

**Instituto de Biociências de Botucatu - Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho"**

Dissertação de Mestrado Acadêmico em Biologia Geral e Aplicada

**Caracterização funcional do miR-184 na próstata de ratos submetidos a
má-nutrição materna. Potencial participação na origem desenvolvimentista
do câncer de próstata.**

Orientador:

Prof. Dr. Luis Antonio Justulin Junior

Developmental Biology and Multi Omics Lab, Departamento de Biologia Estrutural e
Funcional, Setor Morfologia - IBB/UNESP- Botucatu.

Discente:

Renato Mattos

Mestrando em Biologia Geral e Aplicada, IBB/UNESP – Botucatu.

Botucatu

2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO MIR-184 NA PRÓSTATA DE RATOS
SUBMETIDOS A MÁ-NUTRIÇÃO MATERNA. POTENCIAL PARTICIPAÇÃO NA
ORIGEM DESENVOLVIMENTISTA DO CÂNCER DE PRÓSTATA.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, para defesa de Mestrado Acadêmico pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, área de concentração Biologia Estrutural e Funcional.

Discente: Renato Mattos

Orientador: Prof. Dr. Luís Antônio Justulin
Junior

Botucatu
2025

M444c	Mattos, Renato Caracterização funcional do miR-184 na próstata de ratos submetidos a má-nutrição materna. Potencial participação na origem desenvolvimentista do câncer de próstata. / Renato Mattos. -- Botucatu, 2025 55 f. : tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu Orientador: Luis Antonio Justulin Junior 1. Câncer. 2. Próstata. 3. Epigenética. 4. miRNA. 5. DOHaD. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Caracterização funcional do miR-184 na próstata de ratos submetidos a má nutrição materna. Potencial participação na origem desenvolvimentista do câncer de próstata.

AUTOR: RENATO MATTOS

ORIENTADOR: LUIS ANTONIO JUSTULIN JUNIOR

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Biologia Geral e Aplicada, área: Biologia Celular Estrutural e Funcional pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. LUIS ANTONIO JUSTULIN JUNIOR (Participação Presencial)
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp

Dra. DEBORA CRISTINA DAMASCENO MEIRELLES DOS SANTOS (Participação Virtual)
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia / Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp

Dr. MARCEL RODRIGUES FERREIRA (Participação Presencial)
Departamento de Patologia / Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp

Botucatu, 27 de fevereiro de 2025

Documento assinado digitalmente
 **MARIA VICTORIA RAMALHO DA CUNHA**
Data: 06/03/2025 10:19:21 -0300
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

Maria Victória Ramalho da Cunha
Assistente Administrativo II da Seção Técnica de Pós-Graduação
Instituto de Biociências de Botucatu

Instituto de Biociências - Câmpus de Botucatu -
Rua Doutor Antonio Celso Wagner Zanin, s/nº, 18618689
<https://www.ibb.unesp.br/ensino/pos-graduacao/programas-stricto-sensu/pg-biologia-geral-e-aplicada/CNPJ:48031918002259>

RESUMO PARA SOCIEDADE

A fome é um problema grave no Brasil e no mundo, e está longe de ser resolvido. Além disso, há outro desafio: mesmo quem consegue se alimentar muitas vezes depende de comidas industrializadas, como salgadinhos, refrigerantes e fast-food. Esses alimentos são cheios de açúcar, gordura e produtos químicos, mas pobres em nutrientes. Eles até dão a sensação de “encher a barriga”, mas não fornecem as vitaminas e minerais que o corpo precisa para funcionar bem. O resultado? Doenças como obesidade, diabetes e até câncer estão aumentando. É como se o corpo estivesse sendo abastecido com combustível de má qualidade: funciona por um tempo, mas acaba sofrendo danos. A alimentação é ainda mais crítica para gestantes e bebês. Pesquisas mostram que, quando uma mãe não se alimenta bem durante a gravidez e a amamentação, isso pode afetar a saúde do filho para o resto da vida. Por exemplo, estudos com animais revelaram que a falta de proteína nessa fase atrasou o desenvolvimento da próstata e, quando esses animais envelheceram, tiveram maior risco de câncer. É como construir uma casa com materiais ruins: a estrutura fica frágil e propensa a problemas no futuro. Para entender melhor doenças como o câncer, cientistas investigam moléculas que agem como interruptores, ligando ou desligando genes específicos. Imagine que cada gene é uma receita para fazer uma proteína, e essas proteínas definem como as células funcionam. Descobrimos que um desses “interruptores” influencia genes que ajudam células cancerosas a se espalhar e sobreviver no corpo. Isso explica por que alguns tumores são tão difíceis de tratar. Em nosso estudo, os resultados mostraram que esse “interruptor” influencia em genes envolvidos com respostas hormonais, proliferação celular e metabolismo. Esses achados reforçam a importância de políticas públicas para combater a fome, especialmente em gestantes, garantindo uma nutrição adequada para prevenir problemas de saúde a longo prazo. Além disso, entendendo moléculas envolvidas no desenvolvimento do câncer, podemos buscar novas formas de prevenção, tratamento e melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

Dedicatória

***Esta jornada foi tecida a muitas mãos.
Agradeço a cada fio de apoio que a fortaleceu.***

Agradecimentos

Como em todos os âmbitos da vida, a trajetória acadêmica é marcada pela colaboração de inúmeras pessoas, cuja contribuição se manifesta de diferentes formas. Algumas desempenharam um papel fundamental na execução deste projeto por meio do trabalho prático, enquanto outras ofereceram suporte intelectual, enriquecendo esta pesquisa com discussões e ideias valiosas. Há também aqueles que proporcionaram apoio emocional, cuja motivação e incentivo foram essenciais nos momentos desafiadores. O trabalho e a conquista são coletivos, e a todos expresso minha mais sincera gratidão, reservando este espaço para reconhecer e agradecer:

À minha família, alicerce fundamental que me sustentou e proporcionou a base sobre a qual construí minha trajetória e minha vida adulta. Aos meus pais, Joice e Renato, devo tudo que sou.

À minha companheira, Letícia Batista Soares, o maior presente que a UNESP poderia me dar. Esteve ao meu lado sendo meu ponto de apoio incondicional desde o início. Minha dupla, da Bio LIII para toda a vida. Sou imensamente grato por compartilhar essa caminhada com você.

Ao meu querido e admirado amigo, Dr. Sergio Alexandre Alcântara dos Santos, que me abriu as portas do laboratório e guiou meus primeiros passos nesta jornada acadêmica. Seu ensinamento foi fundamental para minha formação. Minha mais profunda gratidão por sua generosidade e amizade.

Aos meus amigos, Dr. Matheus Naia Fioretto, grande professor que despertou em mim o fascínio pela fisiologia e com quem tive a honra de colaborar em trabalhos incríveis. Luiz Marcos Frediani Portela, cientista sempre atualizado, que me introduziu ao universo da biologia molecular, cultura de células e bioinformática, fornecendo a base essencial para o desenvolvimento deste trabalho. Hecttor Sebastian Baptista, com quem compartilho um senso de humor alinhado, tornando o ambiente de trabalho mais leve e agradável. Ana Beathriz Leite Lorente, minha estimada colega de turma e laboratório, com quem dividi os desafios e alegrias da vida acadêmica. Micheli Canuto de Lima, por tantas risadas na sala de estudo e pelo apoio valioso no laboratório de cultura celular. Érika Perez, sempre solícita e disposta a ajudar. Victor Hugo Livani Zulian, pelo suporte essencial em grande parte dos experimentos. Geovanna Carla

Amaro da Silva, Arianne Rocha Bartolomeu, Felipe Nogueira e Diego Henrique Delgado, pela amizade e por estarem ao meu lado nessa jornada.

Aos colegas do DBMOL, Luisa Annibal Barata, Isabelle Tenori Ribeiro e todos os alunos de iniciação científica, sou grato pelas experiências compartilhadas e pelos momentos enriquecedores vividos juntos.

Aos laboratórios que contribuíram para minha formação e pesquisa: **LabMEC**, em nome do professor Dr. Sérgio Felisbino; **LabDECA**, em nome do professor Dr. Wellerson Scarano; **LabME**, em nome da professora Dra. Maeli Dal Pai; e **ICBLab**, em nome da professora Dra. Flavia Karina Delella.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, meu profundo reconhecimento pelo suporte essencial à pesquisa. O apoio concedido por meio das bolsas de estudos (Processo FAPESP: 2023/01714-9; 2023/16116-0) foi fundamental para a realização deste trabalho. Agradeço também à coordenação e aos professores do Programa de **Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada** pela excelência na formação de seus alunos. Por fim, meu sincero respeito e gratidão aos animais experimentais, cuja contribuição foi fundamental para a realização deste trabalho.

Agradecimentos especiais

Ao meu orientador, Luis Antonio Justulin Junior, minha sincera gratidão por sua orientação, confiança e dedicação ao longo dos anos. Seu entusiasmo e incentivo me motivaram a seguir por caminhos que eu jamais imaginaria trilhar. Desde a fatídica aula de tecido ósseo, quando tomei coragem para pedir um estágio e você, generosamente, abriu as portas do laboratório, permitindo que eu transformasse meu sonho de ser cientista em realidade, até hoje, sou imensamente grato por tudo.

À minha orientadora no exterior, Edna Cukierman, que tive a honra de trabalhar ao lado e que me acolheu tão bem em seu laboratório. Sua dedicação e excelência científica enriqueceram minha formação e renovaram minhas esperanças na carreira acadêmica.

Em memória de minhas queridas avós, **Therezinha** e **Maria**, que dedicaram tanto amor e esforço para que eu chegasse até aqui, mesmo sem terem tido a chance de ver esse resultado. Carrego comigo seus ensinamentos e sua força. Muito obrigado por tudo.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram para este trabalho.

LISTA DE ABREVIACÕES

DOHaD - Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença, do inglês *Developmental Origin of Health and Disease*

PF – Programação Fetal

RPM – Restrição Proteica Materna

miRNA – microRNA

CaP – Câncer de Próstata

DPN – Dia pós-natal

PV – Próstata Ventral

CTR – Grupo Controle

GLLP – Grupo Restrição Proteica Gestação e Lactação, do inglês *Gestational and Lactational Low Protein diet*

DE – Diferencialmente Expresso

DEG – Gene Diferencialmente Expresso

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Impacto do ambiente na remodelação tecidual. Sob condições ambientais adversas, mudanças no perfil de expressão gênica, desbalanço na secreção hormonal e comprometimento da integridade celular são observadas. Efeitos cascata incluem redução na proliferação e diferenciação celular, resultando em órgãos com menor número de unidades funcionais e gerando consequências a longo prazo, como resposta prejudicada a estímulos ambientais e aceleração de disfunções associadas ao envelhecimento. Adaptado de Langley-Evans, 2020.

Figura 2. Esquema representativo da biogênese e mecanismos de atuação do miRNA. Transcrição do gene de miRNA em pré-miRNA, seguida de clivagem por Drosha/DGCR8 para gerar pré-miRNA. Exportação para o citoplasma e clivagem por Dicer, em associação com TRBP, resultando em miRNA maduro carregado no complexo RISC (Ago2). Degradação do mRNA alvo (complementaridade perfeita) ou repressão traducional (complementaridade parcial). Adaptada de WINTER et al., 2009.

Figura 3. Desenvolvimento prostático em ratos e humanos, destacando semelhanças e diferenças na morfogênese de ramificação nos diferentes estágios. Períodos do desenvolvimento: Fetal, neonatal, puberal e adulto. Processos-chave: brotamento (budding), ramificação e canalização, citodiferenciação e maturação. Adaptado de Scarano et al., 2018.

Figura 4. Dados epidemiológicos sobre incidência e mortalidade do câncer no mundo e no Brasil. O câncer de próstata é o terceiro mais incidente no mundo e primeiro no Brasil, sendo o oitavo mais letal em pessoas com próstata no mundo (GLOBOCAN, 2022; INCA, 2023).

Figura 5. Estatísticas da fome que segue crescendo nos últimos três anos no mundo (A). Estatística demonstrando os níveis de insegurança alimentar no Brasil em 2022 (B). A prevalência da insegurança alimentar manteve-se consistentemente mais elevada entre as mulheres do que entre os homens, a nível mundial e em todas as regiões (C).

Figura 6. Gráfico de barras mostrando a expressão dos miRNAs diferencialmente expressos na PV de animais submetidos a RPM no DPN21. Barras negativas representando os downregulados, e positivas representando os upregulados.

Figura 7. Heatmap representando os níveis de expressão gênica na PV dos grupos CTR e GLLP. As colunas representam amostras biológicas, enquanto as linhas correspondem aos genes analisados (A). Volcano Plot ilustrando a distribuição dos genes com base no Log2 Fold Change. Cada ponto representa um gene, sendo que os destacados em azul são significativamente alterados (B). As cores indicam variações na expressão gênica: azul representa redução, enquanto vermelho indica aumento na expressão.

Figura 8. Gráfico de circosplot mostrando a interação entre os miRNAs diferencialmente e seus alvos preditos que foram identificados no transcriptoma, note que os miRNAs e mRNAs apresentam sentidos opostos de expressão.

Figura 9. Diagrama de Venn entre os miRNAs diferencialmente expressos de amostras de ratos jovens submetidos a RPM e de pacientes acometidos com CaP disponível no The Cancer Genome Atlas (A). Padrão de expressão dos miRNAs em comum (B). miRNAs diferencialmente expressos em comum entre os datasets e evolutivamente conservados geneticamente (C).

Figura 10. Análise de enriquecimento funcional dos alvos preditos do miRNA-184. O gráfico apresenta as vias enriquecidas, categorizadas em diferentes clusters.

Figura 11. Gráfico oncoprint representando os estudos de origem que evidenciam a desregulação dos genes-alvo regulados pelo miRNA-184. As alterações genéticas incluem mutações missense e truncantes, variantes estruturais, amplificações e deleções, além da expressão diferencial de mRNA (alta e baixa).

Figura 12. Curva de Kaplan-Meier representando a probabilidade de sobrevivência global em meses para os grupos com e sem alterações nos genes-alvo regulados pelo miRNA-184.

Figura 13. Gráficos de barras representativos da expressão gênica de mRNA alvos selecionados para validação *in vivo*. Não houve diferença significativa entre o grupo CTR e GLLP na expressão de ambos os genes.

Figura 14. Gráfico de barra representativo da expressão gênica do miRNA-184 em experimentos de transfecção celular em diferentes concentrações. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais.

Figura 15. Imagem em microscopia confocal de lâminas de matriz extracelular produzidas por CAFs. Imunofluorescência para fibronectina, a fim de avaliar a espessura e alinhamento das fibras nos grupos CTR (AZ Parental), tratado com inibidor de TGF- β (TGF- β INH) e linhagem com knockdown para colágeno VI (COL6A2 KD NT).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das dietas oferecidas aos animais durante o processo experimental.

Tabela 2. Alvos preditos do miR-184 e que estão desregulados na PV de animais submetidos a RPM.

RESUMO

A abordagem DOHaD (Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença) busca estabelecer a correlação entre a incidência de doenças na vida adulta e no envelhecimento com os eventos ocorridos durante o início do desenvolvimento. Um de seus modelos mais utilizados para estudos de DOHaD é a submissão de roedores à restrição proteica materna (RPM). Estudos experimentais demonstram que essa condição é responsável por inibir o desenvolvimento da próstata e aumentar a incidência de câncer de próstata (CaP) com o envelhecimento. Uma das principais consequências desses eventos são as alterações epigenéticas que acompanham a prole ao longo da vida, como os RNAs não codificantes e os microRNAs. Atualmente, nosso grupo de pesquisa dedica-se a compreender, de maneira global, os mecanismos moleculares e epigenéticos alterados na próstata de animais submetidos à RPM. Com base nos dados de sequenciamento transcriptômico e de small RNA sequencing, foi possível identificar miRNAs diferencialmente expressos (DE) na próstata ventral (PV) de animais submetidos à RPM. Dentre os miRNAs identificados, o miR-184 foi selecionado para validação e caracterização funcional em células prostáticas devido à sua relevância potencial. Os alvos preditos do miR-184 revelaram enriquecimento em vias relacionadas ao processamento de proteínas, sistema imune, metabolismo energético, crescimento celular e resposta hormonal. Além disso, os alvos regulados pelo miR-184 e expressos na PV estavam associados a processos cruciais, como a estabilidade do citoesqueleto e transporte intracelular, desenvolvimento prostático e sinalização hormonal, além de adesão celular e remodelação do citoesqueleto. Alterações genéticas, como amplificações e deleções nesses alvos, também foram observadas, indicando sua relevância potencial no contexto de alterações programadas pela RPM. Esses resultados indicam que períodos críticos do desenvolvimento, como a má nutrição materna, programam alterações epigenéticas e celulares de longo prazo. A desregulação precoce de genes essenciais, modulada pelo miR-184, pode contribuir para a formação de um microambiente prostático vulnerável, favorecendo desordens teciduais e o desenvolvimento de câncer de próstata na vida adulta.

Palavras-chave: câncer, próstata, epigenética, miRNA, DOHaD.

