em estadios avançados da doença.⁴⁶ De facto, as MMPs ao promoverem a lise de proteínas da matriz extracelular favorecem a invasão dos tecidos adjacentes e a metastização.^{47,48} Entre as MMPs, a MMP-2 parece ser característica de estadios avançados de PCa enquanto a MMP-9 encontra-se elevada em estadios iniciais da doença (Figura 5D e Figura 5C, respetivamente). A expressão das diferentes MMPs parece estar dependente do estadio do tumor, tendo a MMP-9 um papel preponderante no desenvolvimento do tumor e podendo a MMP-2 estar principalmente associada aos processos de invasão e metastização. A MMP-9 mostrou ter um papel predominante na angiogénese durante a carcinogénese do pâncreas em murganhos transgénicos (RIP1-Tag2).⁴⁹ Mais ainda, foi verificada uma redução da progressão tumoral em murganhos deficientes em MMP-2 após implementação por via intradérmica de células de melanoma ou células de carcinoma pulmonar de Lewis.⁵⁰ Recentemente, foi sugerido que a expressão tecidual de MMP-2 está relacionada com o GS e com o estadio clínico do PCa.⁵¹ Apesar da alteração dos níveis destas proteases, não se observou um aumento da atividade destas MMPs nos diferentes grupos (Bandas 1 e 2, Figura 6). A análise das amostras de urina por zimografia evidenciou a contribuição de outras proteases, mais especificamente de calicreínas. Entre estas enzimas, as KLK1, KLK4-5, KLK9-11 e KLK13-15 são expressas no tecido da próstata e foram detetadas em fluidos biológicos.¹⁹ A expressão de KLK10 em amostras de tecido tumoral da próstata e em linhas celulares de PCa é baixa,⁵² o que corrobora os resultados obtidos no presente estudo que evidenciam uma diminuição da atividade proteolítica de KLK10 (banda 3, Figura 6) na urina dos animais do grupo PCa2 comparativamente aos animais do grupo CONT2. Os dados revelaram ainda uma diferença estatisticamente significativa da atividade proteolítica de KLK10 e KLK5 entre os grupos CONT1 e CONT2 ($p < 0,01$, banda 3 e $p < 0,05$, banda 4, Figura 6), o que evidencia o efeito da idade do animal na atividade gelatinolítica da urina. O efeito do envelhecimento no proteoma da urina de murganhos foi previamente analisado tendo sido verificado que muitos dos péptidos presentes nesta amostra (42%) eram

fragmentos de diferentes isoformas de colagénio.⁵³ De facto, estas calicreínas têm a capacidade de degradar, entre outras moléculas, os colagénios tipo I-IV.⁵⁴ Estes resultados vão ao encontro aos dados obtidos, em que se verificou uma prevalência dos processos de “reparação” no grupo CONT2 comparativamente com o grupo CONT1 (Figura 4B).

O envelhecimento está associado ao aumento da incidência de doenças que afetam a próstata, como BPH e adenocarcinoma da próstata.⁵⁵ Como as interações recíprocas entre o epitélio e os constituintes do estroma são essenciais para a organogénese da próstata, torna-se importante identificar alterações associadas ao envelhecimento normal do microambiente da próstata do rato e relacioná-las com a doença.⁵⁵ Para além da atividade proteolítica, outras vias moleculares parecem ser influenciadas pela idade, tais como o metabolismo. Por exemplo, a fosfoglicerato mutase presente, maioritariamente, na urina dos animais mais jovens (CONT1/PCa1), catalisa uma das etapas finais da via glicolítica, estando fortemente relacionada ao metabolismo energético. As evidências atuais demonstram que a reprogramação energética é um motor do envelhecimento.⁵⁶ As proteínas transcobalamina-2 e Rab11 parecem ser características da urina de animais mais velhos (CONT2/PCa2). A deficiência de vitamina B₁₂, cujo transporte requer a presença da proteína Tcn2, constitui um distúrbio clínico que afeta grande parte da população idosa e está associada a graves complicações patológicas.⁵⁷ O efeito da idade na diminuição dos níveis circulantes de vitamina B₁₂ foi já descrita em roedores.⁵⁸ A proteína Rab11 pertence à família de proteínas com atividade GTPase, que direcionam o tráfego vesicular intracelular, desde a formação de vesículas de transporte até à fusão com as membranas.⁵⁹ A subfamília Rab11 está implicada na base celular de um grande número de patologias humanas, em especial desordens do foro neurológico frequentemente associadas ao envelhecimento.^{59,60} De facto, várias proteínas envolvidas em processos neuronais foram já relacionadas com o envelhecimento e identificadas na urina de ratos.⁵³

Adicionalmente, a endonuclease apurínica/apirimidínica (APE-1/Ref-1) foi detetada em níveis significativamente mais elevados na urina dos animais PCa2 (Figura 5E). Previamente associada ao cancro da bexiga,⁶¹ a APE-1 desempenha um papel chave na via de reparação por excisão de base (BER) de danos oxidativos e alquilantes.⁶² A proteína possui ainda uma função sinalizadora redox que modula a atividade de certos fatores de transcrição, entre eles STAT3, HIF-1 α , NF-kB, AP-1, p53, fortemente relacionados com o crescimento, migração e sobrevivência de células tumorais, bem como inflamação e angiogénese no microambiente

tumoral.^{62,63} O aumento da expressão desta endonuclease foi já relatada em células tumorais de PCa e associada ao aumento de agressividade do tumor.⁶⁴

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Apesar dos progressos efetuados na procura de biomarcadores de PCa decorrentes, sobretudo, dos avanços científicos e técnicos verificados na área da proteómica, a maioria dos biomarcadores propostos não são específicos de PCa. Assim, com o objetivo de identificar novos potenciais biomarcadores de PCa em amostras obtidas de forma não invasiva e relacionar com o estadio da doença, coletaram-se amostras de urina de um modelo animal de PCa induzido quimicamente, em dois estadios distintos da doença. Da análise dos resultados obtidos foi possível concluir que:

- i) Nos estadios iniciais da doença prevalecem na urina proteínas envolvidas no “transporte de vitaminas”, tais como a *solute carrier family 23 member 1* (Slc23a1) e a cubilina (Cubn). Níveis elevados de vinculina da urina também estão associados a estadios iniciais da doença;
- ii) Nos estadios mais avançados de PCa verifica-se uma maior contribuição dos processos relacionados com “metabolismo do colagénio” e “inflamação”, para o qual contribui a proteína S100-A8. A proteína de reparação do DNA APE-1, também parece ser característica das fases tardias de PCa;
- iii) O metabolismo da glutathione, bem como a ação das MMPs parece ser transversal aos vários estadios de PCa. Enquanto em estadios iniciais se verifica a preponderância na urina de glutathione sintetase e de MMP-9, em estadios avançados prevalece a glutathione S-transferase alfa-3 e a MMP-2;
- iv) O efeito da idade no proteoma da urina notou-se ao nível da atividade proteolítica das calicreínas, frequentemente envolvidas na degradação do colagénio;

