

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Os miRNAs como potenciais biomarcadores da origem desenvolvimentista do
Câncer de Próstata em animais submetidos a restrição proteica materna:
abordagens epiDOHaD**

Mateus Betta de Oliveira

Discente

Luís Antonio Justulin Junior

Orientador

Botucatu - SP

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Os miRNAs como potenciais biomarcadores da origem desenvolvimentista do
Câncer de Próstata em animais submetidos a restrição proteica materna:
abordagens epiDOHaD**

Mateus Betta de Oliveira

Discente

Luís Antonio Justulin Junior

Orientador

Trabalho de graduação apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Física Médica pela Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Unesp.

Orientador: *Prof. Dr. Luís Antônio Justulin Junior*

Botucatu - SP

2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Oliveira, Mateus Betta de.

Os miRNAs como potenciais biomarcadores da origem desenvolvimentista do câncer de próstata em animais submetidos a restrição proteica materna : abordagens epiDOHaD / Mateus Betta de Oliveira. - Botucatu, 2022

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Física Médica) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Luís Antonio Justulin Junior
Capes: 20202008

1, MicroRNAs. 2. Marcadores bioquímicos. 3. Próstata - Câncer. 4. Dieta com restrição de proteínas.

Palavras-chave: CaP; epiDOHaD; miRNA.

BANCA EXAMINADORA

Professor Associado Luís Antônio Justulin Junior

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências de Botucatu

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Setor Morfologia

Professor Associado Raquel Fantin Domeniconi

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências – UNESP

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Setor Anatomia

Professor Associado Joel Mesa Hormaza

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências – UNESP

Departamento de Biofísica e Farmacologia

Botucatu, 20 de dezembro de 2022.

DEDICATÓRIA

A minha Família, Namorada e Amigos.

Dedico com todo carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à instituição UNESP, que me acolheu e foi quem proporcionou todas as experiências desafiadoras ao longo destes anos. Ao meu orientador Luís Antonio Justulin Junior, que apoiou e incentivou durante toda minha jornada junto ao laboratório de matriz extracelular. A Flavia Bessi Constantino que foi minha conselheira, guia em pesquisa e minha fonte de conhecimento, assim como uma inspiração como cientista e pessoa. Ao Luiz Marcos Frediani, por todo seu auxílio e acompanhamento durante a elaboração deste trabalho.

A minha família por me apoiar durante toda minha graduação e sustentar meus sonhos durante todos esses anos.

A Minha namorada, Rafaela, que me apoiou e me suportou por todo o processo de escrita deste trabalho.

Aos meus colegas de curso que me acompanharam de perto por essa jornada, em especial a Luiza e Letícia, que compartilharam de perto todas as mazelas do curso em conjunto comigo.

E agradeço a Deus por toda essa oportunidade.

*“O insucesso é apenas uma oportunidade para
recomeçar com mais inteligência.”
-Henry Ford*

RESUMO

OLIVEIRA, Matheus Betta. **Os miRNAs como potenciais biomarcadores da origem desenvolvimentista do Câncer de Próstata em animais submetidos a restrição proteica materna: abordagens epiDOHaD**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Física Médica) – Instituto de Biociências de Botucatu. Campus de Botucatu. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, 2022.