ABSTRACT

The DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) approach seeks to establish a correlation between the incidence of diseases in adulthood and aging with events that occurred during early development. One of the most widely used models for DOHaD studies is the submission of rodents to maternal protein restriction (MPR). Experimental studies demonstrate that this condition is responsible for inhibiting prostate development and increasing the incidence of prostate cancer (PCa) with aging. One of the main consequences of these events are the epigenetic alterations that accompany the offspring throughout life, such as non-coding RNAs and microRNAs. Currently, our research group is dedicated to understanding, in a global way, the molecular and epigenetic mechanisms altered in the prostate of animals subjected to MPR. Based on transcriptomic sequencing and small RNA sequencing data, it was possible to identify differentially expressed (DE) miRNAs in the ventral prostate (VP) of animals subjected to maternal protein restriction (MPR). Among the identified miRNAs, miR-184 was selected for validation and functional characterization in prostate cells due to its potential relevance. The predicted targets of miR-184 revealed enrichment in pathways related to protein processing, immune system, energy metabolism, cell growth and hormonal response. Furthermore, the targets expressed in PV were associated with crucial processes, such as cytoskeletal stability and intracellular transport, prostate development and hormonal signaling, as well as cell adhesion and cytoskeletal remodeling. Genetic alterations, such as amplifications and deletions in these targets, were also observed, indicating their potential relevance in the context of changes programmed by MPR. These results indicate that critical periods of development, such as maternal malnutrition, program long-term epigenetic and cellular alterations. Early dysregulation of essential genes, modulated by miR-184, may contribute to the formation of a vulnerable prostate microenvironment, favoring tissue disorders and the development of prostate cancer in adulthood.

Keywords: cancer, prostate, epigenetics, miRNA, DOHaD.

Sumário

1. ENUNCIADO DA PROBLEMÁTICA	17
1.1 Programação Fetal por Restrição Proteica Materna	18
1.2 Epigenética e Programação Fetal	20
1.3 Aspectos Reprodutivos.....	21
1.4 Próstata.....	22
2. CÂNCER DE PRÓSTATA.....	23
3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA.....	26
4. OBJETIVOS	27
4.1 Objetivos gerais.....	27
4.2 Objetivos específicos.....	27
5. MATERIAIS E MÉTODOS	27
5.1 Animais (etapa prévia)	27
5.2 Análises in silico	29
5.2.1 Identificação dos miRNAs diferencialmente expressos na PV de animais submetidos a RPM....	29
5.2.2 Identificação dos mRNAs diferencialmente expressos na PV de animais submetidos a RPM....	29
5.2.3 Análise de expressão diferencial de miRNAs e mRNAs	30
5.3 Identificação de miRNAs desregulados em pacientes humanos com Câncer de Próstata	30
5.4 Análise de predição de alvos e seleção do miRNA para os estudos funcionais em células prostáticas humana	30
5.5 Associação dos alvos do miRNAs com pacientes com CaP	31
5.6 Eventos genéticos em alvos regulados pelo miRNA-184	31
5.7 Análise estatística.....	31
6. RESULTADOS	32
6.1 Análise dos dados de sequenciamento	32
6.2 Integração com banco de dados de CaP humano	34
6.3 Alvos preditos e desregulados na PV	35
6.4 Enriquecimento de alvos preditos do miRNA-184	36
6.5 Eventos genéticos associados aos alvos	37
6.6 Validação por RT-qPCR	38
7. DISCUSSÃO.....	38
8. REFERÊNCIAS	46
9. DESAFIOS E ADAPTAÇÕES NO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	53
9.1 Morosidade na Importação de Reagentes.....	53
9.2 Contaminações no Laboratório de Cultura Celular	53
9.3 Interrupção por Estágio no Exterior (BEPE/FAPESP)	53

9.4 Dificuldades na Transfecção com o Mimético do miRNA-184.....	53
10. Internacionalização (bolsa estágio de pesquisa no exterior - FAPESP).....	54

1. ENUNCIADO DA PROBLEMÁTICA

Nas últimas décadas, diversos estudos investigaram os impactos do ambiente no desenvolvimento da prole. A literatura mostra a relação entre exposições a fatores adversos como consumo de drogas, alimentação desbalanceada, estresse e doenças metabólicas durante o período intrauterino e/ou a primeira infância e a maior incidência de doenças crônicas não transmissíveis na vida adulta (Justulin *et al.*, 2023; Mericq *et al.*, 2017). Em 1976, Ravelli *et al.* analisaram o impacto da restrição alimentar em filhos de mulheres expostas à escassez alimentar durante o cerco nazi-germânico à Holanda, no final da Segunda Guerra Mundial (1944-1945). Este evento, conhecido como o Inverno da Fome Holandesa, limitou a ingestão diária de alimentos a 400-800 calorias, inclusive para gestantes, e teve consequências duradouras para a saúde das gerações subsequentes.

Anos mais tarde, o epidemiologista inglês David Barker e colaboradores foram pioneiros em descrever a correlação entre condições adversas na gestação e problemas de saúde na vida adulta. Eles investigaram acerca de indivíduos das regiões mais pobres da Inglaterra e País de Gales e encontraram uma associação positiva entre a desnutrição infantil e o aumento da mortalidade neonatal, bem como da mortalidade por doenças cardíacas na vida adulta (Barker e Osmond, 1986). No final da década de 1980, os autores demonstraram que recém-nascidos de baixo peso corporal, nascidos entre 1911 e 1930 na região de Hertfordshire, Inglaterra, tinham 2,7 vezes mais a probabilidade de morrer em decorrência de doenças cardíacas em comparação com recém-nascidos de peso adequado para a idade gestacional (Barker *et al.*, 1989). Barker propôs que a restrição de crescimento intrauterino e pós-natal poderia ser um fator de risco importante para o desenvolvimento de hipertensão e doenças cardíacas, originando a chamada Hipótese de Barker, ou “origens fetais da saúde e da doença” (FOAD, do inglês *Fetal Origins of Adult Disease*). Segundo esta hipótese, condições adversas durante períodos críticos do desenvolvimento, como restrições nutricionais e outros fatores de estresse, podem impactar a estrutura e o funcionamento de órgãos e sistemas no corpo (Barker *et al.*, 1990), conceito que posteriormente passou a ser conhecido como Programação Fetal (PF) (LUCAS, 1991).

A relevância desse conceito no campo da saúde despertou grande interesse na comunidade científica e incentivou a criação da sociedade internacional *Developmental Origins of Health and Disease* (DOHaD). Essa sociedade reúne instituições de pesquisa e políticas públicas na Europa, América do Norte, regiões do Pacífico e países em desenvolvimento, como o Brasil (Schulz, 2010), que buscam entender a correlação entre os mais diversos tipos de fatores que impactam no desenvolvimento e na saúde. Enquanto FOAD se concentrava nos efeitos na prole

relacionados a condições parentais durante a gestação, o DOHaD abrange uma maior janela de susceptibilidade/oportunidade, desde o desenvolvimento dos gametas até a primeira infância, e que irão impactar na saúde adulta e no envelhecimento.

1.1 Programação Fetal por Restrição Proteica Materna

A restrição proteica materna (RPM) em ratas durante a gestação e/ou lactação é um modelo experimental frequentemente utilizado em investigações sobre PF (Jahan-Mihan *et al.*, 2015; Langley-Evans *et al.*, 1994, 2020). Nesse contexto, pesquisas têm evidenciado a relação entre a RPM durante a gestação e o baixo peso ao nascimento da prole (Colombelli *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2019), além de provocar alterações na composição do leite materno (Bautista *et al.*, 2019). Indivíduos com baixo peso e tamanho ao nascimento apresentam um crescimento pós-natal acelerado (catch-up growth), e por volta do DPN 70 recuperam os parâmetros biométricos a níveis equivalente ao grupo controle. Contudo, a literatura demonstra que o catch-up growth está associado a maior probabilidade de desenvolver resistência à insulina e diabetes tipo 2 na vida adulta (Berends *et al.*, 2013, 2018), maior sensibilidade em relação a pressão arterial pela ingestão de sal e aumento na incidência de acidente vascular cerebral em ratas hipertensas (Otani *et al.*, 2004), afeta o metabolismo energético (Rees, 2019) e impacta negativamente a resposta do organismo a condições adversas (Martins *et al.*, 2018). A RPM se apresenta como um fator importante para o desenvolvimento de síndromes metabólicas na prole ao longo de sua vida (Jahan-Mihan *et al.*, 2015).

Além das modificações no metabolismo, a RPM provoca efeitos específicos em diferentes órgãos. No fígado, há uma diminuição na proliferação celular e alterações no padrão de expressão gênica dos hepatócitos, assim como mudanças no perfil antioxidante (Campisano *et al.*, 2017; Martin *et al.*, 2018; Ramadan *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2024). O pâncreas apresenta uma redução no número de células β e na secreção de insulina (Alejandro *et al.*, 2019; Sosa *et al.*, 2023). Em relação ao sistema nervoso central, a RPM altera a estrutura, a bioquímica e a quantidade de neurônios no cérebro (Gould *et al.*, 2018). No sistema renal, observa-se uma diminuição do número de néfrons ao longo da vida (Rizzi *et al.*, 2017), enquanto no sistema respiratório, há uma redução no número de alvéolos pulmonares, diminuição da vascularização, alterações na produção de surfactante, e impactos na ação de metaloproteinases de matriz, além de modificações no perfil proteômico pulmonar tanto no início da vida quanto no envelhecimento, afetando a estrutura dos pulmões, a ação antioxidante e o sistema imunológico (Liu *et al.*, 2014; Khazaei *et al.*, 2019; Fioretto *et al.*, 2024). No sistema reprodutor, pesquisas recentes relataram diversos impactos da RPM, como a redução da distância ano-genital na prole masculina (Santos *et al.*, 2019), diminuição da taxa de fertilidade e alterações no início da

puberdade (Zambrano *et al.*, 2014), além de redução do peso testicular, desorganização celular dos túbulos seminíferos, diminuição da expressão do receptor de andrógeno nos testículos e comprometimento da espermatogênese (Rodríguez-González *et al.*, 2012a, 2012b, 2014). Também foram observadas alterações morfológicas e estereológicas no epidídimo (Cavariani *et al.*, 2019; Santos, T. de M. *et al.*, 2019) e modificações na próstata (Colombelli *et al.*, 2017; Portela *et al.*, 2021; Santos *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2019).

Também vale ressaltar que a PF não é um ultimato para a saúde do indivíduo ao longo da vida, e ainda pode servir como uma janela de oportunidade de ação na prevenção de problemáticas na saúde (Falcão-Tebas *et al.*, 2020; Nobile *et al.*, 2022; Ren *et al.*, 2024).

Dessa forma, a RPM se destaca como um modelo eficaz para investigar os efeitos de insultos nutricionais precoces sobre a saúde a longo prazo, com evidências substanciais de que condições adversas durante a gestação e lactação desempenham um papel crítico na programação fetal. Esses estudos demonstram que a RPM não apenas afeta o desenvolvimento estrutural e funcional de diversos sistemas — incluindo os metabólico, hepático, renal, respiratório, nervoso e reprodutivo —, mas também compromete a capacidade do organismo de responder adequadamente a desafios ambientais ao longo da vida (Figura 1).

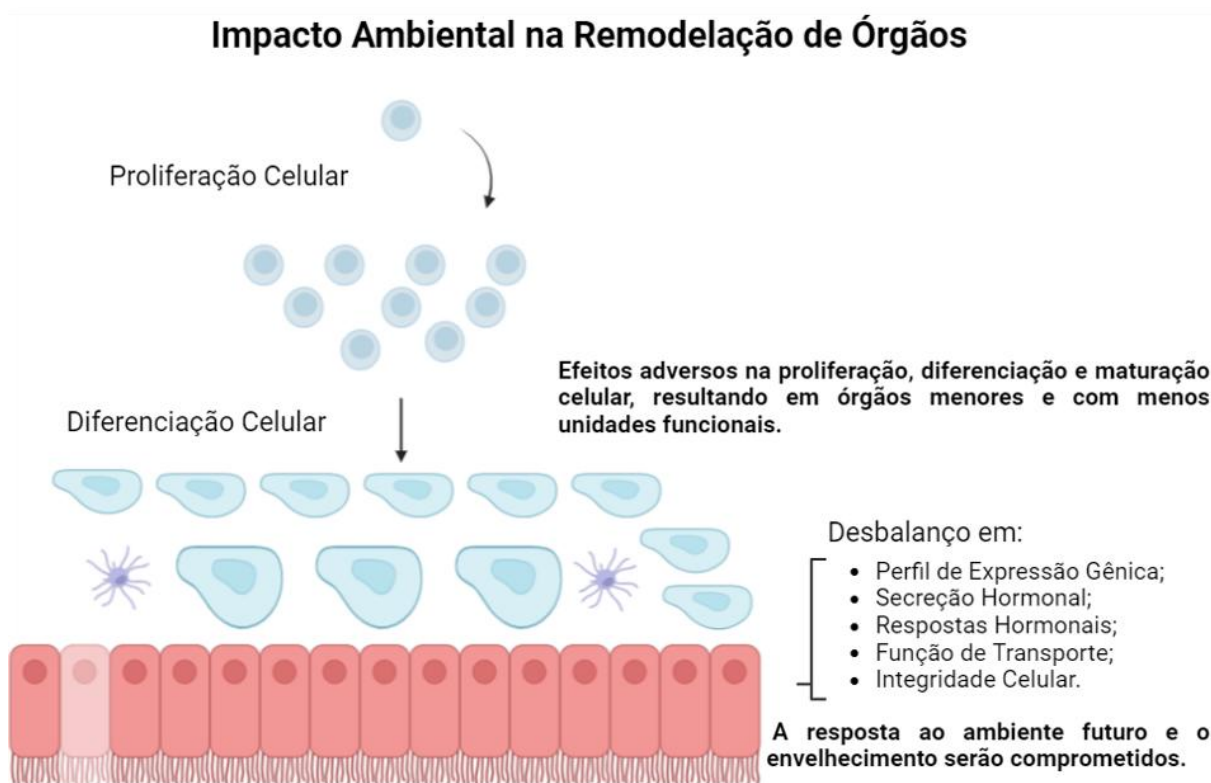


Figura 1. Impacto do ambiente na remodelação tecidual. Sob condições ambientais adversas, mudanças no perfil de expressão gênica, desbalanço na secreção hormonal e comprometimento da integridade celular são observadas. Efeitos cascata incluem redução na proliferação e diferenciação celular, resultando em órgãos com menor número de unidades funcionais e gerando consequências a longo prazo, como resposta prejudicada a estímulos ambientais e aceleração de disfunções associadas ao envelhecimento. Adaptado de Langley-Evans, 2020.

1.2 Epigenética e Programação Fetal

O termo "epigenética" foi introduzido por Waddington, em 1942, para descrever as interações entre genes e o ambiente que moldam o desenvolvimento de um fenótipo. Desde então, o conceito evoluiu e passou a ser definido como alterações reversíveis e herdáveis no genoma que modulam a expressão gênica e o fenótipo celular, sem alterar a sequência primária de nucleotídeos do DNA (Deans e Maggert, 2015; Fernandez-Twinn *et al.*, 2015). Os principais mecanismos epigenéticos incluem a metilação do DNA, realizada pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMTs); as modificações pós-traducionais de histonas, promovidas por enzimas como histona acetiltransferase (HAT) e histona desacetilase (HDAC) ocasionando em regulação pré-transcricional; e a regulação mediada por RNAs não codificantes. Entre esses, os microRNAs (miRNAs) se destacam como reguladores epigenéticos cruciais da expressão gênica, desempenhando papéis centrais na modulação de processos celulares e fenotípicos (Allis e Jenuwein, 2016; Heerwagen *et al.*, 2010).

Os miRNAs são uma classe de pequenos RNAs não codificantes, com cerca de 18-25 nucleotídeos, que desempenham um papel crucial na regulação pós-transcricional da expressão gênica. Eles atuam ao se ligarem a sequências complementares em moléculas de mRNA, predominantemente na região 3'UTR, levando à repressão da tradução ou à degradação do mRNA-alvo (Winter *et al.*, 2009), como representado na Figura 2. Essa regulação fina é essencial para diversos processos biológicos, como desenvolvimento, diferenciação celular, apoptose e proliferação celular (Bartel, 2004; He e Hannon, 2004).

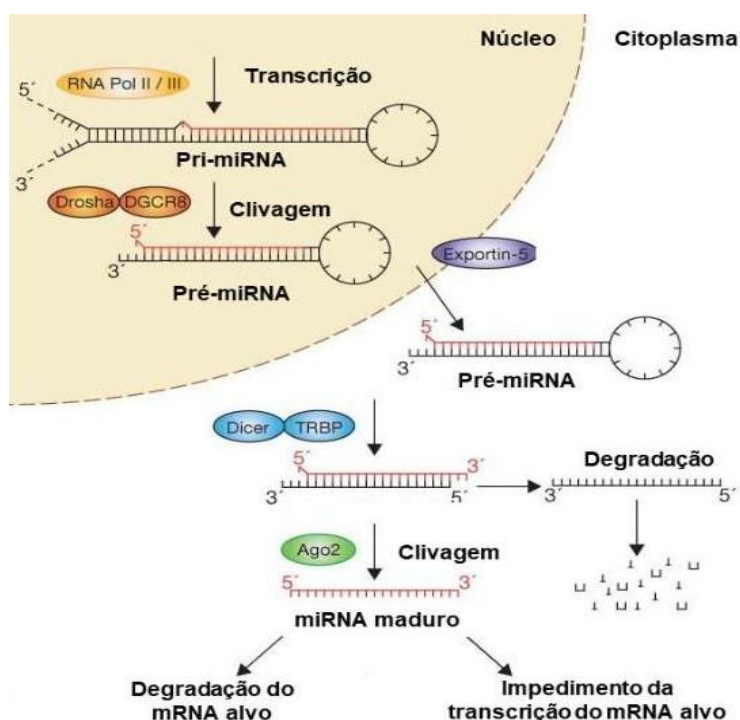


Figura 2. Esquema representativo da biogênese e mecanismos de atuação do miRNA. Transcrição do gene de miRNA em pré-miRNA, seguida de clivagem por Drosha/DGCR8 para gerar pré-miRNA. Exportação para o citoplasma e clivagem por Dicer, em associação com TRBP, resultando em miRNA maduro carregado no complexo RISC (Ago2). Degradação do mRNA alvo (complementaridade perfeita) ou repressão traducional (complementaridade parcial). Adaptada de WINTER *et al.*, 2009.