Em conjunto, os resultados destacam vários processos biológicos, bem como potenciais marcadores de diferentes estadios de PCa. Apesar de, aparentemente, não serem específicos desta doença, a sua análise conjunta em painéis *multiplex* poderá constituir uma opção metodológica para aumentar a especificidade no diagnóstico de PCa. Assim, no futuro será importante validar o valor de diagnóstico de painéis destas proteínas no PCa e relacionar os seus níveis na urina com os mecanismos fisiopatológicos da doença em humanos, com vista à sua aplicação clínica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) GLOBOCAN 2012 http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx (accessed Sep 22, 2017).
- (2) Filella, X.; Foj, L. Prostate Cancer Detection and Prognosis: From Prostate Specific Antigen (PSA) to Exosomal Biomarkers. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17* (11), 1784-1805.
- (3) Frantzi, M.; Latosinska, A.; Merseburger, A. S.; Mischak, H. Recent Progress in Urinary Proteome Analysis for Prostate Cancer Diagnosis and Management. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2015**, *15* (12), 1539–1554.
- (4) Han, X.; Aslanian, A.; Yates, J. R. Mass Spectrometry for Proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12* (5), 483–490.
- (5) Mermelekas, G.; Vlahou, A.; Zoidakis, J. SRM/MRM Targeted Proteomics as a Tool for Biomarker Validation and Absolute Quantification in Human Urine. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2015**, *15* (11), 1441–1454.
- (6) Frantzi, M.; Bhat, A.; Latosinska, A. Clinical Proteomic Biomarkers: Relevant Issues on Study Design & Technical Considerations in Biomarker Development. *Clin. Transl. Med.* **2014**, *3* (7), 1-22.
- (7) Coakley, F. V.; Hricak, H. Radiologic Anatomy of the Prostate Gland: A Clinical Approach. *Radiol. Clin. North Am.* **2000**, *38* (1), 15–30.
- (8) Fujita, K.; Pavlovich, C. P.; Netto, G.; Konishi, Y.; Isaacs, W. B.; Ali, S.; De Marzo, A.; Meeker, A. K. Specific Detection of Prostate Cancer Cells in Urine by Multiplex Immunofluorescence Cytology. *Hum. Pathol.* **2009**, *40* (7), 924–933.
- (9) Dijkstra, S.; Birker, I. L.; Smit, F. P.; Leyten, G. H. J. M.; de Reijke, T. M.; van Oort, I. M.; Mulders, P. F. A.; Jannink, S. A.; Schalken, J. A. Prostate Cancer Biomarker Profiles in Urinary Sediments and Exosomes. *J. Urol.* **2014**, *191* (4), 1132–1138.
- (10) Kalantari, S.; Jafari, A.; Moradpoor, R.; Ghasemi, E.; Khalkhal, E. Human Urine Proteomics: Analytical Techniques and Clinical Applications in Renal Diseases. *Int. J. Proteomics* **2015**, *2015* (782798), 1-17.
- (11) Thomas, S.; Hao, L.; Ricke, W. A.; Li, L. Biomarker Discovery in Mass Spectrometry-Based Urinary Proteomics. *Proteomics Clin. Appl.* **2016**, *10* (4), 358–370.
- (12) Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227* (5259), 680–685.

- (13) Bardou, P.; Mariette, J.; Escudié, F.; Djemiel, C.; Klopp, C. Jvonn: An Interactive Venn Diagram Viewer. *BMC Bioinformatics* **2014**, *15* (293), 1-7.
- (14) Szklarczyk, D.; Franceschini, A.; Wyder, S.; Forslund, K.; Heller, D.; Huerta-Cepas, J.; Simonovic, M.; Roth, A.; Santos, A.; Tsafou, K. P.; Kuhn, M.; Bork, P.; Jensen, L. J.; Mering, C. STRING V10: Protein-Protein Interaction Networks, Integrated over the Tree of Life. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, D447-452.
- (15) Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N. S.; Wang, J. T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res.* **2003**, *13* (11), 2498–2504.
- (16) Caseiro, A.; Barros, A.; Ferreira, R.; Padrão, A.; Aroso, M.; Quintaneiro, C.; Pereira, A.; Marinheiro, R.; Vitorino, R.; Amado, F. Pursuing Type 1 Diabetes Mellitus and Related Complications through Urinary Proteomics. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* **2014**, *163* (3), 188–199.
- (17) Caseiro, A.; Ferreira, R.; Quintaneiro, C.; Pereira, A.; Marinheiro, R.; Vitorino, R.; Amado, F. Protease Profiling of Different Biofluids in Type 1 Diabetes Mellitus. *Clin. Biochem.* **2012**, *45* (18), 1613–1619.
- (18) Ferreira, R.; Oliveira, P.; Martins, T.; Magalhães, S.; Trindade, F.; Pires, M. J.; Colaço, B.; Barros, A.; Santos, L.; Amado, F.; Vitorino, R. Comparative Proteomic Analyses of Urine from Rat Urothelial Carcinoma Chemically Induced by Exposure to N-Butyl-N-(4-Hydroxybutyl)-Nitrosamine. *Mol. Biosyst.* **2015**, *11* (6), 1594–1602.
- (19) Fuhrman-Luck, R. A.; Loessner, D.; Clements, J. A. Kallikrein-Related Peptidases in Prostate Cancer: From Molecular Function to Clinical Application. *EJIFCC* **2014**, *25* (3), 269–281.
- (20) Korbakis, D.; Gregorakis, A. K.; Scorilas, A. Quantitative Analysis of Human Kallikrein 5 (KLK5) Expression in Prostate Needle Biopsies: An Independent Cancer Biomarker. *Clin. Chem.* **2009**, *55* (5), 904–913.
- (21) Bosland, M. C. Testosterone Treatment Is a Potent Tumor Promoter for the Rat Prostate. *Endocrinology* **2014**, *155* (12), 4629–4633.
- (22) Ittmann, M.; Huang, J.; Radaelli, E.; Martin, P.; Signoretti, S.; Sullivan, R.; Simons, B. W.; Ward, J. M.; Robinson, B. D.; Chu, G. C.; Loda, M.; Thomas, G.; Borowsky,

- A.; Cardiff, R. D. Animal Models of Human Prostate Cancer: The Consensus Report of the New York Meeting of the Mouse Models of Human Cancers Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer Res.* **2013**, *73* (9), 2718–2736.
- (23) Oliveira, D. S. M.; Dzinic, S.; Bonfil, A. I.; Saliganan, A. D.; Sheng, S.; Bonfil, R. D. The Mouse Prostate: A Basic Anatomical and Histological Guideline. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* **2016**, *16* (1), 8–13.
- (24) Grabowska, M. M.; DeGraff, D. J.; Yu, X.; Jin, R. J.; Chen, Z.; Borowsky, A. D.; Matusik, R. J. Mouse Models of Prostate Cancer: Picking the Best Model for the Question. *Cancer Metastasis Rev.* **2014**, *33* (2–3), 377–397.
- (25) Toivanen, R.; Shen, M. M. Prostate Organogenesis: Tissue Induction, Hormonal Regulation and Cell Type Specification. *Dev. Camb. Engl.* **2017**, *144* (8), 1382–1398.
- (26) Dai, X.; Fang, X.; Ma, Y.; Xianyu, J. Benign Prostatic Hyperplasia and the Risk of Prostate Cancer and Bladder Cancer: A Meta-Analysis of Observational Studies. *Medicine (Baltimore)* **2016**, *95* (18), e3493-3500.
- (27) Tiwari, A.; Krishna, N. S.; Nanda, K.; Chugh, A. Benign Prostatic Hyperplasia: An Insight into Current Investigational Medical Therapies. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2005**, *14* (11), 1359–1372.
- (28) Rastinehad, A. R.; Ost, M. C.; VanderBrink, B. A.; Siegel, D. N.; Kavoussi, L. R. Persistent Prostatic Hematuria. *Nat. Clin. Pract. Urol.* **2008**, *5* (3), 159–165.
- (29) Gofrit, O. N.; Katz, R.; Shapiro, A.; Yutkin, V.; Pizov, G.; Zorn, K. C.; Duvdevani, M.; Landau, E. H.; Pode, D. Gross Hematuria in Patients with Prostate Cancer: Etiology and Management. *ISRN Surg.* **2013**, *2013* (685327), 1-4.
- (30) Sotiriou, S.; Gispert, S.; Cheng, J.; Wang, Y.; Chen, A.; Hoogstraten-Miller, S.; Miller, G. F.; Kwon, O.; Levine, M.; Guttentag, S. H.; Nussbaum, R. L. Ascorbic-Acid Transporter Slc23a1 Is Essential for Vitamin C Transport into the Brain and for Perinatal Survival. *Nat. Med.* **2002**, *8* (5), 514–517.
- (31) Gremel, G.; Djureinovic, D.; Niinivirta, M.; Laird, A.; Ljungqvist, O.; Johannesson, H.; Bergman, J.; Edqvist, P.-H.; Navani, S.; Khan, N.; Patil, T.; Sivertsson, A.; Uhlén, M.; Harrison, D. J.; Ullenhag, G. J.; Stewart, G. D.; Pontén, F. A Systematic Search Strategy Identifies Cubilin as Independent Prognostic Marker for Renal Cell Carcinoma. *BMC Cancer* **2017**, *17* (1), 1-9.

- (32) Birn, H.; Verroust, P. J.; Nexo, E.; Hager, H.; Jacobsen, C.; Christensen, E. I.; Moestrup, S. K. Characterization of an Epithelial Approximately 460-KDa Protein That Facilitates Endocytosis of Intrinsic Factor-Vitamin B12 and Binds Receptor-Associated Protein. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (42), 26497–26504.
- (33) Price, A. J.; Travis, R. C.; Appleby, P. N.; Albanes, D.; Barricarte Gurrea, A.; Bjørge, T.; Bueno-de-Mesquita, H. B.; Chen, C.; Donovan, J.; Gislefoss, R.; Goodman, G.; Gunter, M.; Hamdy, F.; Johansson, M.; King, I. B.; Kühn, T.; Männistö, S.; Martin, R. M.; Meyer, K.; Neal, D. E.; Neuhauser, M. L.; Nygård, O.; Stattin, P.; Tell, G. S.; Trichopoulou, A.; Tumino, R.; Ueland, R. M.; Ulvik, A.; Vogel, S.; Vollset, S. E.; Weinstein, S. J.; Key, T. J.; Allen, N. E. Circulating Folate and Vitamin B12 and Risk of Prostate Cancer: A Collaborative Analysis of Individual Participant Data from Six Cohorts Including 6875 Cases and 8104 Controls. *Eur. Urol.* **2016**, *70* (6), 941–951.
- (34) Liu, Y.; Hyde, A. S.; Simpson, M. A.; Barycki, J. J. Emerging Regulatory Paradigms in Glutathione Metabolism. *Adv. Cancer Res.* **2014**, *122*, 69–101.
- (35) Traverso, N.; Ricciarelli, R.; Nitti, M.; Marengo, B.; Furfaro, A. L.; Pronzato, M. A.; Marinari, U. M.; Domenicotti, C. Role of Glutathione in Cancer Progression and Chemoresistance. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, *2013* (972913), 1-10.
- (36) Borgquist, S.; Butt, T.; Almgren, P.; Shiffman, D.; Stocks, T.; Orho-Melander, M.; Manjer, J.; Melander, O. Apolipoproteins, Lipids and Risk of Cancer. *Int. J. Cancer* **2016**, *138* (11), 2648–2656.
- (37) Wang, F.; Kohan, A. B.; Lo, C.-M.; Liu, M.; Howles, P.; Tso, P. Apolipoprotein A-IV: A Protein Intimately Involved in Metabolism. *J. Lipid Res.* **2015**, *56* (8), 1403–1418.
- (38) Rauniyar, N.; Peng, G.; Lam, T. T.; Zhao, H.; Mor, G.; Williams, K. R. Data-Independent Acquisition and Parallel Reaction Monitoring Mass Spectrometry Identification of Serum Biomarkers for Ovarian Cancer. *Biomark. Insights* **2017**, *12*, 1-12.
- (39) Ruiz, C.; Holz, D. R.; Oeggerli, M.; Schneider, S.; Gonzales, I. M.; Kiefer, J. M.; Zellweger, T.; Bachmann, A.; Koivisto, P. A.; Helin, H. J.; Mousses, S.; Barrett, M. T.; Azorsa, D. O.; Bubendorf, L. Amplification and Overexpression of Vinculin Are