Estudos tem demonstrado que os miRNAs desempenham um papel central na carcinogênese e na progressão tumoral, o que levou à classificação de muitos deles como OncoMiRs ou miRNAs oncogênicos. Esses miRNAs atuam promovendo a tumorigênese por meio da regulação negativa de genes supressores de tumor ou da regulação positiva de oncogenes (Calin e Croce, 2006; Esquela-Kerscher e Slack, 2006). Por outro lado, alguns miRNAs também são considerados miRNAs supressores de tumor, pois inibem oncogenes e reduzem o crescimento tumoral. Além disso, alterações na expressão de miRNAs estão associadas a eventos epigenéticos, mutações genômicas, amplificações ou deleções cromossômicas, que ocorrem durante a progressão do câncer. A desregulação dos miRNAs tem sido correlacionada com aspectos específicos da biologia tumoral, como invasão, angiogênese, resistência a tratamentos e adaptação metabólica (Peng e Croce, 2016).

Compreender e elucidar os mecanismos epigenéticos representa um dos principais desafios para entender as respostas fenotípicas relacionadas ao DOHaD (Goyal *et al.*, 2019; Wadhwa *et al.*, 2009). Embora esses mecanismos sejam amplamente explorados no contexto do desenvolvimento embrionário e da carcinogênese, os dados associados ao DOHaD e à RPM ainda são limitados. Essa carência de estudos torna-se especialmente relevante, considerando que a janela de programação torna o embrião e o feto suscetíveis a uma variedade de influências, como a nutrição materna e a exposição a toxinas ambientais, que impactam os níveis de expressão gênica, a metilação de regiões promotoras no DNA e a expressão de microRNAs (Heerwagen *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2017; Keleher *et al.*, 2018; Scarano *et al.*, 2019).

1.3 Aspectos Reprodutivos

A maior parte dos estudos sobre PF tem focado predominantemente em alterações metabólicas, enquanto investigações sobre as funções reprodutivas em animais submetidos à RPM permanecem limitadas. Além disso, devido aos desafios hormonais e de outras naturezas, a maioria das pesquisas concentra-se nos efeitos na prole masculina, com uma escassez ainda maior de estudos que avaliem as fêmeas. Essa disparidade evidencia uma lacuna significativa a ser preenchida no conhecimento produzido sobre as diferenças entre os sexos no contexto da PF.

Na prole feminina submetida a RPM, estudos apontam baixas reservas ovarianas (Winship *et al.*, 2018), além de alterações na expressão de leptina, aromatase e receptores de gonadotropinas, comprometendo o desenvolvimento folicular (Silva Faria, da *et al.*, 2010), o qual também leva à redução do número de folículos primordiais e prejuízos na comunicação celular ovariana (Zhao *et al.*, 2024).

Estudos com prole masculina de ratos submetidos à RPM demonstram a redução da distância ano-genital (DAG) ao nascimento, um marcador de diferenciação sexual relacionado à exposição intrauterina a andrógenos (Colombelli *et al.*, 2017; Rinaldi *et al.*, 2013). Também foram observadas alterações como atraso na instalação da puberdade (Weissenbruch, van *et al.*, 2005), redução da fertilidade (Marcelly De Souza Santos *et al.*, 2004; Zambrano *et al.*, 2005) e variações nos níveis séricos de testosterona em diferentes períodos: pós-natal (Colombelli *et al.*, 2017; Rodríguez-González *et al.*, 2012b), puberdade (Zambrano *et al.*, 2005), fase adulta (Rodríguez-González *et al.*, 2012b, 2014) e envelhecimento (Portela *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2019; 2020). Esses efeitos reprodutivos incluem ainda uma redução na contagem de espermatozoides e na fertilidade no DPN 270, atribuída à diminuição no número de células de Sertoli e à desorganização dos túbulos seminíferos (Zambrano *et al.*, 2005). Outros fatores que podem contribuir incluem alterações na proliferação e maturação das células germinativas, aumento do estresse oxidativo e redução das defesas antioxidantes nos testículos e esperma (Bautista *et al.*, 2017; Rodríguez-González *et al.*, 2012b, 2014). Além disso, o epidídimo apresenta redução no peso, na vascularização e na maturação dos ductos (Cavariani *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2004).

Esses dados científicos reforçam que a RPM afeta diretamente não apenas a morfogênese, mas também a função dos órgãos reprodutivos em idade reprodutiva e compromete a capacidade reprodutiva durante a idade adulta (Rodríguez-González *et al.*, 2014).

1.4 Próstata

A próstata é uma glândula exócrina acessória do sistema reprodutor masculino, cujo desenvolvimento e homeostase são regulados pelos andrógenos (Cunha *et al.*, 1985; 2018). Essa glândula fica localizada ao entorno da uretra, logo abaixo da bexiga, e secreta um fluido proteolítico complexo, composto por fosfatase ácida, ácido cítrico, fibrinolisinase, enzimas específicas e outros elementos que compõem o fluido seminal (Marker *et al.*, 2003). Essa secreção desempenha um papel crucial no sucesso reprodutivo, pois liquefaz o ejaculado, fornece nutrientes e enzimas, e cria gradientes iônicos que alcalinizam o canal vaginal, favorecendo a motilidade espermática (Wernert *et al.*, 1990).

O desenvolvimento da próstata em humanos inicia-se por volta da 10ª semana gestacional, enquanto em roedores ocorre nos dias 17 (camundongos) e 18 (ratos) do desenvolvimento embrionário (Cunha *et al.*, 1987, 2018). Esse processo segue um padrão conservado conhecido como morfogênese de ramificação, em que brotos epiteliais surgem do seio urogenital (SUG) e se estendem para o mesênquima circundante (Francis e Swain, 2018; Thomson, 2008). Em ambas as espécies, a maturação prostática é completada na puberdade (Marker *et al.*, 2003). O desenvolvimento inicial da próstata é impulsionado pela produção de testosterona pelas células de Leydig fetais, acompanhada de um pico hormonal no 15º dia gestacional (Cunha *et al.*, 2018; Timms, 2008). Esse aumento nos níveis de testosterona ativa receptores de andrógeno (AR) em regiões específicas do epitélio do SUG, iniciando mudanças intracelulares que determinam as células precursoras da próstata a formação dos brotos e lobos prostáticos (Prins e Putz, 2008; Scarano *et al.*, 2018; Toivanen e Shen, 2017).

Em roedores, o crescimento, ramificação e canalização dos ductos prostáticos ocorrem após o nascimento, enquanto em humanos, esses eventos ocorrem grande parte *in útero* (Cunha *et al.*, 1987; Prins e Putz, 2008; Zhu *et al.*, 2007). A citodiferenciação prostática, etapa final do desenvolvimento, ocorre com o reinício de picos hormonais durante a puberdade, culminando na maturação funcional e estrutural da glândula (Cunha *et al.*, 2018; Francis e Swain, 2018; Marker *et al.*, 2003; Prins e Putz, 2008), conforme representado na Figura 3.

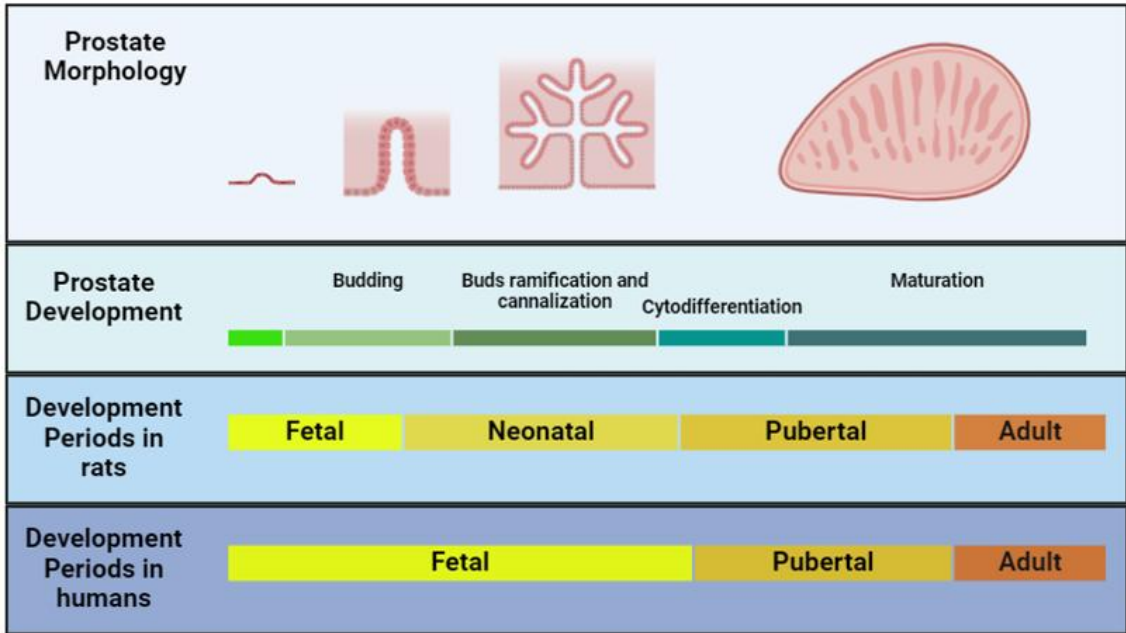


Figura 3. Desenvolvimento prostático em ratos e humanos, destacando semelhanças e diferenças na morfogênese de ramificação nos diferentes estágios. Períodos do desenvolvimento: Fetal, neonatal, puberal e adulto. Processos-chave: brotamento (budding), ramificação e canalização, citodiferenciação e maturação. Adaptado de Prins e Putz, 2008.

2. Câncer de Próstata

A próstata é amplamente estudada na área médico-científica devido à alta prevalência de patologias relacionadas, destacando-se a Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) e o câncer de próstata (CaP) (Banerjee *et al.*, 2018). Segundo estatísticas da *Global Cancer Observatory* de 2022, o CaP é o terceiro tipo de câncer mais frequente entre as pessoas com próstata no mundo, superado apenas pelo de pulmão e o colorretal, além de representar a oitava principal causa de morte por câncer em indivíduos do sexo masculino. Estatísticas de 2023 mostram cerca de 1.467,854 novos casos, sendo a maioria em países desenvolvidos e em pessoas acima de 65 anos (Bray *et al.*, 2018; GLOBOCAN, 2022).

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou 65.840 novos casos de CaP em 2020 e projeta um aumento para 71.730 novos diagnósticos no período trienal de 2023 a 2025. Ainda em 2020, 15.841 óbitos por câncer de próstata foram registrados, sendo equivalente a 15,30 mortes a cada 100 pessoas com próstata (INCA, 2020; 2023). A Figura 4 ilustra esses números, que reforçam a necessidade de estratégias eficazes de rastreamento, prevenção e tratamento para mitigar os impactos dessa doença, que permanece sendo uma das principais preocupações relacionadas ao câncer no contexto global e nacional.

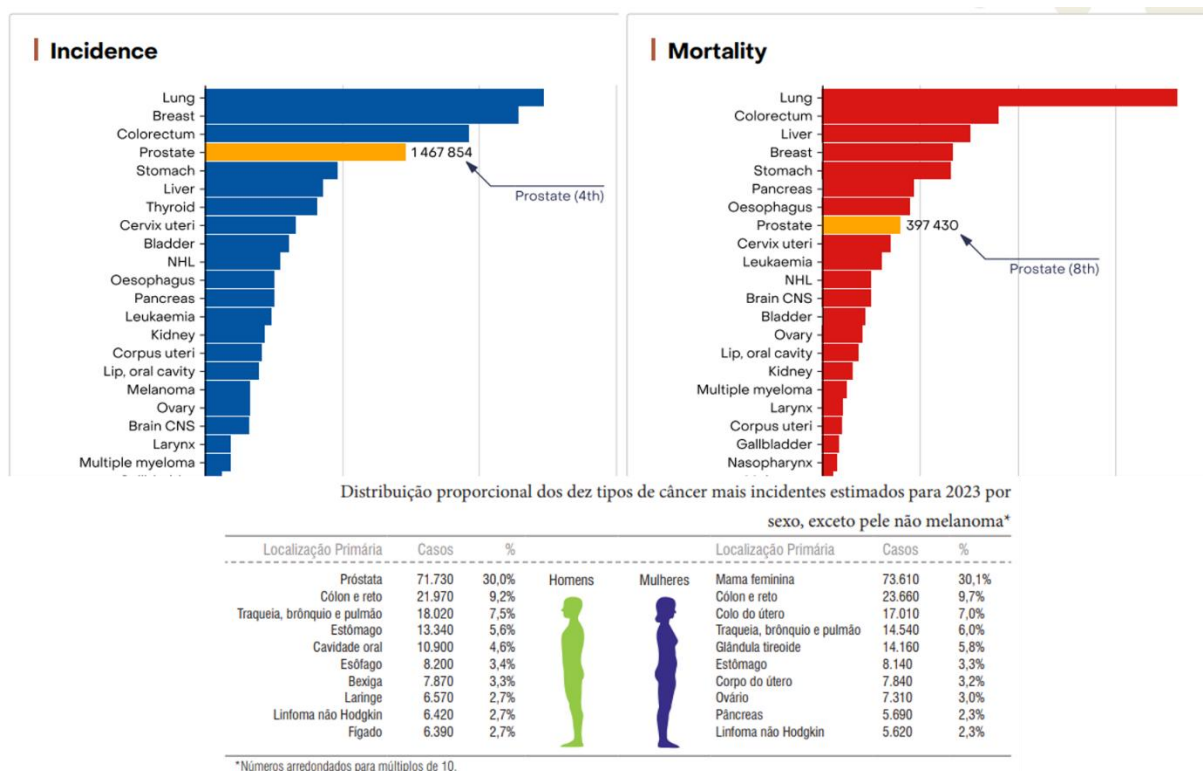


Figura 4. Dados epidemiológicos sobre incidência e mortalidade do câncer no mundo e no Brasil. O câncer de próstata é o terceiro mais incidente no mundo e primeiro no Brasil, sendo o oitavo mais letal em pessoas com próstata no mundo.

Nos últimos anos, estudos de nosso grupo investigaram os efeitos da RPM no desenvolvimento prostático e suas consequências ao longo do envelhecimento. Colombelli *et al.* (2017) relataram que a próstata ventral (PV) de ratos submetidos à RPM durante a gestação

e/ou lactação apresentava redução no tamanho dos ácinos glandulares, na angiogênese prostática e nos níveis séricos de testosterona e IGF-1 nos DPNs 10 e 21, indicando atraso no desenvolvimento glandular. Em idade avançada, Santos *et al.* (2019; 2020) observaram maior incidência de lesões prostáticas no DPN 540, como displasia epitelial, neoplasia intraepitelial prostática (PIN) e carcinoma *in situ*, associadas a um estado de estrogenização caracterizado por aumento dos níveis de estrógeno materno e da prole no DPN 21 e pela elevação da proporção estrógeno/testosterona no DPN 540. Além disso, Santos *et al.* (2020) identificaram alterações no perfil proteômico da próstata, com enriquecimento de vias moleculares ligadas à sinalização estrogênica, funções do retículo endoplasmático e metabolismo energético. Portela *et al.* (2020) demonstraram, no DPN 540, aumento do estresse oxidativo intraprostático e desregulação de biomarcadores associados ao CaP. Mais recentemente, Fioretto *et al.*, (2024) demonstraram aumento de células imunes associado à RPM, agravado pelo consumo pós-natal de açúcar, enquanto Mattos *et al.* (2025, em revisão – no prelo) reportaram alterações estereológicas, inflamatórias e de estresse oxidativo no lobo dorsolateral prostático.

Apesar desses avanços, a compreensão mecanística do fenômeno ainda exigia mais investigações a níveis epigenéticos, incluindo um olhar mais aprofundado da relação entre a desregulação de microRNAs em estágios iniciais da vida e no CaP. Quando olhamos para os mecanismos epigenéticos envolvidos na carcinogênese, estudos demonstram que o estrógeno pode modular a expressão de miRNAs que participam da regulação da carcinogênese, especialmente em cânceres hormônio-dependentes, como os de mama e próstata. Um exemplo notável é o miR-21, frequentemente superexpresso nesses tipos de câncer, onde está associado ao crescimento tumoral, resistência à apoptose e à eficácia dos tratamentos (Ribas *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2014). Em células tumorais de mama e próstata tratadas com hormônios, observou-se a desregulação de miRNAs envolvidos no controle do crescimento e da proliferação celular (Bhat-Nakshatri *et al.*, 2009; Nakamura *et al.*, 2020).

No contexto do DOHaD, Scarano e colaboradores (2019) expuseram ratas prenhes a ftalatos — moléculas que mimetizam a ação do estrógeno — em concentrações ambientais e tóxicas, e observaram a modulação do miRNA-184 na PV, além do aumento da expressão desse mesmo miRNA em células prostáticas tratadas com ftalatos (Cavalca *et al.*, 2022).