- Associated with Increased Tumour Cell Proliferation and Progression in Advanced Prostate Cancer. *J. Pathol.* **2011**, 223 (4), 543–552.
- (40) Freitas, M.; Baldeiras, I.; Proença, T.; Alves, V.; Mota-Pinto, A.; Sarmiento-Ribeiro, A. Oxidative Stress Adaptation in Aggressive Prostate Cancer May Be Counteracted by the Reduction of Glutathione Reductase. *FEBS Open Bio* **2012**, 2, 119–128.
- (41) Johansson, A. S.; Mannervik, B. Human Glutathione Transferase A3-3, a Highly Efficient Catalyst of Double-Bond Isomerization in the Biosynthetic Pathway of Steroid Hormones. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276 (35), 33061–33065.
- (42) Sciarra, A.; Gentilucci, A.; Salciccia, S.; Pierella, F.; Del Bianco, F.; Gentile, V.; Silvestri, I.; Cattarino, S. Prognostic Value of Inflammation in Prostate Cancer Progression and Response to Therapeutic: A Critical Review. *J. Inflamm. Lond. Engl.* **2016**, 13 (35), 1-11.
- (43) Liu, Z.-Q.; Chu, L.; Fang, J.-M.; Zhang, X.; Zhao, H.-X.; Chen, Y.-J.; Xu, Q. Prognostic Role of C-Reactive Protein in Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Asian J. Androl.* **2014**, 16 (3), 467–471.
- (44) Ryckman, C.; Vandal, K.; Rouleau, P.; Talbot, M.; Tessier, P. A. Proinflammatory Activities of S100: Proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 Induce Neutrophil Chemotaxis and Adhesion. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2003**, 170 (6), 3233–3242.
- (45) Grebhardt, S.; Müller-Decker, K.; Bestvater, F.; Hershinkel, M.; Mayer, D. Impact of S100A8/A9 Expression on Prostate Cancer Progression in Vitro and in Vivo. *J. Cell. Physiol.* **2014**, 229 (5), 661–671.
- (46) Roy, R.; Louis, G.; Loughlin, K. R.; Wiederschain, D.; Kilroy, S. M.; Lamb, C. C.; Zurakowski, D.; Moses, M. A. Tumor-Specific Urinary Matrix Metalloproteinase Fingerprinting: Identification of High Molecular Weight Urinary Matrix Metalloproteinase Species. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2008**, 14 (20), 6610–6617.
- (47) Brücher, B. L.; Jamall, I. S. Epistemology of the Origin of Cancer: A New Paradigm. *BMC Cancer* **2014**, 14 (331), 1-15.
- (48) Egeblad, M.; Werb, Z. New Functions for the Matrix Metalloproteinases in Cancer Progression. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, 2 (3), 161–174.
- (49) Bergers, G.; Brekken, R.; McMahon, G.; Vu, T. H.; Itoh, T.; Tamaki, K.; Tanzawa, K.; Thorpe, P.; Itohara, S.; Werb, Z.; Hanahan, D. Matrix Metalloproteinase-9

- Triggers the Angiogenic Switch during Carcinogenesis. *Nat. Cell Biol.* **2000**, 2 (10), 737–744.
- (50) Itoh, T.; Tanioka, M.; Yoshida, H.; Yoshioka, T.; Nishimoto, H.; Itoharu, S. Reduced Angiogenesis and Tumor Progression in Gelatinase A-Deficient Mice. *Cancer Res.* **1998**, 58 (5), 1048–1051.
- (51) Xie, T.; Dong, B.; Yan, Y.; Hu, G.; Xu, Y. Association between MMP-2 Expression and Prostate Cancer: A Meta-Analysis. *Biomed. Rep.* **2016**, 4 (2), 241–245.
- (52) Hu, J.; Lei, H.; Fei, X.; Liang, S.; Xu, H.; Qin, D.; Wang, Y.; Wu, Y.; Li, B. NES1/KLK10 Gene Represses Proliferation, Enhances Apoptosis and down-Regulates Glucose Metabolism of PC3 Prostate Cancer Cells. *Sci. Rep.* **2015**, 5 (17426), 1-14.
- (53) Nkuipou-Kenfack, E.; Schanstra, J. P.; Bajwa, S.; Pejchinovski, M.; Vinel, C.; Dray, C.; Valet, P.; Bascands, J.-L.; Vlahou, A.; Koeck, T.; Borries, M.; Busch, H.; Walz, W. B.; Huber, T. B.; Rudolph, K. L.; Pich, A.; Mischak, H.; Zürbig, P. The Use of Urinary Proteomics in the Assessment of Suitability of Mouse Models for Ageing. *PLoS ONE* **2017**, 12 (2), e166875-166889.
- (54) Lawrence, M.; Lai, J.; Clements, J. Kallikreins on Steroids: Structure, Function, and Hormonal Regulation of Prostate-Specific Antigen and the Extended Kallikrein Locus. *Endocr. Rev.* **2010**, 31 (4), 407–446.
- (55) Bianchi-Frias, D.; Vakar-Lopez, F.; Coleman, I. M.; Plymate, S. R.; Reed, M. J.; Nelson, P. S. The Effects of Aging on the Molecular and Cellular Composition of the Prostate Microenvironment. *PLoS One* **2010**, 5 (9), e12501-12516..
- (56) Feng, Z.; Hanson, R. W.; Berger, N. A.; Trubitsyn, A. Reprogramming of Energy Metabolism as a Driver of Aging. *Oncotarget* **2016**, 7 (13), 15410-15420.
- (57) Kurnat-Thoma, E. L.; Pangilinan, F.; Matteini, A. M.; Wong, B.; Pepper, G. A.; Stabler, S. P.; Guralnik, J. M.; Brody, L. C. Association of Transcobalamin II (TCN2) and Transcobalamin II-Receptor (TCblR) Genetic Variations With Cobalamin Deficiency Parameters in Elderly Women. *Biol. Res. Nurs.* **2015**, 17 (4), 444–454.
- (58) Pannérec, A.; Migliavacca, E.; De Castro, A.; Michaud, J.; Karaz, S.; Goulet, L.; Rezzi, S.; Ng, T. P.; Bosco, N.; Larbi, A.; Feige, J. N. Vitamin B12 Deficiency and

- Impaired Expression of Amnionless during Aging. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **2018**, 9 (1), 41–52.
- (59) Bucci, C.; Alifano, P.; Cogli, L. The Role of Rab Proteins in Neuronal Cells and in the Trafficking of Neurotrophin Receptors. *Membranes* **2014**, 4 (4), 642–677.
- (60) Udayar, V.; Buggia-Prévot, V.; Guerreiro, R. L.; Siegel, G.; Rambabu, N.; Soohoo, A. L.; Ponnusamy, M.; Siegenthaler, B.; Bali, J.; Guerreiro, R.; Brás, J.; Sassi, C.; Gibbs, J. R.; Hernandez, D.; Lupton, M. K.; Brown, K.; Morgan, K.; Powell, J.; Singleton, A.; Hardy, J.; Simons, M.; Ries, J.; Puthenveedu, M. A.; Hardy, J.; Thinakaran, G.; Rajendran, L. A Paired RNAi and RabGAP Overexpression Screen Identifies Rab11 as a Regulator of β -Amyloid Production. *Cell Rep.* **2013**, 5 (6), 1536–1551.
- (61) Dias Bastos, P. A.; Vlahou, A.; Leite-Moreira, A.; Santos, L. L.; Ferreira, R.; Vitorino, R. Deciphering the Disease-Related Molecular Networks Using Urine Proteomics. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2017**, 94, 200–209.
- (62) Fishel, M. L.; Kelley, M. R. The DNA Base Excision Repair Protein Ape1/Ref-1 as a Therapeutic and Chemopreventive Target. *Mol. Aspects Med.* **2007**, 28 (3–4), 375–395.
- (63) Jiang, Y.; Zhou, S.; Sandusky, G. E.; Kelley, M. R.; Fishel, M. L. Reduced Expression of DNA Repair and Redox Signaling Protein APE1/Ref-1 Impairs Human Pancreatic Cancer Cell Survival, Proliferation, and Cell Cycle Progression. *Cancer Invest.* **2010**, 28 (9), 885–895.
- (64) Kelley, M. R.; Cheng, L.; Foster, R.; Tritt, R.; Jiang, J.; Broshears, J.; Koch, M. Elevated and Altered Expression of the Multifunctional DNA Base Excision Repair and Redox Enzyme Ape1/Ref-1 in Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2001**, 7 (4), 824–830.

8. ANEXOS

Tabela suplementar S1: Proteínas identificadas na urina por análise LC-MS/MS (com pelo menos 2 péptidos, grau de confiança superior a 95% e FDR inferior a 1%).

Proteína IDs	Nome da proteína	Nome dos gene	Nº de Péptidos
Q00715;Q00729	<i>Histone H2B type 1</i>		4
Q9WUF4	<i>Vesicle-associated membrane protein 8</i>	<i>Vamp8</i>	2
Q641X3	<i>Beta-hexosaminidase subunit alpha</i>	<i>Hexa</i>	3
P23764;Q64625	<i>Glutathione peroxidase 3; Glutathione peroxidase 6</i>	<i>Gpx3; Gpx6</i>	2
P08650	<i>Complement C5; C5a anaphylatoxin</i>	<i>C5</i>	2
Q9QZ76	<i>Myoglobin</i>	<i>Mb</i>	3
Q06496	<i>Sodium-dependent phosphate transport protein 2A</i>	<i>Slc34a1</i>	2
Q642A7	<i>Protein FAM151A</i>	<i>Fam151a</i>	4
Q3MIE4	<i>Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog</i>	<i>Vat1</i>	2
P50116	<i>Protein S100-A9</i>	<i>S100a9</i>	9
Q675A5	<i>Group XV phospholipase A2</i>	<i>Pla2g15</i>	2
P02454;P05539	<i>Collagen alpha-1(I) chain</i>	<i>Colla1</i>	6
O35244	<i>Peroxiredoxin-6</i>	<i>Prdx6</i>	2
P69897;Q6P9T8;Q4QRB4;Q3KRE8;P85108;CON_ENSEMBL:ENSBTAP00000025008;P69897-2	<i>Tubulin beta-5 chain; Tubulin beta-4B chain; Tubulin beta-3 chain; Tubulin beta-2B chain; Tubulin beta-2A chain</i>	<i>Tubb5; Tubb4b; Tubb3; Tubb2b; Tubb2a</i>	4

P17164	<i>Tissue alpha-L-fucosidase</i>	<i>Fucal</i>	3
P14480;P14480-2;CON__P02676	<i>Fibrinogen beta chain;Fibrinopeptide B;Fibrinogen beta chain</i>	<i>Fgb</i>	15
P02680-2;P02680	<i>Fibrinogen gamma chain</i>	<i>Fgg</i>	10
Q4G075	<i>Leukocyte elastase inhibitor A</i>	<i>Serpinb1a</i>	9
P08289	<i>Alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme</i>	<i>Alpl</i>	3
P46720	<i>Solute carrier organic anion transporter family member 1A1</i>	<i>Slco1a1</i>	2
O88766	<i>Neutrophil collagenase</i>	<i>Mmp8</i>	3
P10719	<i>ATP synthase subunit beta, mitochondrial</i>	<i>Atp5b</i>	3
Q9ESS6	<i>Basal cell adhesion molecule</i>	<i>Bcam</i>	2
Q4FZV0;Q4FZV0-2	<i>Beta-mannosidase</i>	<i>Manba</i>	6
Q6P7S1	<i>Acid ceramidase</i>	<i>Asah1</i>	4
P06399-2;P06399	<i>Fibrinogen alpha chain; Fibrinopeptide A;Fibrinogen alpha chain</i>	<i>Fga</i>	5
P56574	<i>Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial</i>	<i>Idh2</i>	2
Q63416;CON__Q0V8M9	<i>Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3</i>	<i>Itih3</i>	4
Q62636;P62836	<i>Ras-related protein Rap-1b; Ras-related protein Rap-1A</i>	<i>Rap1b; Rap1a</i>	3
P07150	<i>Annexin A1</i>	<i>Anxa1</i>	12

Q63467	<i>Trefoil factor 1</i>	<i>Tff1</i>	2
P50137	<i>Transketolase</i>	<i>Tkt</i>	7
P25093	<i>Fumarylacetoacetase</i>	<i>Fah</i>	2
P97580	<i>Beta-microseminoprotein</i>	<i>Msemb</i>	6
P63095;Q63803;P63095-2;P63095-3;P59215-2;P59215;P29348;P10824;P08753;P04897;P38406	<i>Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms short; Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas</i>	<i>Gnas</i>	4
Q4QQW8	<i>Putative phospholipase B-like 2</i>	<i>Plbd2</i>	5
Q793F9;Q6GX84	<i>Vacuolar protein sorting-associated protein 4A; Fidgetin-like protein 1</i>	<i>Vps4a; Figl1</i>	2
Q66H12	<i>Alpha-N-acetylgalactosaminidase</i>	<i>Naga</i>	3
P25113;P16290	<i>Phosphoglycerate mutase 1; Phosphoglycerate mutase 2</i>	<i>Pgam1; Pgam2</i>	2
Q6P734	<i>Plasma protease C1 inhibitor</i>	<i>Serping1</i>	5
Q8CFN2;Q8CFN2-2	<i>Cell division control protein 42 homolog</i>	<i>Cdc42</i>	3
Q63621	<i>Interleukin-1 receptor accessory protein</i>	<i>Il1rap</i>	6
Q03336	<i>Regucalcin</i>	<i>Rgn</i>	2
P19804;Q05982	<i>Nucleoside diphosphate kinase B; Nucleoside diphosphate kinase A</i>	<i>Nme2; Nme1</i>	2
Q62740	<i>Secreted phosphoprotein 24</i>	<i>Spp2</i>	2

P42854	<i>Regenerating islet-derived protein 3-gamma; Regenerating islet-derived protein 3-gamma 16.5 kDa form; Regenerating islet-derived protein 3-gamma 15 kDa form</i>	<i>Reg3g</i>	5
B0BNN3	<i>Carbonic anhydrase 1</i>	<i>Ca1</i>	6
Q568Z6	<i>IST1 homolog</i>	<i>Ist1</i>	4
Q6AYZ1;Q6P9V9;P68370;Q5XIF6;Q68FR8;Q6AY56	<i>Tubulin alpha-1C chain; Tubulin alpha-1B chain; Tubulin alpha-1A chain; Tubulin alpha-4A chain; Tubulin alpha-3 chain</i>	<i>Tuba1c; Tuba1b; Tuba1a; Tuba4a; Tuba3a</i>	4
Q6P7A9	<i>Lysosomal alpha-glucosidase</i>	<i>Gaa</i>	5
P97546-3;P97546-1;P97546	<i>Neuroplastin</i>	<i>Nptn</i>	4
P30919	<i>N(4)-(Beta-N-acetylglucosaminyl)-L-asparaginase; Glycosylasparaginase alpha chain; Glycosylasparaginase beta chain</i>	<i>Aga</i>	5
P85971	<i>6-phosphogluconolactonase</i>	<i>Pgls</i>	7
P45592	<i>Cofilin-1</i>	<i>Cfl1</i>	4
P04906	<i>Glutathione S-transferase P</i>	<i>Gstp1</i>	3
O70513	<i>Galectin-3-binding protein</i>	<i>Lgals3bp</i>	4
Q0PMD2	<i>Anthrax toxin receptor 1</i>	<i>Antxr1</i>	4
Q02974;Q02974-2	<i>Ketohexokinase</i>	<i>Khk</i>	2
Q641Z6;Q8R491;Q4V8H8	<i>EH domain-containing protein 1</i>	<i>Ehd1</i>	5