Buscando se aprofundar nos mecanismos envolvidos na carcinogênese e no desenvolvimento prostático associados a RPM, Santos *et al.*, (2022) realizaram o sequenciamento e análises transcriptômicas e de small RNA-seq, relatando alterações na expressão do miR-18a-5p na PV de animais envelhecidos submetidos à RPM. Esse microRNA foi associado a uma rede regulatória envolvendo o P4hb, uma isomerase crucial para o

dobramento proteico no retículo endoplasmático, potencialmente contribuindo para processos carcinogênicos. Em 2023, Portela *et al.* observaram uma correlação negativa entre o miR-206, superexpresso na PV de ratos jovens submetidos à RPM, e receptores estrogênicos, além de aumento da deposição de colágeno na matriz extracelular. Por fim, Baptista *et al.* (2024) identificaram clusters de piRNAs ligados ao envelhecimento e ao CaP associados à RPM.

3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA

Frente as crescentes estatísticas ligadas ao câncer no mundo, a fome e a desnutrição sempre foi um problema recorrente na história da humanidade. Ainda hoje, apesar de todo avanço tecnológico e científico, este continua sendo um grande problema a ser sanado. A Figura 5 ilustra o aumento da fome no Brasil e no mundo nos últimos anos. É importante destacar o alarmante dado da disparidade de sexo na alimentação, sendo o sexo feminino mais atingido pela insegurança alimentar em todos os locais do mundo (OXFAM, 2022; FAO, ONU, 2024).

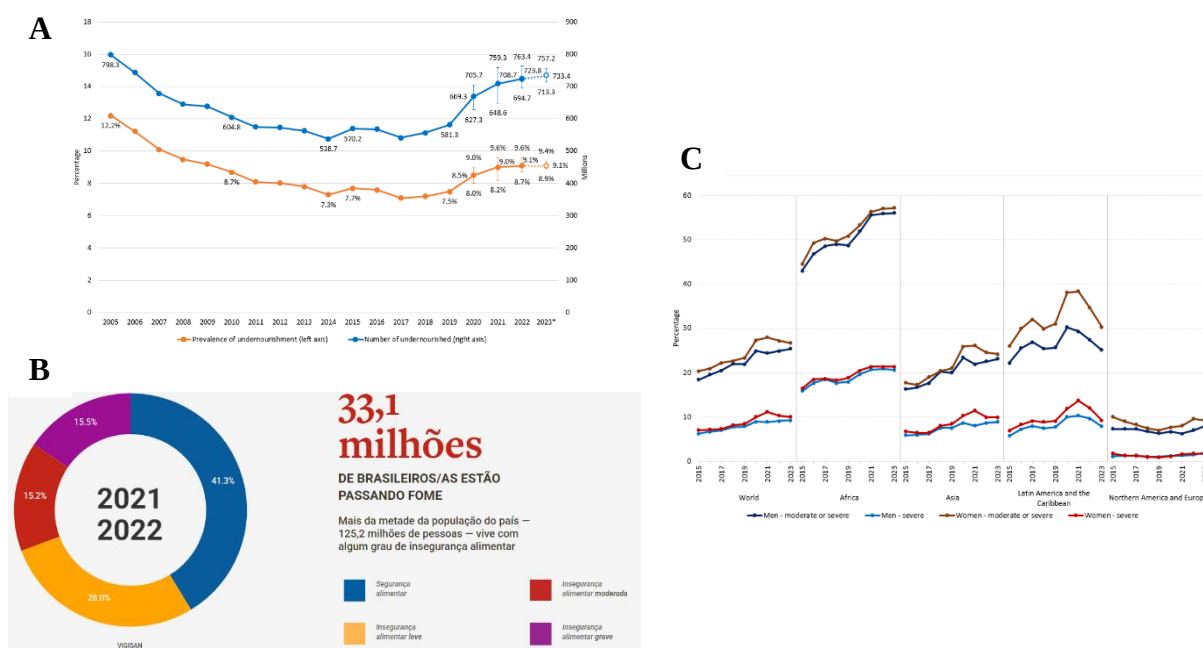


Figura 5. Estatísticas da fome que segue crescendo nos últimos três anos no mundo (A). Estatística demonstrando os níveis de insegurança alimentar no Brasil em 2022 (B). A prevalência da insegurança alimentar manteve-se consistentemente mais elevada entre as mulheres do que entre os homens, a nível mundial e em todas as regiões (C).

Há cerca de 30 anos, William Gardner hipotetizou que - “*The origins of prostatic diseases, including carcinoma, are to be found in the in utero influences upon the developing prostate*”- o CaP teria origem em fatores presentes durante o desenvolvimento embrionário, incluindo influências hormonais e a exposição a fitoestrógenos na dieta materna (Gardner, 1995).

Com o intuito de caracterizar o papel funcional do miR-184, associando-o às origens desenvolvimentistas do câncer de próstata, buscamos associar dados bioinformáticos e

experimentais que, em conjunto com informações epidemiológicas e estatísticas sobre a nutrição materna durante a gestação e lactação, destaquem a importância de políticas públicas focadas na prevenção e no combate ao CaP. Essas políticas devem não apenas priorizar o tratamento da doença, mas também adotar intervenções nutricionais ao longo da vida como uma estratégia preventiva. Apesar de ser um estudo base, seu potencial de translação para dados epidemiológicos reforça a grande relevância e originalidade do estudo, assim como seu potencial de busca por biomarcadores do CaP.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivos gerais

O objetivo desse trabalho foi avaliar o papel da rede de regulação do miR-184 e seus alvos preditos na PV de animais submetidos à RPM no DPN 21, bem como caracterizar o papel funcional desse miRNA em células prostáticas humanas benignas e tumorais, associando-o a origem desenvolvimentista do câncer de próstata.

4.2 Objetivos específicos

- Identificar miRNAs expressos na PV de ratos;
- Avaliar o impacto da RPM na expressão de miRNAs na PV no início da vida;
- Correlacionar os miRNAs diferencialmente na PV de animais submetidos a RPM com os dados de pacientes humanos com CaP;
- Identificar alvos preditos dos miRNAs e correlacionar com o papel metabólico;
- Validar a expressão do miR-184 na PV de animais submetidos a RPM;
- Validar a expressão dos alvos preditos do miR-184 na PV de animais submetidos a RPM;
- Realizar ensaios que mimetizam a expressão do miRNA-184 em células prostáticas benignas (PNT2) e tumorais (LNCaP e PC3);
- Correlacionar o impacto do miR-184 na viabilidade de células benignas (PNT2) e tumorais (LNCaP e PC3);
- Avaliar o impacto do miR-184 no potencial de migração de células prostáticas benignas (PNT2) e tumorais (LNCaP e PC3);

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais (etapa prévia)

Foram utilizados ratos da linhagem Sprague Dawley, com peso entre 250 e 300 g, machos e fêmeas adultos, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. O protocolo N° 5119280121 aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais. Os animais e suas proles foram mantidos no Biotério de Roedores do Setor de Morfologia, em caixas de polietileno, com dois animais por caixa, utilizando substrato de maravalha autoclavada. As condições de manejo incluíam controle de luminosidade e temperatura média de 25°C, além de água filtrada e ração *ad libitum*. Após um período de adaptação, ratas com 3 meses de idade foram colocadas em caixas junto com machos, utilizando o sistema de harém, 3 fêmeas para 1 macho, para o acasalamento. A prenhez foi confirmada por esfregaço vaginal e 24 ratas foram alocadas aleatoriamente em caixas individuais, divididas em dois grupos experimentais: o grupo Controle (CTR, n=12), que recebeu uma dieta padrão com 17% de proteína durante a gestação e lactação, e o grupo de Restrição Proteica Gestacional e Lactacional (GLLP, n=12), que foi alimentado com uma dieta com 6% de proteína durante o mesmo período. Ambas as dietas eram isocalóricas e normossódicas (0,20%), utilizando a ração AIN-93 modificada (Reeves *et al.*, 1993), conforme detalhado na Tabela 1. Imediatamente após o nascimento, foi padronizado o número de filhotes para oito por rata, mantendo uma proporção de 1:1 entre machos e fêmeas (4 machos e 4 fêmeas), a fim de evitar alterações no cuidado materno com a prole. Para a fase experimental, foram selecionados seis filhotes (um macho de cada mãe) que foram eutanasiados no DPN 21. No momento da eutanásia, a PV foi dissecada, coletada, pesada e congelada a - 80°C, até o momento de extração de RNA total para ensaios subsequentes.

Tabela 1. Composição das dietas oferecidas aos animais durante o processo experimental.

Ingredientes	Normoproteica (17 % de proteína g/kg)	Hipoproteica (6 % de proteína g/kg)
Caseína (84% de proteína)	202	71,5
Amido	397	480
Dextrina	130,5	159
Sacarose	100	121
L-cistina	3	1
Fibra pH 101 ou pH 102 (microcelulose)	50	50
Óleo de soja	70	70
Mistura de sais AIN93G**	35	35
Mistura de vitaminas AIN93G**	10	10
Cloridrato de Colina ou Bitartarato de Colina	2,5	2,5

** para reconhecer composição detalhada do mix de sais e vitaminas, consultar (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). A dieta é elaborada pela empresa PragSoluções (PragSoluções, Jaú, SP, Brasil)

337

338 5.2 Análises in silico

339 Os dados de transcriptoma (GSE180674) e small RNA-seq (GSE180673) da PV de animais
 340 no DPN 21 submetidos a RPM utilizados para as análises *in silico* foram obtidos da plataforma
 341 *Gene Expression Omnibus* (GEO), depositadas anteriormente pelo próprio grupo de pesquisa.

342

343 5.2.1 Identificação dos miRNAs diferencialmente expressos na PV de animais 344 submetidos a RPM

345 Foram analisadas 3 amostras do grupo CTR (n=3) e 4 amostras do grupo GLLP (n=4).
 346 Uma vez baixado, os arquivos FASTQ foram pré-processados para a remoção de adaptadores
 347 e filtragem de qualidade, com base no índice de qualidade Phred (≥ 20), utilizando o Cutadapt
 348 e FastQC. As leituras de sequência foram alinhadas ao genoma de *Rattus norvegicus* (versão
 349 Rnor_6.0) usando o alinhador *Spliced Transcripts Alignment to a Reference* (STAR) e espécies
 350 de RNA não codificantes anotadas quantificadas com base em loci genômicos (Capece *et al.*,
 351 2015; Dobin *et al.*, 2013a). Utilizando a plataforma Oasis (<https://oasis.dzne.de>), foram
 352 quantificadas pequenas espécies de RNA não codificantes anotadas, bem como a previsão de
 353 novas moléculas de miRNA usando o algoritmo miRDeep2 (Friedländer *et al.*, 2012).

354

355 5.2.2 Identificação dos mRNAs diferencialmente expressos na PV de animais 356 submetidos a RPM

357 Foram analisados os dados transcriptômicos da PV de animais no DPN 21 dos grupos CTR
 358 (n=5) e GLLP (n=4). Esses dados foram extraídos do banco de dados GEO, como arquivos raw
 359 Illumina mRNA-Seq FASTQ. Os dados brutos foram analisados em termos de qualidade de
 360 leitura por meio do software FastQC
 361 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) para avaliar a qualidade das
 362 leituras. Posteriormente, os arquivos foram filtrados para a remoção de sequências adaptadoras
 363 usando o software Trimmomatic (v. 0.36) (Bolger, Lohse e Usadel, 2014). Após o
 364 reprocessamento da qualidade de leitura, as sequências foram alinhadas contra o genoma de
 365 referência de *Rattus norvegicus* (Genome assembly: Rnor_6.0GCA_000001895.4) obtido
 366 através do Ensembl (<http://useast.ensembl.org/index.html>) por meio de o software STAR (v.
 367 2.5.1a) (Dobin *et al.*, 2013b). Os arquivos resultantes foram processados através do software

Feature Counts (Liao *et al.*, 2014) para obter read counts e Cufflinks para obter fragmentos por kilobase de transcrição por milhão (FPKM), para análise de especificidade de agrupamento (Trapnell *et al.*, 2013).

5.2.3 Análise de expressão diferencial de miRNAs e mRNAs

A análise de diferencial de expressão (DE) de miRNAs e mRNAs foi realizada utilizando a linguagem de programação R, por meio do pacote DESeq2 (Love *et al.*, 2014), amplamente utilizado por sua robustez estatística em análises transcriptômicas. Para determinar os genes DE, foram aplicados critérios de seleção que incluíram um $\text{Log}_2 \text{Fold Change}$ (FC) absoluto maior ou igual a $|\pm 0,66|$ e um *False Discovery Rate* (FDR) ajustado maior que 0,05.

5.3 Identificação de miRNAs desregulados em pacientes humanos com Câncer de Próstata

Os dados globais de expressão dos miRNAs nos cânceres de próstata foram adquiridos através do dataset *Prostate Adenocarcinoma* PRAD (n = 550, 52 amostras controle e 498 tumorais) advindos do TCGA e baixados pelo pacote TCGAbiolinks (versão 4.2.0), do Bioconductor em linguagem R (COLAPRICO *et al.*, 2016; MOUNIR *et al.*, 2019). Foram considerados miRNAs diferencialmente expressos (miRNAs DE) down-regulado ou up-regulado com $\leq -1.0 \text{ Log}_2\text{FC} \geq 1.0$, respectivamente, e $\text{FDR} < 0,05$.

5.4 Análise de predição de alvos e seleção do miRNA para os estudos funcionais em células prostáticas humana

A predição de alvos para os miRNAs foi realizada utilizando o miRWalk 3.0 (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>), uma plataforma que permite prever interações entre miRNAs e mRNAs em diversas espécies, neste caso, aplicada a *Rattus norvegicus* (Dweep e Gretz, 2015). Foram considerados como alvos preditos aqueles que apresentaram significância estatística com $p > 0,05$, permitindo uma ampla identificação de possíveis interações regulatórias. Após essa etapa, integramos os dados preditos ao nosso banco de transcriptoma, com o objetivo de cruzar as informações e identificar mRNAs desregulados na PV de nossos modelos experimentais. Nesse cruzamento, priorizamos as interações onde a expressão do miRNA e do mRNA apresentava uma relação inversa, refletindo os mecanismos clássicos de regulação pós-transcricional.

Para selecionar um miRNA para análises subsequentes *in silico*, *in vivo*, e *in vitro*, consideramos os seguintes critérios: (1) desregulação do miRNA na PV dos nossos animais, (2)

desregulação observada em pacientes humanos com CaP, (3) magnitude do Log2FC identificada no RNA-seq, (4) conservação evolutiva do miRNA entre *Rattus norvegicus* e humanos (verificada no banco de dados miRBase, <http://www.mirbase.org/>), e (5) número total de alvos preditos associados ao miRNA em análise. Esses critérios permitiram não apenas a escolha de um candidato relevante para investigação, mas também forneceram uma base translacional robusta para a validação funcional em contextos experimentais.

5.5 Associação dos alvos do miRNAs com pacientes com CaP

Para dar mais informações translacionais no nosso modelo, buscaremos estabelecer a relação entre os alvos dos miRNAs com vias moleculares e o impacto na carcinogênese prostática humana. Os alvos preditos do miR-184 foram usados para a identificação das vias moleculares, componentes celulares, funções moleculares e processos biológicos, tais análises foram realizados através da ferramenta Kobas 3.0 (Ai e Kong, 2018) (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/index.php>), que usa os bancos de dados *Gene Ontology* (GO) (<http://geneontology.org/>) e *Protein Annotation Through Evolutionary Relationship* (PANTHER) (<http://pantherdb.org/>), bem como a análise de vias associadas pelo Kyoto *Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (Kanehisa *et al.*, 2019) (<https://www.genome.jp/kegg/>). Além disso, iremos utilizar o algoritmo do banco de dados Cbioportal (<https://www.cbioportal.org/>) para análise de sobrevida e avaliação de risco em pacientes do conjunto de dados Prostate Adenocarcinoma advindos do *The Cancer Genome Atlas* (PRAD-TCGA). Essa ferramenta nos permite a associação entre a expressão dos marcadores moleculares identificados no carcinoma de próstata in situ com a sobrevida de pacientes com CaP.

5.6 Eventos genéticos em alvos regulados pelo miRNA-184

A ferramenta cBioPortal for Cancer Genomics (<https://www.cbioportal.org/>) foi empregada para a visualização e análise de dados genômicos relacionados ao câncer. Utilizando perfis moleculares dos tecidos, incluindo informações sobre eventos genéticos, epigenéticos, expressão gênica e proteômica (Cerami *et al.*, 2012), a plataforma possibilitou a avaliação de genes desregulados em tumores e as alterações associadas a esses genes nos pacientes com câncer. A análise foi realizada por meio da visualização de dados em OncoPrint, permitindo observar as alterações genéticas

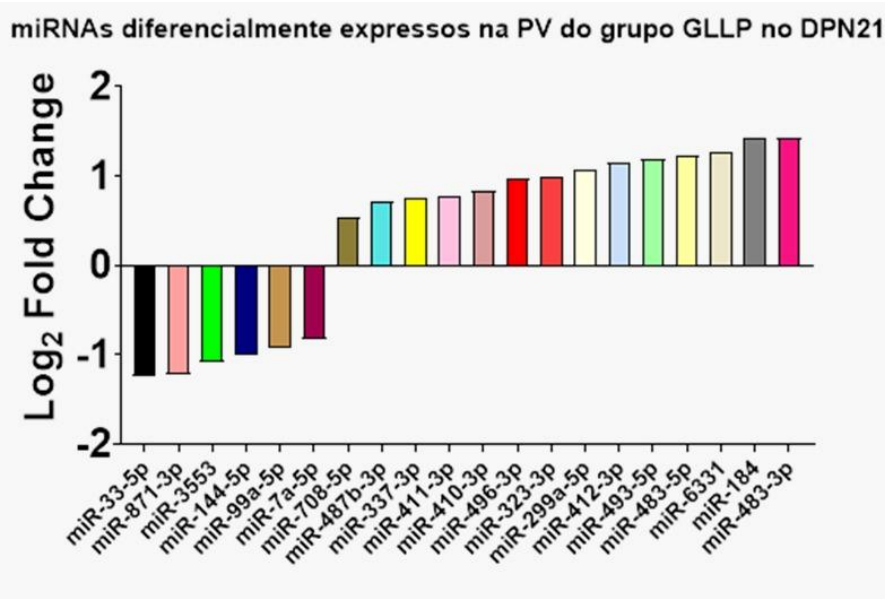
5.7 Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism® (versão 5.00, Graph Pad, Inc., San Diego, CA). Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

6. RESULTADOS

6.1 Análise dos dados de sequenciamento

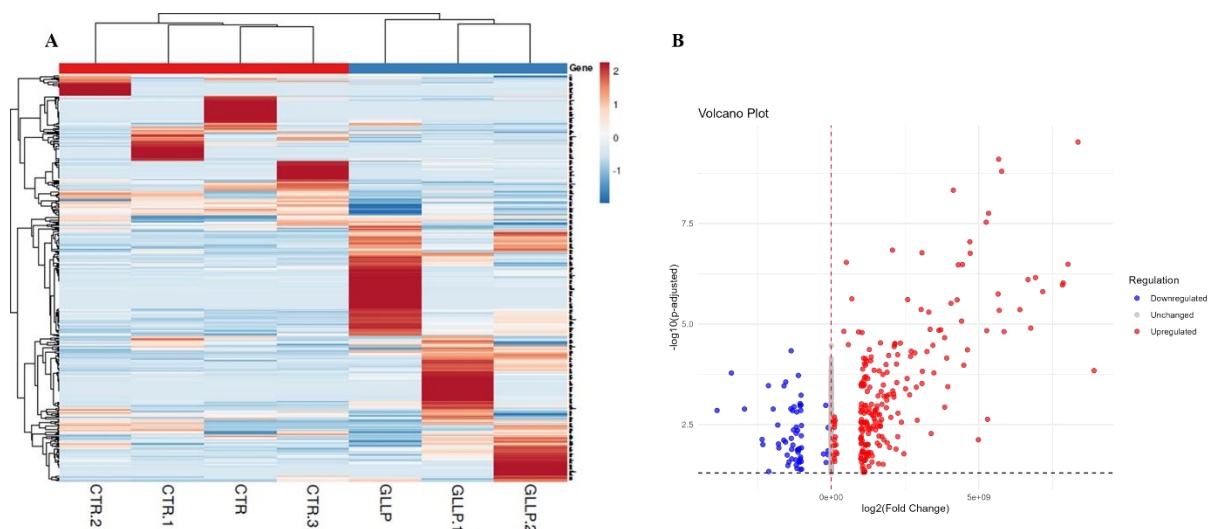
Na análise dos dados de sequenciamento de miRNAs da PV de ratos no DPN 21 submetidos à RPM (GSE180673), foram identificados 20 miRNAs DE. Desses, 6 miRNAs



apresentaram expressão reduzida, enquanto 14 mostraram-se com expressão aumentada. A Figura 6 ilustra esses miRNAs DE, acompanhados de seus respectivos valores de Log2FC.

Figura 6. Gráfico de barras mostrando a expressão dos miRNAs diferencialmente expressos na PV de animais submetidos a RPM no DPN21. Barras negativas representando os downregulados, e positivas representando os upregulados.

450 A análise de dados do transcriptoma revelou a presença de 408 genes diferencialmente
 451 expressos (DEGs). Dentre eles, 86 genes apresentaram expressão reduzida, enquanto 322
 452 exibiram aumento de expressão. A Figura 7 apresenta um *heatmap* que destaca a distribuição
 453 da expressão desses DEGs nas amostras dos dois grupos experimentais, evidenciando clusters
 454 distintos de regulação gênica entre as condições normais e de restrição.



455 **Figura 7.** Heatmap representando os níveis de expressão gênica na PV dos grupos CTR e GLLP. As colunas
 456 representam amostras biológicas, enquanto as linhas correspondem aos genes analisados **(A)**. Volcano Plot
 457 ilustrando a distribuição dos genes com base no Log2 Fold Change. Cada ponto representa um gene, sendo que os
 458 destacados em azul são significativamente alterados **(B)**. As cores indicam variações na expressão gênica: azul
 459 representa redução, enquanto vermelho indica aumento na expressão .

460 A análise de predição identificou 29.363 genes como potenciais alvos preditos para os
 461 20 miRNAs DE. Ao integrar esses dados com os DEGs identificados no estudo, considerando
 462 uma relação de expressão oposta entre miRNAs e mRNAs, observou-se que 19 dos 20 miRNAs
 463 regulavam 73 mRNAs. A interação entre essas moléculas foi representada por meio de uma
 464 rede visual ilustrada na Figura 8, destacando possíveis conexões regulatórias.

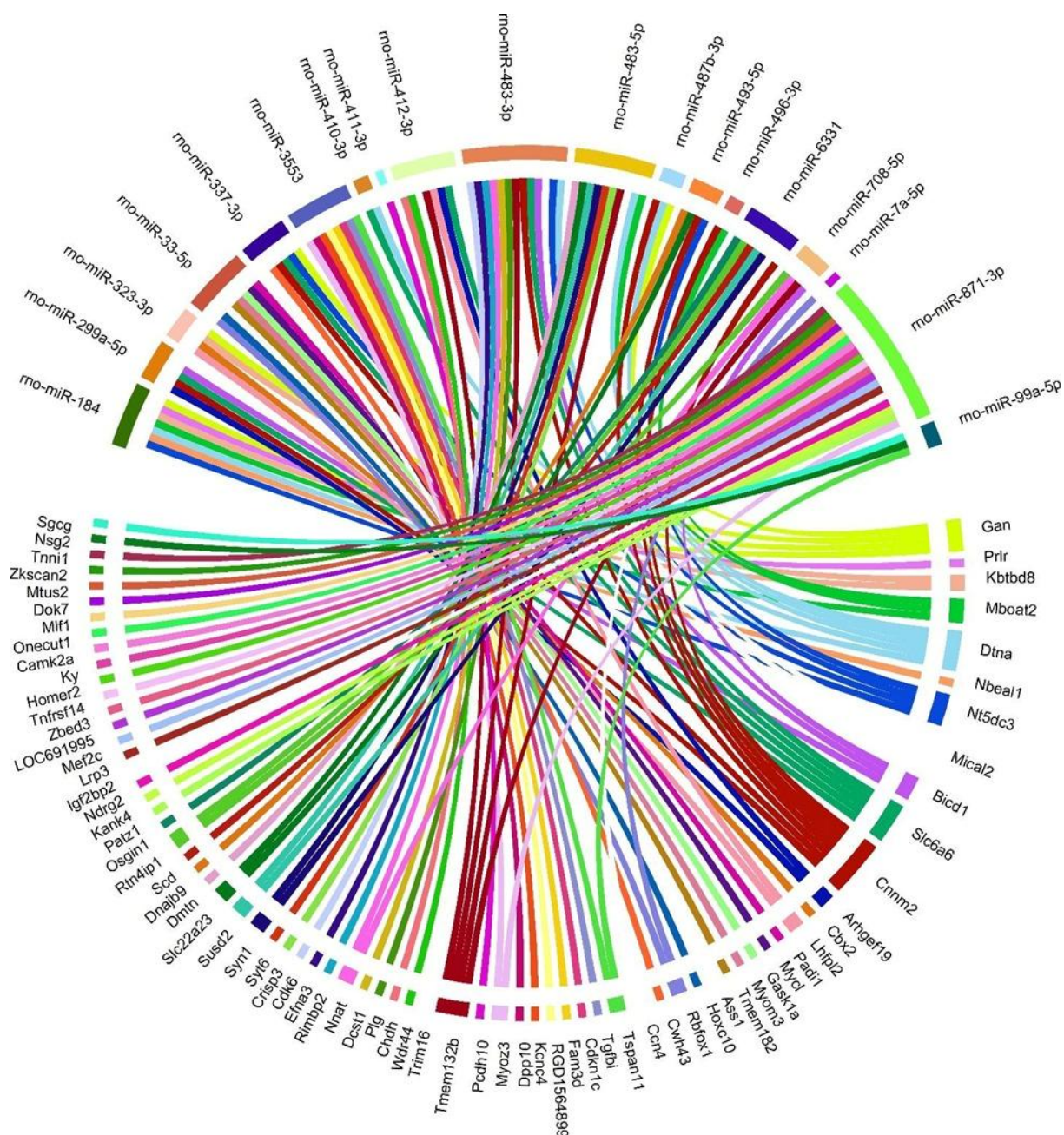


Figura 8. Gráfico de circosplot mostrando a interação entre os miRNAs diferencialmente e seus alvos preditos que foram identificados no transcriptoma, note que os miRNAs e mRNAs apresentam sentidos opostos de expressão.

6.2 Integração com banco de dados de CaP humano

Analisando os datasets de miRNAs em pacientes humanos com CaP, foram identificados 245 miRNAs DE. Ao compará-los com os miRNAs desregulados de nosso estudo, observaram-se 3 miRNAs (miR-184, miR-410-3p e miR-708-5p) comumente desregulados. O miR-184 e o miR-410-3p exibem padrões de expressão opostos no início da vida em relação ao CaP humano, enquanto o miR-708-5p, desde o início da vida, apresenta o mesmo padrão de expressão observado em pacientes com câncer (Figuras 9A e 9B). Ao comparar as sequências dos

miRNAs entre ratos e humanos, verificou-se que essas moléculas possuem sequência conservada entre murinos e humanos (Figura 9C).

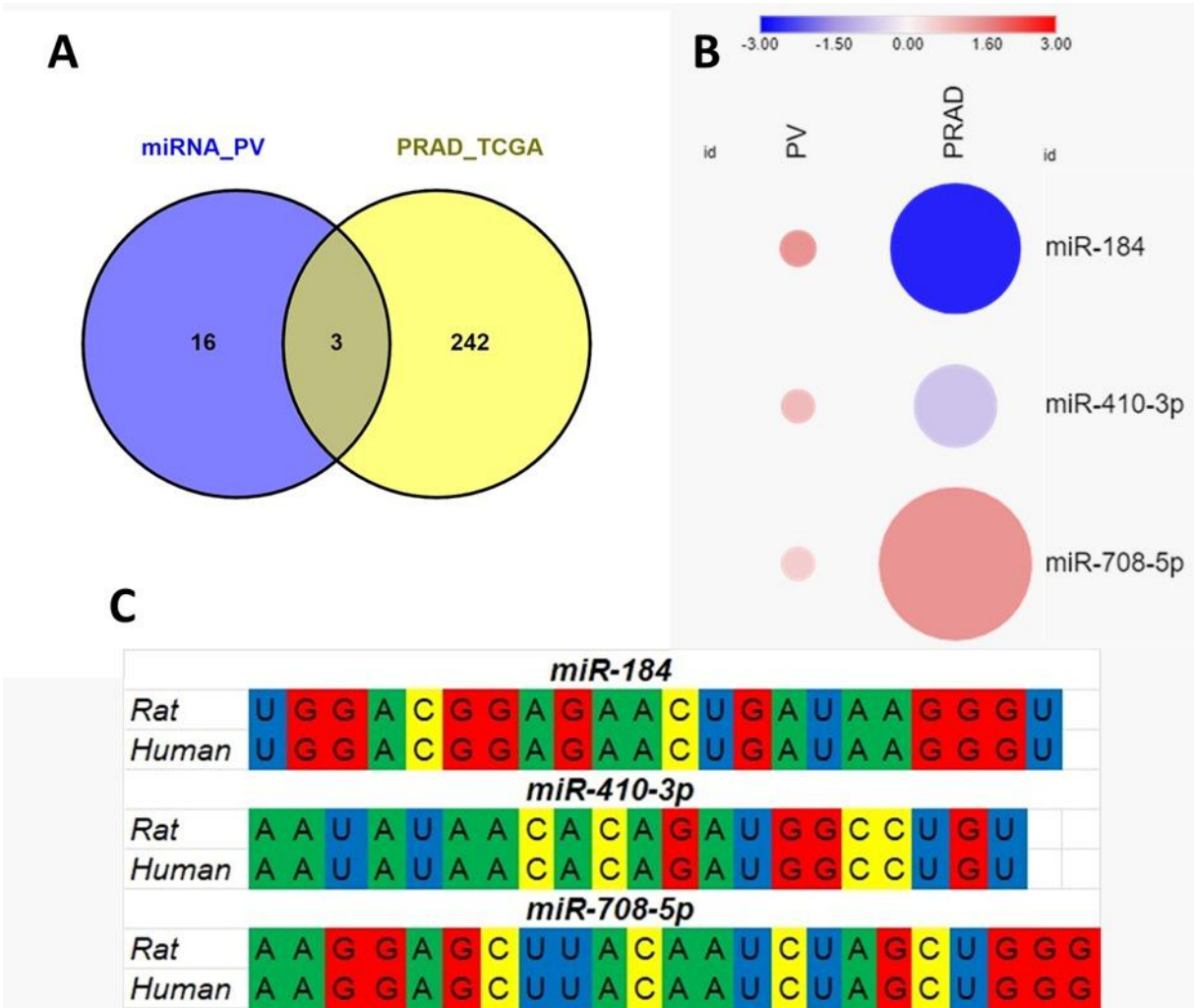


Figura 9. Diagrama de Venn entre os miRNAs diferencialmente expressos de amostras de ratos jovens submetidos a RPM e de pacientes acometidos com CaP disponível no The Cancer Genome Atlas (A). Padrão de expressão dos miRNAs em comum (B). miRNAs diferencialmente expressos em comum entre os datasets e evolutivamente conservados geneticamente (C).

6.3 Alvos preditos e desregulados na PV

A seguinte tabela ilustra oito alvos preditos do miRNA-184 que estão DE na PV de ratos submetidos a RPM.

486 **Tabela 2.** Alvos preditos do miR-184 e que estão desregulados na PV de animais submetidos a RPM

Gene	Fold Change mRNA (Log2)	energy	Name
Gan	-1,121641144	-20.2	<i>Gigaxonin</i>
Prlr	-0,912718309	-21.0	<i>Prolactin Receptor</i>
Kbtbd8	-0,831026536	-18.6	<i>Kelch Repeat and BTB Domain Containing 8</i>
Mboat2	-0,828208787	-18.8	<i>Membrane Bound O-Acyltransferase Domain Containing 2</i>
Dtna	-0,790379919	-23.0	<i>Dystrobrevin Alpha</i>
Nbeal1	-0.76748	-20.1	<i>Neurobeachin Like 1</i>
Nt5dc3	-0.73908	-19.2	<i>5'-Nucleotidase Domain Containing 3 Microtubule Associated</i>
Mical2	-0.7373	-19.7	<i>Monooxygenase, Calponin and LIM Domain Containing 2</i>

487

488 **6.4 Enriquecimento de alvos preditos do miRNA-184**

489 Dentre os miRNAs comumente desregulados e com sequência evolutivamente conservada,
 490 destaca-se o miR-184, cuja expressão está frequentemente reduzida em tecidos tumorais e em
 491 linhagens celulares de câncer de próstata, em comparação com tecidos normais. Com base nisso
 492 e nos estudos com exposição a disruptores endócrinos, selecionamos o miR-184 para prosseguir
 493 com a caracterização.

494 A Figura 10 apresenta as vias moleculares enriquecidas pelos genes alvos do miRNA-184.
 495 sendo o primeiro cluster de vias associados a processamento de proteínas e sistema imune (C1),
 496 um segundo cluster de vias associados ao metabolismo energético, em especial o metabolismo

lipídico (C2), e por último vias associadas ao crescimento e resposta hormonal, principalmente via prolactina (C3).

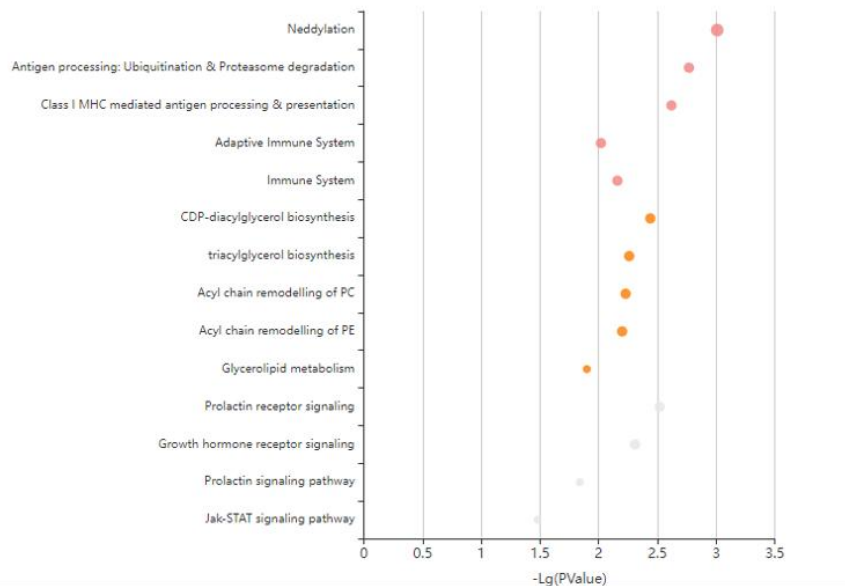


Figura 10. Análise de enriquecimento funcional dos alvos preditos do miRNA-184. O gráfico apresenta as vias enriquecidas, categorizadas em diferentes clusters.