P82450	<i>Sialate O-acetyltransferase; Sialate O-acetyltransferase small subunit; Sialate O-acetyltransferase large subunit</i>	<i>Siae</i>	4
Q9WTQ2	<i>Podocalyxin</i>	<i>Podxl</i>	3
Q5RKI7	<i>Solute carrier family 7 member 13</i>	<i>Slc7a13</i>	3
P97574	<i>Stanniocalcin-1</i>	<i>Stc1</i>	4
P20611	<i>Lysosomal acid phosphatase</i>	<i>Acp2</i>	4
P15999	<i>ATP synthase subunit alpha, mitochondrial</i>	<i>Atp5a1</i>	4
P04639	<i>Apolipoprotein A-I; Proapolipoprotein A-I</i>	<i>Apoa1</i>	7
Q99J86-2;Q99J86	<i>Attractin</i>	<i>Atrn</i>	3
Q35568	<i>EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1</i>	<i>Efemp1</i>	5
Q499T2	<i>Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase</i>	<i>Ifi30</i>	2
Q07523	<i>Hydroxyacid oxidase 2</i>	<i>Hao2</i>	2
P02262;A9UMV8;P0CC09;Q4FZT6;P0C170;P0C169;Q64598;Q00728	<i>Histone H2A type 1; Histone H2A.J; Histone H2A type 2-A; Histone H2A type 3; Histone H2A type 1-E; Histone H2A type 1-C; Histone H2A type 1-F; Histone H2A type 4</i>	<i>H2afj; Hist2h2aa3</i>	4
Q6LED0;P84245	<i>Histone H3.1; Histone H3.3</i>	<i>H3f3b</i>	4
P20761	<i>Ig gamma-2B chain C region</i>	<i>Igh-1a</i>	4

P41562	<i>Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic</i>	<i>Idh1</i>	5
Q63556	<i>Serine protease inhibitor A3M</i>	<i>Serpina3m</i>	8
Q5FVF9	<i>Biotinidase</i>	<i>Btd</i>	3
P35704	<i>Peroxiredoxin-2</i>	<i>Prdx2</i>	4
P80067	<i>Dipeptidyl peptidase 1; Dipeptidyl peptidase 1 exclusion domain chain; Dipeptidyl peptidase 1 heavy chain; Dipeptidyl peptidase 1 light chain</i>	<i>Ctsc</i>	3
Q02253	<i>Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial</i>	<i>Aldh6a1</i>	4
Q6AXR4	<i>Beta-hexosaminidase subunit beta</i>	<i>Hexb</i>	5
P04642	<i>L-lactate dehydrogenase A chain</i>	<i>Ldha</i>	3
Q64602	<i>Kynurenine/alpha-aminoadipate aminotransferase, mitochondrial</i>	<i>Aadat</i>	6
P09606	<i>Glutamine synthetase</i>	<i>Glul</i>	4
Q9JHY1	<i>Junctional adhesion molecule A</i>	<i>F11r</i>	2
O35217	<i>Multiple inositol polyphosphate phosphatase 1</i>	<i>Minpp1</i>	9
P48508	<i>Glutamate--cysteine ligase regulatory subunit</i>	<i>Gclm</i>	4
P10960	<i>Sulfated glycoprotein 1</i>	<i>Psap</i>	4
P14630	<i>Apolipoprotein M</i>	<i>Apom</i>	4

P08721	<i>Osteopontin</i>	<i>Spp1</i>	2
Q63530	<i>Phosphotriesterase-related protein</i>	<i>Pter</i>	4
P26644;CON__P17690	<i>Beta-2-glycoprotein 1</i>	<i>ApoH</i>	7
P20759	<i>Ig gamma-1 chain C region</i>		5
Q62930	<i>Complement component C9</i>	<i>C9</i>	7
P02625	<i>Parvalbumin alpha</i>	<i>Pvalb</i>	5
P08937	<i>Odorant-binding protein</i>	<i>Obp1f</i>	3
Q6AYD4	<i>Endothelial cell-selective adhesion molecule</i>	<i>Esam</i>	3
P18757	<i>Cystathionine gamma-lyase</i>	<i>Cth</i>	4
P30152	<i>Neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>	<i>Lcn2</i>	6
P47967;P97840-2;P97840	<i>Galectin-5</i>	<i>Lgals5</i>	6
P16617	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>	<i>Pgk1</i>	4
Q5U2Q3	<i>Ester hydrolase C11orf54 homolog</i>		3
Q5M876	<i>N-acyl-aromatic-L-amino acid amidohydrolase (carboxylate-forming)</i>	<i>Acy3</i>	5
P04916	<i>Retinol-binding protein 4</i>	<i>Rbp4</i>	5
Q8CHN3;Q8CHN3-2	<i>WAP four-disulfide core domain protein 2</i>	<i>Wfdc2</i>	3
O70244	<i>Cubilin</i>	<i>Cubn</i>	13
P11517	<i>Hemoglobin subunit beta-2</i>		16

P19218	<i>Pancreatic secretory granule membrane major glycoprotein GP2</i>	<i>Gp2</i>	4
P50399;P50398	<i>Rab GDP dissociation inhibitor beta; Rab GDP dissociation inhibitor alpha</i>	<i>Gdi2; Gdi1</i>	4
Q63691	<i>Monocyte differentiation antigen CD14</i>	<i>Cd14</i>	5
P36374	<i>Prostatic glandular kallikrein-6</i>	<i>Klk6</i>	7
P48500	<i>Triosephosphate isomerase</i>	<i>Tpi1</i>	5
Q9WTW7	<i>Solute carrier family 23 member 1</i>	<i>Slc23a1</i>	6
Q6Q0N1	<i>Cytosolic non-specific dipeptidase</i>	<i>Cndp2</i>	6
Q63716	<i>Peroxiredoxin-1</i>	<i>Prdx1</i>	5
P62804	<i>Histone H4; Osteogenic growth peptide</i>	<i>Hist1h4b</i>	8
P63102	<i>14-3-3 protein zeta/delta</i>	<i>Ywhaz</i>	5
P09034	<i>Argininosuccinate synthase</i>	<i>Ass1</i>	5
P05371	<i>Clusterin; Clusterin beta chain; Clusterin alpha chain</i>	<i>Clu</i>	8
P31211	<i>Corticosteroid-binding globulin</i>	<i>Serpina6</i>	10
P38918	<i>Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 3</i>	<i>Akr7a3</i>	6
P54313;O35353;P54311;P52287	<i>Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2</i>	<i>Gnb2</i>	7