6.5 Eventos genéticos associados aos alvos

Em conjunto, esses genes regulados pelo miR-184 estão desregulados em 411 dos 494 pacientes humanos com CaP, representando 83,2% das amostras do TCGA (Figura 11. A). Os principais eventos associados a esses genes incluem o aumento da expressão gênica, além de fenômenos genômicos de amplificação e deleção. O gráfico de oncoprint gerado representa cada evento e gene separadamente (Figura 11. B).

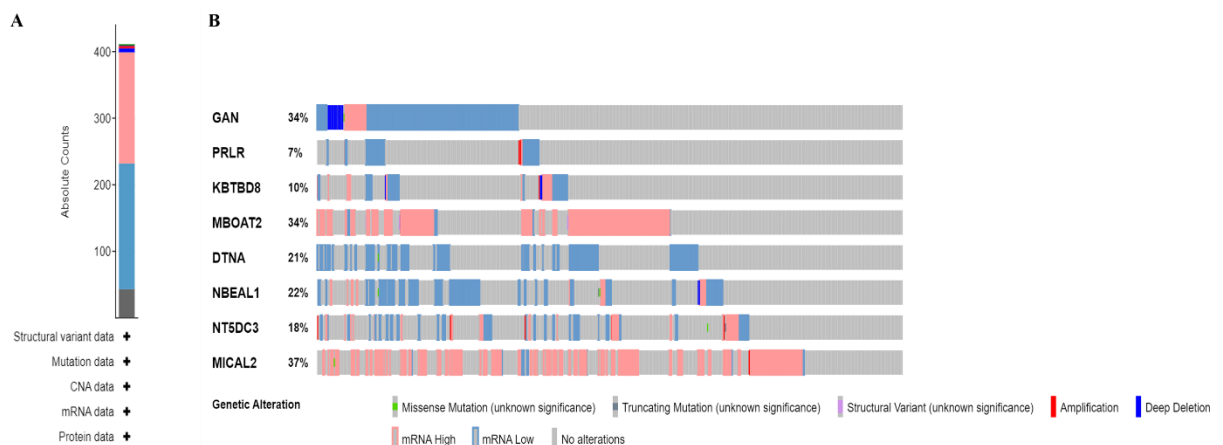


Figura 11. Gráfico oncoprint representando os estudos de origem que evidenciam a desregulação dos genes-alvo regulados pelo miRNA-184. As alterações genéticas incluem mutações missense e truncantes, variantes estruturais, amplificações e deleções, além da expressão diferencial de mRNA (alta e baixa).

O gráfico a seguir (Figura 12) demonstra a taxa de sobrevivência dos pacientes com as alterações acima mencionadas. Apesar de $p\text{-value}=0.309$, a taxa de sobrevivência do grupo com os genes alterados, ao passar do tempo, decai para menos de 70%, enquanto o grupo com os genes não alterados decai para cerca de 85%.

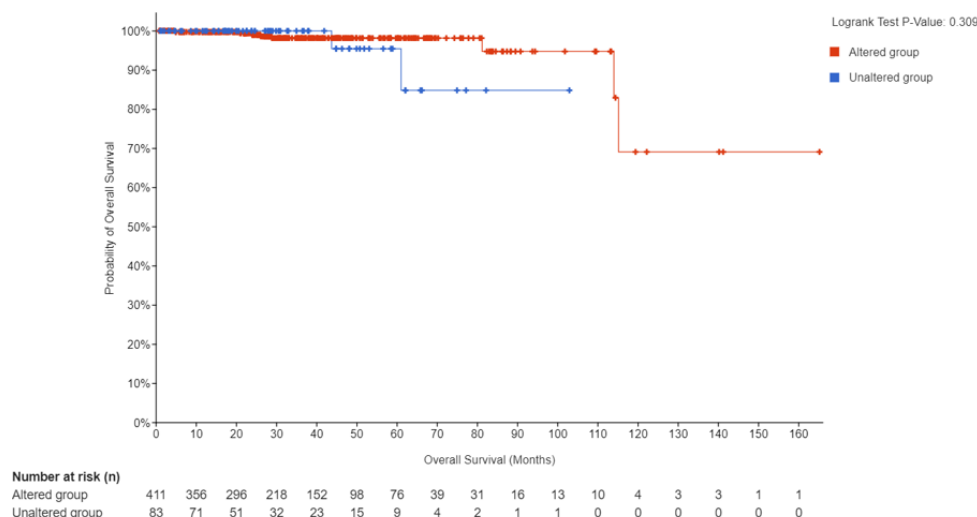


Figura 12. Curva de Kaplan-Meier representando a probabilidade de sobrevivência global em meses para os grupos com e sem alterações nos genes-alvo regulados pelo miRNA-184.

6.6 Validação por RT-qPCR

Os genes *Prlr*, *Nt5dc3* e *Mical2* foram selecionados para terem sua expressão validadas na PV dos animais no DPN 21 submetidos a RPM. Não foi observada diferença significativa na expressão gênica entre os grupos CTR e GLLP em todos dos genes avaliados, conforme demonstrado na Figura 13.

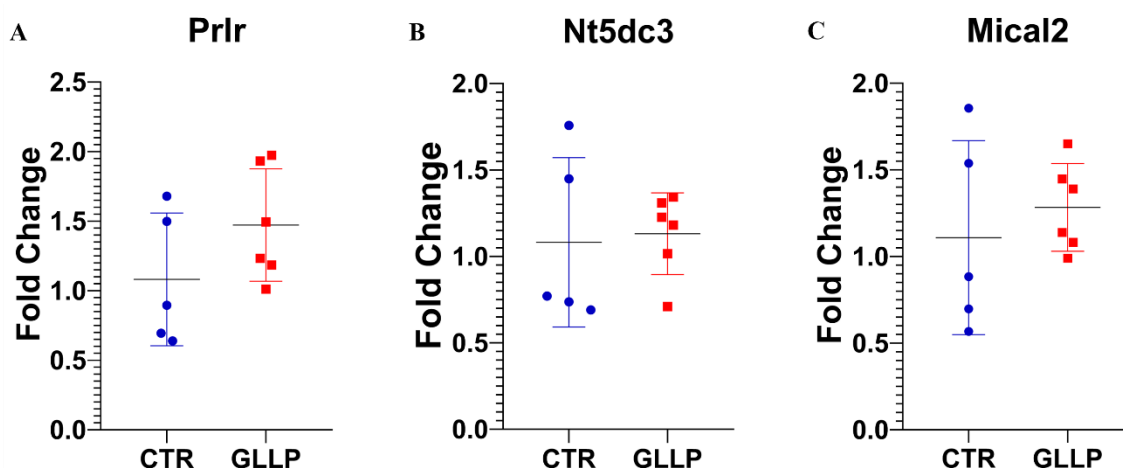


Figura 13. Gráficos de barra representativos da expressão gênica de mRNA alvos selecionados para validação *in vivo*. Não houve diferença significativa entre o grupo CTR e GLLP na expressão de ambos os genes.

7. DISCUSSÃO

Foram identificados 20 miRNAs DE na PV de ratos jovens submetidos a RPM. Destes, 14 miRNAs apresentaram expressão aumentada, enquanto 6 miRNAs exibiram redução na expressão. Esse padrão diferencial sugere que a RPM induz alterações significativas na regulação pós-transcricional, potencialmente impactando vias celulares críticas associadas à homeostase tecidual e à função prostática, como sugere os estudos (Rinaldi *et al.*, 2018). É possível que os miRNAs com expressão aumentada estejam associados a respostas compensatórias ou adaptativas ao ambiente intrauterino adverso, enquanto os miRNAs com expressão reduzida possam refletir a supressão de vias específicas relacionadas ao desenvolvimento normal da PV.

Padrões de alteração na expressão gênica induzidos pela RPM já foram descritos em genes relacionados ao metabolismo lipídico nos hepatócitos (Kim *et al.*, 2023), bem como em genes mitocondriais do fígado e músculo esquelético, indicando possíveis déficits na bioenergética celular (Mortensen *et al.*, 2010). Além disso, a literatura também relata modificações significativas na expressão gênica nos rins, refletindo impactos na programação do desenvolvimento renal (Welham *et al.*, 2005). No presente estudo, a análise dos dados de mRNAs identificou 408 genes DEGs entre os grupos experimentais, dos quais 86 apresentaram expressão reduzida e 322 exibiram aumento de expressão. Esse padrão destaca que a RPM também promove alterações substanciais na regulação gênica da próstata, com potenciais implicações no desenvolvimento e na saúde ao longo da vida. Outro ponto a destacar é a variação em clusters de expressão entre as amostras do mesmo grupo, o que pode refletir a variabilidade do modelo animal mesmo em contextos experimentais isolados e idênticos.

A análise de predição de alvos revelou que 19 dos 20 miRNAs DE que regulam 73 dos mRNAs DE, reforçando o importante papel dos miRNAs na modulação da expressão gênica em resposta à RPM e destacando a complexidade das interações regulatórias no modelo experimental. A rede apresentada ilustra essas conexões, permitindo identificar miRNAs com alta relevância funcional modulando vias críticas como crescimento e remodelação tecidual, estresse oxidativo e sinalização inflamatória. Essa complexa rede compõe o cenário de atraso no desenvolvimento prostático desses animais no DPN21, podendo predispor ao desenvolvimento de desordens ao envelhecimento.

A comparação entre os miRNAs DE na PV de animais submetidos à RPM e aqueles identificados em pacientes humanos com CaP revelou três miRNAs DE em comum: miR-184, miR-410-3p e miR-708-5p. O miR-708-5p mantém o mesmo padrão de expressão entre o início da vida e o CaP humano, enquanto o miR-184 e o miR-410-3p exibem padrões de expressão opostos. Essa divergência nos padrões sugere que os impactos da RPM na regulação desses

miRNAs podem refletir adaptações compensatórias ao ambiente intrauterino adverso, que subsequentemente evoluem para desempenhar papéis distintos na tumorigênese. Além disso, a conservação das sequências desses miRNAs entre ratos e humanos também reforça sua importância funcional, uma vez que a manutenção evolutiva de sequências geralmente está associada a alvos e vias biológicas críticas (Bartel, 2018). Isso também sugere que modelos murinos são adequados para explorar os mecanismos pelos quais a RPM impacta esses miRNAs, além de facilitar o estudo de suas funções específicas no contexto do desenvolvimento prostático e da carcinogênese. O padrão de expressão persistente do miR-708-5p ao longo da vida e sua associação consistente com o CaP humano indicam que ele pode desempenhar um papel precoce no desenvolvimento, e sustentado na predisposição à tumorigênese. O miR-708-5p tem um papel supressor tumoral no câncer de próstata, com expressão reduzida associada a pior prognóstico, progressão tumoral e recidiva. Ele atua regulando negativamente o CD44, um marcador de células-tronco tumorais associado a fenótipos agressivos. Além disso, o miR-708-5p suprime a proteína KPNA4, que facilita a translocação de fatores oncogênicos como NF- κ B para o núcleo, reduzindo assim a proliferação e metástase (Monteleone e Lutz, 2017; Saini *et al.*, 2012). O miR-410-3p desempenha um papel complexo no câncer de próstata, com evidências apontando para sua função como regulador da transição epitelial-mesenquimal e de processos associados ao comportamento agressivo do tumor. Este microRNA pode apresentar um papel bifásico, variando entre promover e inibir a progressão do câncer dependendo do contexto celular e molecular (Asante *et al.*, 2023; Carbach *et al.*, 2024).

Os estudos sobre o miRNA-184 o caracterizam como sendo associado à inibição de processos críticos como proliferação, migração e invasão celular (Walter *et al.*, 2013). No CaP, evidências sugerem que o miR-184 atua como um supressor tumoral, regulando negativamente a proliferação, migração e invasão de células cancerígenas, o que o posiciona como um potencial biomarcador para diagnóstico e alvo terapêutico (Tan *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2017). Essa função é atribuída à sua capacidade de regular negativamente genes oncogênicos e vias relacionadas à progressão tumoral. Estudos ainda revelam a associação de lncRNAs formando uma esponja e suprimindo o miR-184, levando ao aumento da expressão do oncogene c-Myc e da sinalização no eixo miR-184/IGF1-R, contribuindo para a promoção do crescimento e proliferação das células tumorais (Wang *et al.*, 2018; Xie *et al.*, 2021). Outro aspecto relevante é que estudos relacionados ao DOHAD mostraram que a prole de ratas expostas a ftalatos durante a gestação apresenta desregulação do miR-184 no DPN 120 (Scarano *et al.*, 2019). Sabe-se que os ftalatos são disruptores endócrinos que mimetizam a atividade estrogênica nos organismos, uma condição que é semelhante ao ambiente intraprostático da prole de ratos

submetidos a RPM, conforme descrito por Santos *et al.* (2019) em estudos anteriores de nosso grupo, que evidenciam um aumento na razão estrógeno/testosterona. Desse modo, o miRNA-184 foi escolhido como objeto de estudo para os ensaios subsequentes.

Os alvos preditos do miRNA-184, desregulados na PV de animais expostos à RPM no início da vida, estão associados a processos celulares críticos para a homeostase prostática. O gene *Gan*, por exemplo, desempenha um papel na estabilidade do citoesqueleto e no transporte intracelular. Estudos demonstram que o aumento de sua expressão está vinculado à acumulação tóxica de microtúbulos e a falhas no transporte axonal, comprometendo a integridade estrutural das células (Ding *et al.*, 2006). Na RPM, a desregulação do *Gan* pode refletir uma resposta adaptativa ao estresse nutricional, levando a alterações precoces na organização celular que predis põem a disfunções prostáticas tardias. Já o *Prlr*, que codifica o receptor de prolactina, está intrinsecamente ligado ao desenvolvimento prostático, à sinalização hormonal e à promoção de processos neoplásicos (Ramírez-de-Arellano *et al.*, 2021; Robertson *et al.*, 2003). A prolactina atua sinergicamente com andrógenos e estrógenos, modulando vias como JAK-STAT e MAPK, que regulam proliferação celular e sobrevivência (Bole-Feysot *et al.*, 1998; Sackmann-Sala & Goffin, 2015). A desregulação do *Prlr* em modelos de RPM sugere que a exposição intrauterina a condições adversas pode reprogramar permanentemente a sensibilidade hormonal da próstata, aumentando o risco de hiperplasia ou carcinogênese na vida adulta. Esse achado é especialmente relevante para nosso modelo de RPM, no qual observamos um perfil de estrogenização, sugerindo que a desregulação do miR-184 e sua interação com o *Rprl* podem estar associadas tanto ao atraso no desenvolvimento prostático quanto a respostas inflamatórias exacerbadas. Essa hipótese é respaldada pela correlação entre a modulação do *Rprl* pelo miR-184 e a desorganização microambiental observada, reforçando a importância de investigar mecanismos epigenéticos na interface entre nutrição fetal, desregulação hormonal e carcinogênese. Genes como *Dtna* e *Mical2*, por sua vez, estão envolvidos na adesão celular e no remodelamento do citoesqueleto. Alterações no *Dtna* podem comprometer a integridade das junções célula-matriz, afetando a coesão tecidual (Ervasti & Campbell, 1993), enquanto o *Mical2*, ao modular a dinâmica dos filamentos de actina, influencia a motilidade celular e a invasividade tumoral (Frémont *et al.*, 2017).

Na RPM, a desregulação desses genes pode levar a um microambiente prostático desorganizado, facilitando a instalação de lesões pré-neoplásicas. A desregulação coordenada desses alvos no início da vida aponta para um mecanismo de programação molecular induzida pela RPM, no quais alterações epigenéticas ou transcricionais reconfiguram redes regulatórias essenciais. O miR-184 emerge como um regulador importante nesse processo, potencialmente

orquestrando a expressão de genes que conectam estresse nutricional e desorganização tecidual. Por exemplo, a supressão do miR-184 pode levar à superexpressão do *Prlr* e do *Gan*, exacerbando respostas proliferativas e desequilíbrios no citoesqueleto, enquanto a modulação do *Dtna* e do *Mical2* pode alterar a comunicação célula-microambiente.

O conjunto de vias enriquecidas pelos alvos do miR-184 está diretamente associado à homeostase da glândula prostática, abrangendo três eixos principais: (1) processamento de proteínas e modulação do sistema imune, (2) regulação do metabolismo energético e (3) controle do crescimento celular e resposta hormonal. No eixo de controle do crescimento celular e resposta hormonal, o aumento do nível de estrógeno e a alteração na razão estrógeno/testosterona (Santos *et al.*, 2019; Portela *et al.*, 2023) podem potencializar a ativação do receptor de estrógeno alfa (ER α), que, conforme demonstrado por Prins *et al.* (2001; 2006), induz proliferação desordenada de células epiteliais prostáticas. Esse desequilíbrio hormonal cria um ambiente favorável à hiperplasia e à instalação de lesões pré-neoplásicas, especialmente quando combinado à desregulação de genes-alvo do miR-184 envolvidos na sinalização proliferativa, como por exemplo o *Prlr*. Além disso, a elevação do IGF-1 e da insulina foram demonstradas, sendo moléculas-chave no metabolismo energético e na sinalização mitogênica, podendo amplificar vias como PI3K/AKT e MAPK, que regulam crescimento celular e sobrevivência. Essa convergência entre hormônios e fatores metabólicos ressalta a interconexão entre os eixos de regulação do metabolismo energético e resposta hormonal, sugerindo uma sinergia entre desregulação endócrina e uma possível reprogramação molecular mediada pelo miR-184, com impactos profundos no desenvolvimento e na fisiologia da próstata. No contexto do processamento de proteínas e modulação imune, o aumento do estrógeno e da inflamação associada à desregulação imune (Santos *et al.*, 2019) podem exacerbar o estresse do retículo endoplasmático (RE), já comprometido pela RPM (Santos *et al.*, 2022). O RE, central na síntese e dobragem de proteínas, é sensível a alterações nutricionais e hormonais. A sobrecarga de estrógeno e a sinalização desregulada de insulina/IGF-1 podem agravar o acúmulo de proteínas mal enoveladas, ativando respostas de estresse como a via UPR (Unfolded Protein Response), que, quando crônica, promove apoptose e inflamação. Esse cenário favorece um microambiente prostático propício a danos epiteliais e reparo disfuncional, etapas que precedem a carcinogênese. A regulação do metabolismo energético, por sua vez, é diretamente impactada pela elevação da insulina e do IGF-1, que modulam a captação de glicose e a biogênese lipídica. A próstata, como glândula dependente de andrógenos e metabolitos lipídicos para sua função secretória (Cunha *et al.*, 1987, 2018), torna-se vulnerável a desajustes nesse equilíbrio. A superestimulação de vias anabólicas pela insulina/IGF-1 pode levar a um estado de

hipernutrição celular, promovendo acúmulo de lipídios e alterações na homeostase redox, que, combinadas à desregulação de genes do miR-184 envolvidos no metabolismo, potencializam danos oxidativos e disfunção mitocondrial. As alterações hormonais induzidas pela RPM — aumento de estrógeno, testosterona, IGF-1 e insulina — atuam em sinergia com as vias reguladas pelo miR-184 para reprogramar a homeostase prostática. O eixo hormonal-metabólico amplifica a proliferação celular e o estresse do RE, enquanto a desregulação imune e metabólica cria um terreno inflamatório e genotóxico. Essa rede de interações explica como insultos nutricionais precoces podem estabelecer assinaturas moleculares que predisõem a alterações estruturais e funcionais na próstata, culminando em maior risco de carcinogênese com o envelhecimento.

A análise do oncoprint evidencia uma heterogeneidade genômica nos genes-alvo do miRNA-184 em pacientes com CaP, destacando eventos como amplificações, deleções profundas e mutações (missense e truncantes). Dentre os genes analisados, *Mical2* (37%) e *Mboat2* (34%) apresentaram as maiores taxas de alteração, seguidos por *Gan* (34%) e *Nbeal1* (22%), enquanto *Prlr* (7%) e *Dtna* (21%) mostraram alterações menos frequentes, porém relevantes. Amplificações em genes como *Mboat2* e *Mical2* podem potencializar a superexpressão de oncogenes, enquanto deleções profundas em *Nbeal1* e *Dtna* sugerem a perda de genes supressores tumorais, criando um ambiente molecular propício à progressão tumoral (Abeshouse *et al.*, 2015). A elevada prevalência de alterações nos alvos do miR-184 em 83,2% dos pacientes avaliados, reforça seu potencial como biomarcador para caracterização/subtipagem molecular do CaP. Essa desregulação pode estar associada a mecanismos críticos da carcinogênese, como a modulação de vias de proliferação celular e reparo de DNA. Por exemplo, alterações no *Prlr* podem impactar vias de sinalização como JAK-STAT, relacionadas ao crescimento celular e inflamação, enquanto amplificações em *Mical2* estão ligadas à remodelação do citoesqueleto e invasividade tumoral. A heterogeneidade observada ressalta a necessidade de estratégias personalizadas, que considerem o perfil molecular específico de cada tumor, visando intervir em mecanismos-chave como a desregulação do miR-184 e suas redes de interação gênica.

A ausência de diferenças significativas na expressão dos genes alvo do miR-184, avaliada por RT-qPCR, apesar das predições *in silico* e de evidências prévias de desregulação em modelos de RPM, pode ser contextualizada por múltiplos fatores metodológicos, biológicos e técnicos. Primeiramente, é importante considerar que a regulação por miRNAs frequentemente ocorre em nível pós-transcricional, atuando mais na inibição da tradução do que na degradação do mRNA. Isso significa que, mesmo sem alterações detectáveis nos níveis de mRNA

(mensurados por RT-qPCR), a expressão proteica dos genes alvo pode estar comprometida. Estudos clássicos, como os de Bartel (2004), destacam que miRNAs podem modular a síntese proteica sem afetar significativamente a abundância do transcrito, o que reforça a necessidade de complementar a análise com técnicas como Western blot ou ensaios de perfil ribossômico para avaliar a tradução. Outro ponto crítico é a heterogeneidade celular da próstata ventral, composta por populações epiteliais e estromais com funções distintas. Se a desregulação do miR-184 ocorre preferencialmente em um subtipo celular, a análise de tecido homogeneizado pode mascarar diferenças localizadas. Abordagens como microdissecção a laser ou cultivo de células isoladas poderiam esclarecer se a regulação é específica a determinadas subpopulações. Fatores técnicos também devem ser revisados. A limitação inerente às predições *in silico* também merece destaque. Ferramentas como TargetScan e miRDB, embora úteis, geram uma proporção considerável de falsos positivos, já que algoritmos preditivos não capturam totalmente a complexidade das interações miRNA-mRNA *in vivo*. Validações funcionais, como ensaios de luciferase reporter, são necessárias para confirmar a ligação direta do miR-184 aos genes alvo. Além disso, a redundância de miRNAs pode compensar a função do miR-184, diluindo seu efeito aparente. Por exemplo, outros miRNAs com sequências semelhantes ou alvos sobrepostos podem manter a expressão gênica estável, mesmo com a desregulação do miR-184. No contexto da RPM, é possível que mecanismos adaptativos temporários normalizem a expressão gênica em fases iniciais, enquanto alterações latentes só se manifestem tardiamente. Esse fenômeno é consistente com a hipótese de "programação fetal", na qual insultos pré-natais estabelecem assinaturas moleculares que predisõem a doenças na vida adulta (Barker, 1990). Aparentes contradições entre dados de mRNA e fenótipos observados podem, portanto, refletir uma desconexão temporal entre eventos moleculares iniciais e suas consequências fisiológicas. Por fim, a ausência de diferenças no RT-qPCR não invalida o papel do miR-184 no modelo experimental, mas ressalta a necessidade de integrar abordagens complementares. A análise proteômica, por exemplo, poderia revelar se a tradução dos genes alvo está comprometida, enquanto o sucesso dos ensaios funcionais *in vitro* permitiriam testar sua influência direta na expressão gênica. Em síntese, resultados negativos em RT-qPCR são uma oportunidade para refinar hipóteses e metodologias, aprofundando a investigação sobre os mecanismos de regulação do miR-184 e sua interação com redes gênicas complexas. A integração de múltiplas camadas de evidência (transcrito, proteína, função) será fundamental para elucidar como a RPM reprograma a homeostase prostática e predis põe a alterações patológicas ao longo da vida.

730 Esses achados reforçam a hipótese de que a RPM atua como um "primeiro hit" em um
731 modelo de múltiplos estágios para carcinogênese prostática, onde alterações precoces criam um
732 terreno molecular favorável à progressão de lesões. A partir desses dados, podemos afirmar que
733 períodos críticos do desenvolvimento, como a má nutrição materna, programam alterações
734 epigenéticas e celulares de longo prazo. A desregulação precoce de genes essenciais,
735 potencialmente modulada pelo miR-184, contribui para a formação de um microambiente
736 prostático vulnerável. A perda ou redução de sua expressão pode criar condições favoráveis
737 para a desordem tecidual e o desenvolvimento de CaP na vida adulta. Já no contexto do CaP, a
738 redução do miR-184 pode contribuir para o aumento da proliferação celular descontrolada e a
739 susceptibilidade a eventos oncogênicos.

8. REFERÊNCIAS

- ABESHOUSE, A. *et al.* The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. **Cell**, v. 163, n. 4, p. 1011–1025, 5 nov. 2015.
- AI, C.; KONG, L. CGPS: A machine learning-based approach integrating multiple gene set analysis tools for better prioritization of biologically relevant pathways. **Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao**, v. 45, n. 9, p. 489–504, 20 set. 2018.
- ALCANTARA SANTOS, S. A. *et al.* Identification of potential molecular pathways involved in prostate carcinogenesis in offspring exposed to maternal malnutrition. **Aging**, v. 12, n. 20, p. 19954–19978, 1 jan. 2020.
- Alejandro, E. U., Jo, S., Akhaphong, B., Llacer, P. R., Gianchandani, M., Gregg, B., ... Bernal-Mizrachi, E. (2020). Maternal low-protein diet on the last week of pregnancy contributes to insulin resistance and β -cell dysfunction in the mouse offspring. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. doi:10.1152/ajpregu.00284.2019
- ALLIS, C. D.; JENUWEIN, T. The molecular hallmarks of epigenetic control. **Nature reviews. Genetics**, v. 17, n. 8, p. 487–500, 1 ago. 2016.
- ASANTE, D. M. *et al.* miR-410 Is a Key Regulator of Epithelial-to-Mesenchymal Transition with Biphasic Role in Prostate Cancer. **Cancers**, v. 16, n. 1, 1 jan. 2023.
- BARKER, D. J. *et al.* Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 301, n. 6746, p. 259–262, 4 ago. 1990.
- BARKER, D. J. P. *et al.* Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 298, n. 6673, p. 564–567, 1989.
- BARKER, D. J. P.; OSMOND, C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. **Lancet (London, England)**, v. 1, n. 8489, p. 1077–1081, 10 maio 1986.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281–297, 23 jan. 2004.
- _____. Metazoan MicroRNAs. **Cell**, v. 173, n. 1, p. 20–51, 22 mar. 2018.
- BAUTISTA, C. J. *et al.* Maternal obesity in the rat impairs male offspring aging of the testicular antioxidant defence system. **Reproduction, fertility, and development**, v. 29, n. 10, p. 1950–1957, 2017.
- BHAT-NAKSHATRI, P. *et al.* Estradiol-regulated microRNAs control estradiol response in breast cancer cells. **Nucleic acids research**, v. 37, n. 14, p. 4850–4861, 2009.
- BOLE-FEYSOT, C. *et al.* Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. **Endocrine reviews**, v. 19, n. 3, p. 225–268, 1998.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 1 ago. 2014.
- BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, nov. 2018.

- 783 CALIN, G. A.; CROCE, C. M. MicroRNA signatures in human cancers. **Nature reviews.**
784 **Cancer**, v. 6, n. 11, p. 857–866, 12 nov. 2006.
- 785 CAPECE, V. *et al.* Oasis: online analysis of small RNA deep sequencing data. **Bioinformatics**
786 **(Oxford, England)**, v. 31, n. 13, p. 2205–2207, 1 jul. 2015.
- 787 CARBACHE, M. F. *et al.* NOVEL SOLUTION BASED ON DETECTION OF MIRS-410-3P
788 AND 141-5P FOR DIAGNOSTIC OF PROSTATE CANCER EVOLUTION.
789 **medRxiv**, p. 2024.03.11.24303774, 13 mar. 2024.
- 790 CAVALCA, A. M. B. *et al.* Effects of a phthalate metabolite mixture on both normal and
791 tumoral human prostate cells. **Environmental toxicology**, v. 37, n. 10, p. 2566–2578,
792 1 out. 2022.
- 793 CAVARIANI, M. M. *et al.* Maternal protein restriction differentially alters the expression of
794 AQP1, AQP9 and VEGFr-2 in the epididymis of rat offspring. **International journal**
795 **of molecular sciences**, v. 20, n. 3, 1 fev. 2019.
- 796 CERAMI, E. *et al.* The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring
797 multidimensional cancer genomics data. **Cancer discovery**, v. 2, n. 5, p. 401–404, maio
798 2012.
- 799 COLOMBELLI, K. T. *et al.* Impairment of microvascular angiogenesis is associated with delay
800 in prostatic development in rat offspring of maternal protein malnutrition. **General and**
801 **comparative endocrinology**, v. 246, p. 258–269, 15 maio 2017.
- 802 CUNHA, G. R. *et al.* The endocrinology and developmental biology of the prostate. **Endocrine**
803 **reviews**, v. 8, n. 3, p. 338–362, 1987.
- 804 _____. Development of the human prostate. **Differentiation; research in biological diversity**, v.
805 103, p. 24–45, 1 set. 2018.
- 806 DEANS, C.; MAGGERT, K. A. What do you mean, “epigenetic”? **Genetics**, v. 199, n. 4, p.
807 887–896, 2015.
- 808 DING, J. *et al.* Gene targeting of GAN in mouse causes a toxic accumulation of microtubule-
809 associated protein 8 and impaired retrograde axonal transport. **Human molecular**
810 **genetics**, v. 15, n. 9, p. 1451–1463, maio 2006.
- 811 DOBIN, A. *et al.* STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics (Oxford,**
812 **England)**, v. 29, n. 1, p. 15–21, jan. 2013a.
- 813 _____. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 29, n.
814 1, p. 15–21, jan. 2013b.
- 815 DWEED, H.; GRETZ, N. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target
816 interactions. **Nature methods**, v. 12, n. 8, p. 697, 30 jul. 2015.
- 817 ERVASTI, J. M.; CAMPBELL, K. P. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a
818 transmembrane linker between laminin and actin. **The Journal of cell biology**, v. 122,
819 n. 4, p. 809–823, 1993.
- 820 ESQUELA-KERSCHER, A.; SLACK, F. J. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer.
821 **Nature reviews. Cancer**, v. 6, n. 4, p. 259–269, abr. 2006.
- 822 FALCÃO-TEBAS F, MARIN EC, KUANG J, BISHOP DJ, MCCONELL GK. Maternal
823 exercise attenuates the lower skeletal muscle glucose uptake and insulin secretion
824 caused by paternal obesity in female adult rat offspring. **J Physiol**. 2020

- 825 Oct;598(19):4251-4270. doi: 10.1113/JP279582. Epub 2020 Jul 9. PMID: 32539156;
826 PMCID: PMC7586952.
- 827 FERNANDEZ-TWINN, D. S.; CONSTÂNCIA, M.; OZANNE, S. E. Intergenerational
828 epigenetic inheritance in models of developmental programming of adult disease.
829 **Seminars in cell & developmental biology**, v. 43, p. 85–95, 1 jul. 2015.
- 830 FAO; IFAD; UNICEF; WFP; WHO. The state of food security and nutrition in the world 2024.
831 Rome: **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2024.
- 832 FRANCIS, J. C.; SWAIN, A. Prostate Organogenesis. **Cold Spring Harbor perspectives in**
833 **medicine**, v. 8, n. 7, 1 jul. 2018.
- 834 FRÉMONT, S. *et al.* Emerging roles of MICAL family proteins - from actin oxidation to
835 membrane trafficking during cytokinesis. **Journal of cell science**, v. 130, n. 9, p. 1509–
836 1517, 1 maio 2017.
- 837 FRIEDLÄNDER, M. R. *et al.* miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel
838 microRNA genes in seven animal clades. **Nucleic acids research**, v. 40, n. 1, p. 37–52,
839 jan. 2012.
- 840 GARDNER, W. A. Hypothesis: the prenatal origins of prostate cancer. **Human pathology**, v.
841 26, n. 12, p. 1291–1292, 1995.
- 842 GILLERAN, J. P. *et al.* The role of prolactin in the prostatic inflammatory response to neonatal
843 estrogen. **Endocrinology**, v. 144, n. 5, p. 2046–2054, 1 maio 2003.
- 844 GLOBOCAN. Lyon: International Agency for Research on Cancer, **World Health**
845 **Organization**, 2022. Disponível em: <https://gco.iarc.fr>. Acesso em: 17 fev. 2025.
- 846 GOYAL, D.; LIMESAND, S. W.; GOYAL, R. Epigenetic responses and the developmental
847 origins of health and disease. **The Journal of endocrinology**, v. 242, n. 1, p. T105–
848 T119, 2019.
- 849 HE, L.; HANNON, G. J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. **Nature**
850 **reviews. Genetics**, v. 5, n. 7, p. 522–531, jul. 2004.
- 851 HEERWAGEN, M. J. R. *et al.* Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile
852 epigenetic soil. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and**
853 **comparative physiology**, v. 299, n. 3, set. 2010.
- 854 HO, S. M. *et al.* Environmental factors, epigenetics, and developmental origin of reproductive
855 disorders. **Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 68, p. 85–104, 1 mar. 2017.
- 856 INCA (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER). Estimativas 2020-2023: Incidência e
857 mortalidade do câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**, 2020.
- 858 JUSTULIN, L. A. *et al.* Editorial: Early Life Epigenetic Programming of Health and Disease
859 through DOHaD Perspective. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 11, 10
860 fev. 2023.
- 861 KANEHISA, M. *et al.* New approach for understanding genome variations in KEGG. **Nucleic**
862 **acids research**, v. 47, n. D1, p. D590–D595, 8 jan. 2019.
- 863 KELEHER, M. R. *et al.* Maternal high-fat diet associated with altered gene expression, DNA
864 methylation, and obesity risk in mouse offspring. **PloS one**, v. 13, n. 2, 1 fev. 2018.
- 865 KIM, J.; CHOI, A.; KWON, Y. H. Maternal low-protein diet alters hepatic lipid accumulation
866 and gene expression related to glucose metabolism in young adult mouse offspring fed

- a postweaning high-fat diet. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 682, p. 193–198, 19 nov. 2023.
- LIAO, Y.; SMYTH, G. K.; SHI, W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 30, n. 7, p. 923–930, 1 abr. 2014.
- LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome biology**, v. 15, n. 12, 5 dez. 2014.
- MARCELLY DE SOUZA SANTOS, A. *et al.* Effects of undernutrition on serum and testicular testosterone levels and sexual function in adult rats. **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme**, v. 36, n. 1, p. 27–33, jan. 2004.
- MARKER, P. C. *et al.* Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. **Developmental biology**, v. 253, n. 2, p. 165–174, 15 jan. 2003.
- MERICQ, V. *et al.* Long-term metabolic risk among children born premature or small for gestational age. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 50–62, 1 jan. 2017.
- MONTELEONE, N. J.; LUTZ, C. S. miR-708-5p: a microRNA with emerging roles in cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 41, p. 71292–71316, 2017.
- MORTENSEN, O. H. *et al.* A maternal low protein diet has pronounced effects on mitochondrial gene expression in offspring liver and skeletal muscle; protective effect of taurine. **Journal of biomedical science**, v. 17 Suppl 1, n. Suppl 1, 2010.
- NAIA FIORETTO, M. *et al.* Maternal malnutrition associated with postnatal sugar consumption increases inflammatory response and prostate disorders in rat offspring. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 588, 1 jul. 2024.
- NAKAMURA, N. *et al.* Increased estrogen levels altered microRNA expression in prostate and plasma of rats dosed with sex hormones. **Andrology**, v. 8, n. 5, p. 1360–1374, 1 set. 2020.
- NOBILE S, DI SIPIO MORGIA C, VENTO G. Perinatal Origins of Adult Disease and Opportunities for Health Promotion: A Narrative Review. **J Pers Med**. 2022 Jan 25;12(2):157. doi: 10.3390/jpm12020157. PMID: 35207646; PMCID: PMC8877993.
- OXFAM. **Inquérito Nacional sobre Segurança Alimentar no Contexto da Pandemia da Covid-19 no Brasil**. 2022.
- PENG, Y.; CROCE, C. M. The role of MicroRNAs in human cancer. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 1, 2016.
- PORTELA, L. M. F. *et al.* Early-life origin of prostate cancer through deregulation of miR-206 networks in maternally malnourished offspring rats. **Scientific reports**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2023.
- PRINS, G. S. Developmental estrogenization: Prostate gland reprogramming leads to increased disease risk with aging. **Differentiation; research in biological diversity**, v. 118, p. 72–81, 1 mar. 2021.
- PRINS, G. S.; PUTZ, O. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. **Differentiation; research in biological diversity**, v. 76, n. 6, p. 641–659, 2008.