P23785	<i>Granulins; Acrogranin; Granulin-1; Granulin-2; Granulin-3; Granulin-4; Granulin-5; Granulin-6; Granulin-7</i>	<i>Grn</i>	4
P34058	<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>	<i>Hsp90ab1</i>	5
P27139	<i>Carbonic anhydrase 2</i>	<i>Ca2</i>	5
Q6AYS7;Q6PTT0	<i>Aminoacylase-1A</i>	<i>Acy1a</i>	6
P01015	<i>Angiotensinogen; Angiotensin-1; Angiotensin-2; Angiotensin-3; Angiotensin-4; Angiotensin 1-9; Angiotensin 1-7; Angiotensin 1-5; Angiotensin 1-4</i>	<i>Agt</i>	10
P08649;CON_P01030;CON_ENSEMBL:ENSBTAP00000007350	<i>Complement C4; Complement C4 beta chain; Complement C4 alpha chain; C4a anaphylatoxin; Complement C4 gamma chain</i>	<i>C4</i>	12
P07151	<i>Beta-2-microglobulin</i>	<i>B2m</i>	2
O55006	<i>Protein RoBo-1</i>		3
Q01460	<i>Di-N-acetylchitobiase</i>	<i>Ctbs</i>	8
P32038	<i>Complement factor D</i>	<i>Cfd</i>	7
P10252	<i>CD48 antigen</i>	<i>Cd48</i>	7
Q9Z0W7	<i>Chloride intracellular channel protein 4</i>	<i>Clic4</i>	4
P62630;P62632	<i>Elongation factor 1-alpha 1; Elongation factor 1-alpha 2</i>	<i>Eef1a1; Eef1a2</i>	5
Q6P767	<i>Pituitary tumor-transforming gene 1</i>	<i>Pttg1p</i>	4

	<i>protein-interacting protein</i>		
P09006	<i>Serine protease inhibitor A3N</i>	<i>Serpina3n</i>	11
Q6IMF3	<i>Keratin, type II cytoskeletal 1</i>	<i>Krt1</i>	15
P00787	<i>Cathepsin B; Cathepsin B light chain; Cathepsin B heavy chain</i>	<i>Ctsb</i>	8
Q6DGG1	<i>Alpha/beta hydrolase domain-containing protein 14B</i>	<i>Abhd14b</i>	5
Q9QX79	<i>Fetuin-B</i>	<i>Fetub</i>	9
P04797	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	<i>Gapdh</i>	6
P02767	<i>Transthyretin</i>	<i>Ttr</i>	5
O88989	<i>Malate dehydrogenase, cytoplasmic</i>	<i>Mdh1</i>	8
Q03626;Q03626-2	<i>Murinoglobulin-1</i>	<i>Mug1</i>	39
P62986;P62982;P0CG51;Q63429	<i>Ubiquitin-60S ribosomal protein L40; Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a; Polyubiquitin-B; Ubiquitin; Polyubiquitin-C; Ubiquitin-related</i>	<i>Uba52; Rps27a; Ubb; Ubc</i>	4
P06866;P06866-2	<i>Haptoglobin; Haptoglobin alpha chain; Haptoglobin beta chain</i>	<i>Hp</i>	12
O70417	<i>Prolactin-inducible protein homolog</i>	<i>Pip</i>	3
P23680	<i>Serum amyloid P-component</i>	<i>Apcs</i>	8

Q6MG71	<i>Choline transporter-like protein 4</i>	<i>Slc44a4</i>	3
Q920A6	<i>Retinoid-inducible serine carboxypeptidase</i>	<i>Scpep1</i>	7
P24268	<i>Cathepsin D; Cathepsin D 12 kDa light chain; Cathepsin D 9 kDa light chain; Cathepsin D 34 kDa heavy chain; Cathepsin D 30 kDa heavy chain</i>	<i>Ctsd</i>	11
Q6MG61	<i>Chloride intracellular channel protein 1</i>	<i>Clic1</i>	8
P04905	<i>Glutathione S-transferase Mu 1</i>	<i>Gstm1</i>	2
P10959;Q63108;Q63010	<i>Carboxylesterase 1C</i>	<i>Ces1c</i>	16
P26051-2;P26051	<i>CD44 antigen</i>	<i>Cd44</i>	2
Q9JIK1-2;Q9JIK1	<i>Cadherin-related family member 5</i>	<i>Cdhr5</i>	5
P52759	<i>Ribonuclease UK114</i>	<i>Hrsp12</i>	4
P63018;P14659;P06761	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein; Heat shock-related 70 kDa protein 2</i>	<i>Hspa8; Hspa2</i>	14
O35763	<i>Moesin</i>	<i>Msn</i>	20
P02782	<i>Prostatic steroid-binding protein C1</i>	<i>Psbpc1</i>	3
P29975	<i>Aquaporin-1</i>	<i>Aqp1</i>	3
P04764;P15429;P07323	<i>Alpha-enolase</i>	<i>Eno1</i>	12
Q6IUU3-2;Q6IUU3-3;Q6IUU3	<i>Sulfhydryl oxidase 1</i>	<i>Qsox1</i>	17
P04276	<i>Vitamin D-binding protein</i>	<i>Gc</i>	13

P18292	<i>Prothrombin; Activation peptide fragment 1; Activation peptide fragment 2; Thrombin light chain; Thrombin heavy chain</i>	<i>F2</i>	4
P04937-4;P04937-2;P04937-3;P04937	<i>Fibronectin; Anastellin</i>	<i>Fn1</i>	13
P51635	<i>Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]</i>	<i>Akr1a1</i>	9
P01026	<i>Complement C3; Complement C3 beta chain; C3-beta-c; Complement C3 alpha chain; C3a anaphylatoxin; Acylation stimulating protein; Complement C3b alpha chain; Complement C3c alpha chain fragment 1; Complement C3dg fragment; Complement C3g fragment; Complement C3d fragment; Complement C3f fragment; Complement C3c alpha chain fragment 2</i>	<i>C3</i>	47
P00884;P09117	<i>Fructose-bisphosphate aldolase B</i>	<i>Aldob</i>	9
P13635;CON__ENSEMBL: ENSBTAP00000031900	<i>Ceruloplasmin</i>	<i>Cp</i>	36
P19468	<i>Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit</i>	<i>Gclc</i>	14
Q00657	<i>Chondroitin sulfate proteoglycan 4</i>	<i>Cspg4</i>	29
P07861	<i>Neprilysin</i>	<i>Mme</i>	26
P01048	<i>T-kininogen 1; T-kininogen 1 heavy</i>	<i>Map1</i>	16

	<i>chain;T-kinin; T-kininogen 1 light chain</i>		
P00502;P46418;P14942	<i>Glutathione S-transferase alpha-1; Glutathione S-transferase alpha-1, N-terminally processed</i>	<i>Gsta1</i>	6
P02764	<i>Alpha-1-acid glycoprotein</i>	<i>Orm1</i>	9
P19112;Q9Z1N1	<i>Fructose-1,6-bisphosphatase 1</i>	<i>Fbp1</i>	11
P28826	<i>Meprin A subunit beta</i>	<i>Mep1b</i>	11
P02650	<i>Apolipoprotein E</i>	<i>ApoE</i>	11
P50123;P50123-2;Q641X1	<i>Glutamyl aminopeptidase</i>	<i>Enpep</i>	25
Q9EPB1	<i>Dipeptidyl peptidase 2</i>	<i>Dpp7</i>	10
P27274	<i>CD59 glycoprotein</i>	<i>Cd59</i>	4
P15083	<i>Polymeric immunoglobulin receptor; Secretory component</i>	<i>Pigr</i>	21
Q62867	<i>Gamma-glutamyl hydrolase</i>	<i>Ggh</i>	9
Q99041	<i>Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 4</i>	<i>Tgm4</i>	37
P22282	<i>Cystatin-related protein 1</i>	<i>Andpro</i>	13
Q9JJ19	<i>Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1</i>	<i>Slc9a3r1</i>	13
P24090	<i>Alpha-2-HS-glycoprotein</i>	<i>Ahsg</i>	9
Q5XI43	<i>Matrix-remodeling-associated protein 8</i>	<i>Mxra8</i>	14

P36953;CON__REFSEQ:XP_585019	<i>Afamin</i>	<i>Afm</i>	27
P08932;P08934-2;P08934	<i>T-kininogen 2; T-kininogen 2 heavy chain; T-kinin; T-kininogen 2 light chain</i>		18
P83121	<i>Urinary protein 3</i>		3
Q01177;CON__P06868	<i>Plasminogen; Plasmin heavy chain A; Activation peptide; Angiostatin; Plasmin heavy chain A, short form; Plasmin light chain B</i>	<i>Plg</i>	29
P07632	<i>Superoxide dismutase [Cu-Zn]</i>	<i>Sod1</i>	7
Q64319	<i>Neutral and basic amino acid transport protein rBAT</i>	<i>Slc3a1</i>	23
P06760	<i>Beta-glucuronidase</i>	<i>Gusb</i>	21
P48199	<i>C-reactive protein</i>	<i>Crp</i>	4
P14841	<i>Cystatin-C</i>	<i>Cst3</i>	4
P08723	<i>Prostatic spermine-binding protein</i>	<i>Sbp</i>	13
P29598	<i>Urokinase-type plasminogen activator; Urokinase-type plasminogen activator long chain A; Urokinase-type plasminogen activator short chain A; Urokinase-type plasminogen activator chain B</i>	<i>Plau</i>	13
Q9JJ40	<i>Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF3</i>	<i>Pdzk1</i>	27

P31977	<i>Ezrin</i>	<i>Ezr</i>	26
P07314	<i>Gamma-glutamyltranspeptidase 1; Gamma-glutamyltranspeptidase 1 heavy chain; Gamma-glutamyltranspeptidase 1 light chain</i>	<i>Ggt1</i>	14
Q68FP1-2;Q68FP1;CON__Q3SX14	<i>Gelsolin</i>	<i>Gsn</i>	15
P20767	<i>Ig lambda-2 chain C region</i>		7
P22057	<i>Prostaglandin-H2 D-isomerase</i>	<i>Ptgds</i>	8
P15684	<i>Aminopeptidase N</i>	<i>Anpep</i>	23
P14740	<i>Dipeptidyl peptidase 4; Dipeptidyl peptidase 4 membrane form; Dipeptidyl peptidase 4 soluble form; Dipeptidyl peptidase 4 60 kDa soluble form</i>	<i>Dpp4</i>	23
P02781	<i>Prostatic steroid-binding protein C2</i>	<i>Psbpc2</i>	7
P20760	<i>Ig gamma-2A chain C region</i>	<i>Igg-2a</i>	17
Q6IRK9	<i>Carboxypeptidase Q</i>	<i>Cpq</i>	11
P02780	<i>Secretoglobin family 2A member 2</i>	<i>Scgb2a2</i>	4
P17475	<i>Alpha-1-antiproteinase</i>	<i>Serpina1</i>	22
P20059	<i>Hemopexin</i>	<i>Hpx</i>	37
P15399-2;P15399	<i>Probasin</i>	<i>Pbsn</i>	13
P14046;P06238	<i>Alpha-1-inhibitor 3</i>	<i>Al13</i>	46
P98158	<i>Low-density lipoprotein receptor-related protein 2</i>	<i>Lrp2</i>	66

Q64230	<i>Meprin A subunit alpha</i>	<i>Mep1a</i>	21
P36373;P15950	<i>Glandular kallikrein-7, submandibular/renal</i>	<i>Klk7</i>	10
P22283	<i>Cystatin-related protein 2</i>	<i>Crp2</i>	13
Q64240;CON__P00978	<i>Protein AMBP; Alpha-1-microglobulin; Inter-alpha-trypsin inhibitor light chain; Trypstatin</i>	<i>Ambp</i>	14
P01946;CON__P01966	<i>Hemoglobin subunit alpha-1/2</i>	<i>Hba1</i>	10
Q9R0T4;Q6W3B0	<i>Cadherin-1; E-Cad/CTF1; E-Cad/CTF2; E-Cad/CTF3</i>	<i>Cdh1</i>	19
P07647;P00759	<i>Submandibular glandular kallikrein-9; Submandibular glandular kallikrein-9 light chain; Submandibular glandular kallikrein-9 heavy chain</i>	<i>Klk9</i>	14
P81827	<i>Urinary protein 1</i>		4
P63259;P60711	<i>Actin, cytoplasmic 2; Actin, cytoplasmic 2, N-terminally processed; Actin, cytoplasmic 1; Actin, cytoplasmic 1, N-terminally processed</i>	<i>Actg1; Actb</i>	19
Q63041	<i>Alpha-1-macroglobulin; Alpha-1-macroglobulin 45 kDa subunit</i>	<i>A1m</i>	61
P81828	<i>Urinary protein 2</i>		3
P05545	<i>Serine protease inhibitor A3K</i>	<i>Serpina3k</i>	27
P00689	<i>Pancreatic alpha-amylase</i>	<i>Amy2</i>	12
P21704	<i>Deoxyribonuclease-1</i>	<i>Dnase1</i>	15

P00758	<i>Kallikrein-1; Nerve growth factor gamma chain 1; Nerve growth factor gamma chain 2</i>	<i>Ngfg</i>	7
P02091;CON__Q3SX09;CON__P02070	<i>Hemoglobin subunit beta-1</i>	<i>Hbb</i>	17
P12346;P12346-2;CON__Q29443;CON__Q0IIK2	<i>Serotransferrin</i>	<i>Tf</i>	59
P05544;P09005	<i>Serine protease inhibitor A3L</i>	<i>Serpina3l</i>	35
P01835;P01836	<i>Ig kappa chain C region, B allele</i>		12
P07522	<i>Pro-epidermal growth factor; Epidermal growth factor</i>	<i>Egf</i>	57
P27590	<i>Uromodulin; Uromodulin, secreted form</i>	<i>Umod</i>	21
P02770	<i>Serum albumin</i>	<i>Alb</i>	77
P02761	<i>Major urinary protein; 15.5 kDa fatty acid-binding protein</i>		29

Abreviaturas: FDR – False discovery rate; ID – Entry name.