- 909 RAMÍREZ-DE-ARELLANO, A. *et al.* The Relevant Participation of Prolactin in the Genesis
910 and Progression of Gynecological Cancers. **Frontiers in endocrinology**, v. 12, 21 out.
911 2021.
- 912 RAVELLI, G.-P.; STEIN, Z. A.; SUSSER, M. W. Obesity in young men after famine exposure
913 in utero and early infancy. **The New England journal of medicine**, v. 295, n. 7, p. 349–
914 353, 12 ago. 1976.
- 915 REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents:
916 final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the
917 reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of nutrition**, v. 123, n. 11, p.
918 1939–1951, 1993.
- 919 REN J, ZHOU L, LI S, ZHANG Q, XIAO X. The roles of the gut microbiota, metabolites, and
920 epigenetics in the effects of maternal exercise on offspring metabolism. **Am J Physiol**
921 **Endocrinol Metab.** 2024 Dec 1;327(6):E760-E772. doi: 10.1152/ajpendo.00200.2024.
922 Epub 2024 Nov 13. PMID: 39535269.
- 923 RIBAS, J. *et al.* miR-21: an androgen receptor-regulated microRNA that promotes hormone-
924 dependent and hormone-independent prostate cancer growth. **Cancer research**, v. 69,
925 n. 18, p. 7165–7169, 2009.
- 926 RINALDI, J. C. *et al.* Implications of intrauterine protein malnutrition on prostate growth,
927 maturation and aging. **Life sciences**, v. 92, n. 13, p. 763–774, 19 abr. 2013.
- 928 RINALDI, J. C. *et al.* Maternal protein malnutrition: effects on prostate development and adult
929 disease. **Journal of developmental origins of health and disease**, v. 9, n. 4, p. 361–
930 372, 1 ago. 2018.
- 931 ROBERTSON, F. G. *et al.* Prostate development and carcinogenesis in prolactin receptor
932 knockout mice. **Endocrinology**, v. 144, n. 7, p. 3196–3205, 1 jul. 2003.
- 933 SACKMANN-SALA, L.; GOFFIN, V. Prolactin-induced prostate tumorigenesis. **Advances in**
934 **experimental medicine and biology**, v. 846, p. 221–242, 2015.
- 935 SAINI, S. *et al.* miRNA-708 control of CD44(+) prostate cancer-initiating cells. **Cancer**
936 **research**, v. 72, n. 14, p. 3618–3630, 15 jul. 2012.
- 937 SANTOS, S. A. A. *et al.* Maternal Low-Protein Diet Impairs Prostate Growth in Young Rat
938 Offspring and Induces Prostate Carcinogenesis With Aging. **The journals of**
939 **gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, v. 74, n. 6, p. 751–
940 759, 16 maio 2019.
- 941 SANTOS, S. A. A. *et al.* miR-18a-5p Is Involved in the Developmental Origin of Prostate
942 Cancer in Maternally Malnourished Offspring Rats: A DOHaD Approach.
943 **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 23, 1 dez. 2022.
- 944 SCARANO, W. R. *et al.* Cell junctions in the prostate: an overview about the effects of
945 Endocrine Disrupting Chemicals (EDCS) in different experimental models.
946 **Reproductive Toxicology**, v. 81, p. 147–154, 1 out. 2018.
- 947 _____. Exposure to an Environmentally Relevant Phthalate Mixture During Prostate Development
948 Induces MicroRNA Upregulation and Transcriptome Modulation in Rats.
949 **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 171, n. 1,
950 p. 84–97, 1 set. 2019.

- SCHULZ, L. C. The Dutch Hunger Winter and the developmental origins of health and disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 39, p. 16757–16758, 28 set. 2010.
- SILVA FARIA, T. DA *et al.* Maternal malnutrition during lactation affects folliculogenesis, gonadotropins, and leptin receptors in adult rats. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 26, n. 10, p. 1000–1007, out. 2010.
- Sosa-Larios TC, Ortega-Márquez AL, Rodríguez-Aguilera JR, Vázquez-Martínez ER, Domínguez-López A, Morimoto S. A low-protein maternal diet during gestation affects the expression of key pancreatic β -cell genes and the methylation status of the regulatory region of the MafA gene in the offspring of Wistar rats. **Front Vet Sci.** 2023 Mar 13;10:1138564. doi: 10.3389/fvets.2023.1138564. PMID: 36992977; PMCID: PMC10040775.
- TAN, G.-G. *et al.* miR-184 delays cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer by directly suppressing DLX1. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 22, n. 4, 11 ago. 2021.
- THOMSON, A. A. Mesenchymal mechanisms in prostate organogenesis. **Differentiation; research in biological diversity**, v. 76, n. 6, p. 587–598, 2008.
- TIMMS, B. G. Prostate development: a historical perspective. **Differentiation; research in biological diversity**, v. 76, n. 6, p. 565–577, 2008.
- TOIVANEN, R.; SHEN, M. M. Prostate organogenesis: tissue induction, hormonal regulation and cell type specification. **Development (Cambridge, England)**, v. 144, n. 8, p. 1382–1398, 15 abr. 2017.
- TRAPNELL, C. *et al.* Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. **Nature biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 46–53, jan. 2013.
- WADDINGTON, C. H. The epigenotype. 1942. **International journal of epidemiology**, v. 41, n. 1, p. 10–13, fev. 2012.
- WADHWA, P. D. *et al.* Developmental origins of health and disease: brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. **Seminars in reproductive medicine**, v. 27, n. 5, p. 358–368, set. 2009.
- WANG, J. *et al.* Long non-coding RNA MYU promotes prostate cancer proliferation by mediating the miR-184/c-Myc axis. **Oncology reports**, v. 40, n. 5, p. 2814–2825, 1 nov. 2018.
- WEISSENBRUCH, M. M. VAN *et al.* Fetal nutrition and timing of puberty. **Endocrine development**, v. 8, p. 15–33, 2005.
- WELHAM, S. J. M. *et al.* Maternal diet programs embryonic kidney gene expression. **Physiological genomics**, v. 22, n. 1, p. 48–56, out. 2005.
- WERNERT, N. *et al.* Morphological and immunohistochemical investigations of the utriculus prostaticus from the fetal period up to adulthood. **The Prostate**, v. 17, n. 1, p. 19–30, 1990.
- WINSHIP, A. L. *et al.* Maternal low-protein diet programmes low ovarian reserve in offspring. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 156, n. 4, p. 299–311, 2018.
- WINTER, J. *et al.* Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nature cell biology**, v. 11, n. 3, p. 228–234, 2009.

- 994 XIE, Q. *et al.* lncRNA SNHG11 facilitates prostate cancer progression through the upregulation
995 of IGF-1R expression and by sponging miR-184. **International journal of molecular**
996 **medicine**, v. 48, n. 3, 1 set. 2021.
- 997 ZAMBRANO, E. *et al.* A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat
998 impairs male reproductive development. **The Journal of physiology**, v. 563, n. Pt 1, p.
999 275–284, 15 fev. 2005.
- 1000 ZHAO, Z. H. *et al.* Single-cell and spatial transcriptomes reveal the impact of maternal low
1001 protein diet on follicular cell composition and ovarian micro-environment in the
1002 offspring. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 136, 1 fev. 2024.
- 1003 ZHOU, X. *et al.* Prognostic value of miR-21 in various cancers: an updating meta-analysis.
1004 **PloS one**, v. 9, n. 7, 14 jul. 2014.
- 1005 ZHOU, Y. *et al.* Artesunate suppresses the viability and mobility of prostate cancer cells
1006 through UCA1, the sponge of miR-184. **Oncotarget**, v. 8, n. 11, p. 18260–18270, 2017.
- 1007 ZHU, G. *et al.* Sonic and desert hedgehog signaling in human fetal prostate development. **The**
1008 **Prostate**, v. 67, n. 6, p. 674–684, 1 maio 2007.
- 1009

9. DESAFIOS E ADAPTAÇÕES NO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Nesta seção, relato os principais desafios e imprevistos enfrentados durante a execução deste trabalho, bem como as estratégias adotadas para superá-los.

9.1 Morosidade na Importação de Reagentes

A burocracia associada à importação de insumos científicos representou um entrave significativo, demandando aproximadamente três meses entre a solicitação de compra e o início dos experimentos. Essa realidade, infelizmente comum na pesquisa brasileira, reforça a necessidade de planejamento contingencial em projetos com prazos restritos.

9.2 Contaminações no Laboratório de Cultura Celular

Durante a realização do projeto, o Laboratório de Cultura Celular multiusuário do DBEF enfrentou contaminações recorrentes por Mycoplasma e bactérias, que exigiram interrupções periódicas para quarentena, tratamento, descarte de amostras comprometidas e reposição de recursos. Esses episódios impactaram diretamente a cronologia experimental.

9.3 Interrupção por Estágio no Exterior (BEPE/FAPESP)

Entre junho e setembro de 2024, realizei um estágio de pesquisa no exterior através do programa BEPE/FAPESP. Embora a experiência tenha sido enriquecedora para o desenvolvimento técnico-científico, os experimentos vinculados ao mestrado permaneceram paralisados durante esse período, exigindo replanejamento ao retornar.

9.4 Dificuldades na Transfecção com o Mimético do miRNA-184

Os experimentos de transfecção em linhagens prostáticas benigna (PNT-2) e tumorais (LNCaP e PC-3) apresentaram desafios técnicos persistentes. Foram testada, conforme descrito na literatura, combinações variáveis de:

- **Concentrações do mimético:** 10, 20, 30, 50 e 70 nM;
- **Linhagem celular:** foram utilizadas as três linhagens propostas;
- **Tempos de incubação:** 5, 10, 15 e 30 minutos;
- **Confluência celular:** 60%, 75% e 90%.

Apesar das múltiplas abordagens, não foi possível observar significância estatística entre o grupo CTR e os grupos transfectados com o mimético do miRNA-184 (Figura 13). Uma

maior expressão de miRNA-184 era esperada nos grupos transfectados. Novos protocolos estão em teste para garantir o sucesso do experimento.

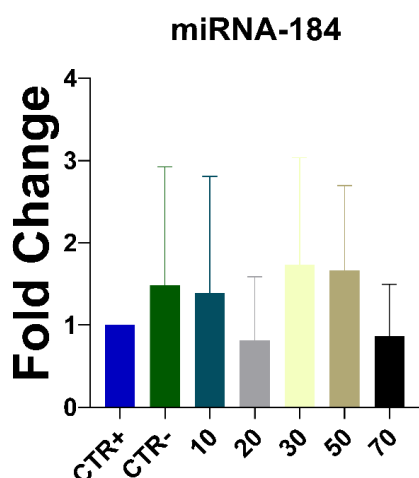


Figura 14. Gráfico de barra representativo da expressão gênica do miRNA-184 em experimentos de transfecção celular em diferentes concentrações. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais.

10. INTERNACIONALIZAÇÃO (BOLSA ESTÁGIO DE PESQUISA NO EXTERIOR - FAPESP)

O estágio realizado no Cukierman's Lab, no Fox Chase Cancer Center, na Filadélfia, Pensilvânia, foi uma experiência transformadora em minha carreira. Ter a oportunidade de aprender e aplicar técnicas avançadas de biologia molecular e celular, cada uma contribuindo de maneira única para o aprimoramento das minhas habilidades em pesquisa experimental, foi extremamente enriquecedor.

O knockdown por CRISPRi com dCas9 destacou-se como uma ferramenta indispensável, permitindo a criação de novas linhagens celulares fundamentais para estudos em genética e na interação com a matriz extracelular. Além disso, adquiri expertise na produção de matrizes 3D derivadas de fibroblastos, capazes de recriar microambientes celulares semelhantes aos tecidos naturais, possibilitando a investigação de comportamentos celulares em condições fisiológicas mais realistas. Trabalhar com fibroblastos associados ao câncer me deu uma nova perspectiva de estudo, com um olhar para o microambiente tumoral e suas interações, abrangendo meu conhecimento para além das células epiteliais.

No campo da microscopia, aprofundei meus conhecimentos em imunofluorescência e microscopia confocal, técnicas essenciais para a análise detalhada da organização e espessura das fibras da matriz em alta resolução (Figura 14). Essa abordagem permitiu uma compreensão mais profunda da arquitetura da matriz extracelular e sua influência na dinâmica celular. Além

disso, o ensaio de sobrevivência celular foi uma ferramenta importante para avaliar a viabilidade e a resiliência das células sob diferentes condições experimentais, especialmente no contexto do microambiente tumoral.

Por fim, a aplicação do ensaio ELISA expandiu meu repertório técnico ao possibilitar a quantificação precisa de proteínas específicas, complementando as análises celulares com dados moleculares sobre citocinas pró e anti-inflamatórias que compõe o microambiente tumoral.

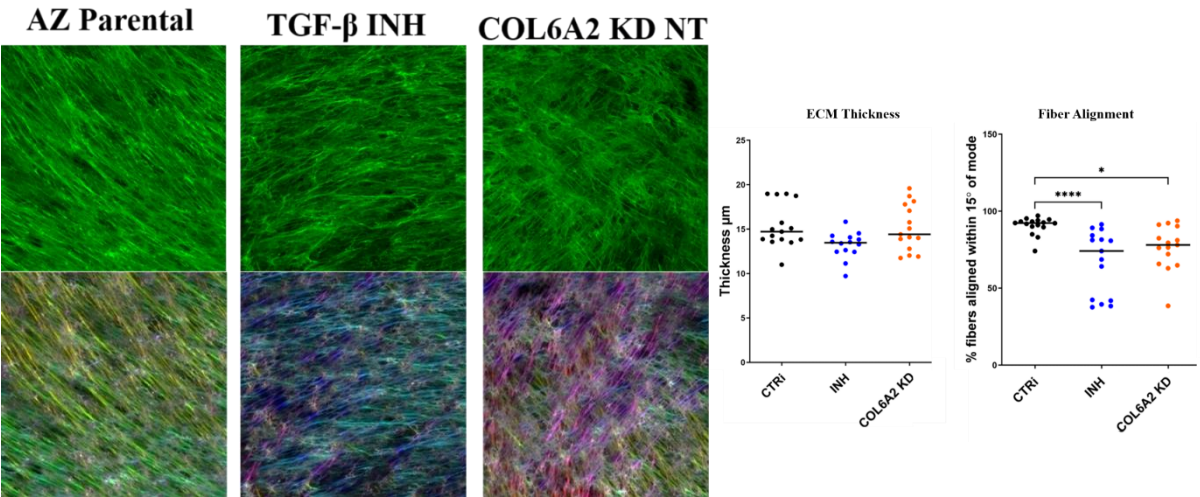


Figura 15. Imagem em microscopia confocal de lâminas de matriz extracelular produzidas por CAFs. Imunofluorescência para fibronectina, a fim de avaliar a espessura e alinhamento das fibras nos grupos CTR (AZ Parental), tratado com inibidor de TGF-β (TGF-β INH) e linhagem com knockdown para colágeno VI (COL6A2 KD NT).

Essa experiência foi enriquecedora em diversos aspectos—intelectual, profissional e pessoal. Conhecer pessoas incríveis e seus diferentes jeitos de trabalhar. Novos lugares, idiomas, culturas e gastronomias, ampliando minha visão de mundo, tornando-a mais diversa e empática. Sem dúvida, foi uma jornada de aprendizado excepcional.