O aumento da incidência de câncer em diversas faixa etária da população nas últimas décadas é algo alarmante. Existem estudos que mostram que uma parcela destes casos pode estar envolvida a insultos sofridos durante a vida intrauterina de indivíduos, já que o embrião/feto tem a capacidade de se adaptar a mudanças ambientais, fazendo assim que estas mudanças tragam consequências na vida adulta. Nosso grupo de pesquisa demonstrou que a prole gerada por ratas que passam por um processo de restrição proteica durante a gestação e lactação tem um aumento de 50% na incidência de câncer de próstata (CaP) na idade avançada. Contudo, existe uma falta de informação sobre quais seriam os mecanismos moleculares e epigenéticos são responsáveis por tais mudanças. Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar o impacto da restrição proteica materna (RPM) sobre o perfil global de expressão dos miRNAs na Próstata Ventral (PV) de ratos machos Sprague Dawley nascidos de mães alimentadas com uma dieta padrão contendo 17% de proteína, chamado de grupo controle (CTR), ou com uma dieta hipoproteica, contendo somente 6% de proteína, grupo restrição proteica gestacional e lactacional (GLLP) durante a gestação e lactação, sendo ambos os grupos eutanasiados no dia pós-natal (DPN) 21 e associar essas moléculas como potenciais biomarcadores da origem desenvolvimentista do CaP. Os dados de sequenciamento de *small RNA sequence* foram analisados e posteriormente quantificados pela plataforma Oasis para identificação dos miRNAs, e para obtermos informações da relação miRNAs-mRNAs foi feita uma reanálise dos dados transcriptômicos que já haviam sido gerados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa. Foi então analisada o diferencial de expressão (DE) dos miRNAs e mRNAs utilizando linguagem R onde observamos 20 miRNAs diferencialmente expressos, 14up-regulados e 6 down-regulados e 408 mRNAs (322 up-regulados e 86 down-regulados). Foi feita então uma análise de predição de alvos utilizando a ferramenta miRWalk 3.0 e estabelecida a correlação entre a expressão de miRNAs e mRNAs. Através da ferramenta KOBAS foram feitas as análises de enriquecimento funcional, onde foram utilizados os resultados da análise integrativa onde identificamos 7 módulos funcionais. Para comparar os efeitos desses genes em pacientes com CaP, esses alvos foram utilizados para realizar análises genômicas utilizando a ferramenta CBioPortal onde foi constatado que 73% dos pacientes observados apresentavam os genes em questão. Concluimos então que a restrição proteica materna causa sim um desbalanço de miRNAs envolvidos em importantes vias do desenvolvimento prostático, podendo ser um dos fatores que levam ao CaP na vida adulta.

Palavras-chave: DOHaD; Próstata; Epigenetica; miRNAs

ABSTRACT

OLIVEIRA, Matheus Betta. ***MiRNAs as potential biomarkers of the developmental origin of Prostate Cancer in animals submitted to maternal protein restriction: epiDOHaD approaches.*** Undergraduate thesis (Bachelor of Medical Physics). Institute of Biosciences of Botucatu. Campus of Botucatu. São Paulo State University (Unesp), 2022.

The increase in the incidence of cancer in different groups of the population in the last decades is something alarming. There are studies that show that a portion of these cases may be involved in insults suffered during the intrauterine life of individuals, since the embryo/fetus has the ability to adapt to environmental changes, thus causing these changes to have consequences in adult life (FLODMARK, et al, 2004, SEIDELL, et al, 2016, DEARDEN, et al, 2016, FRANK 2016). Our research group has shown that offspring generated by rats that undergo a process of protein restriction during pregnancy and lactation have a 50% increased chance of developing prostate cancer in old age (SANTOS, et al, 2018). However, there is a lack of information about the molecular mechanisms responsible for such changes. Thus, this work aims to observe the impact of maternal protein restriction (MPR) on the global expression profile of miRNAs in the Ventral Prostate (VP) of male Sprague Dawley rats born to mothers fed a standard diet containing 17% protein, called the control group (CTR), or with a low-protein diet, containing only 6% protein, group gestational and lactational protein restriction (GLLP), during pregnancy and lactation were sacrificed on postnatal day 21 and associate these molecules as potential biomarkers of the developmental origin of prostate cancer (REEVES, et al, 1993). The data were analyzed and later quantified by the Oasis platform and to have better information about the miRNAs-mRNAs relationship, a new analysis of transcriptomic data that had been previously generated by our research group was performed. The ED between miRNAs and mRNAs was then analyzed using R language where we observed 20 differentially expressed miRNAs, 14 up-regulated and 6 down-regulated. A target prediction analysis was then performed using the miRWalk tool. Through the KOBAS tool, the functional enrichment analyzes were performed, where the results of the integrative analysis were used and thus performed separately for positively regulated and negatively regulated targets and we could observe 7 modules of interest. To compare the effects of these genes in patients with PCa, these targets were used to perform genomic analysis using the CBioPortal tool, where it was found that 73% of the observed patients had the genes in question. We conclude that maternal protein restriction does cause an imbalance of miRNAs involved in important pathways of prostate development, which may be one of the factors that lead to PCa in adulthood.

Keywords: DOHaD; Prostate; Epigenetics. miRNAs

LISTA DE TABELAS SUPLEMENTARES

Tabela Suplementar 1. Lista dos miRNAs diferencialmente expressos na próstata ventral (PV) de animais submetidos a restrição proteica materna no dia pós-natal (DPN) 21

Tabela Suplementar 2. Lista dos mRNAs diferencialmente expressos na próstata ventral (PV) de animais submetidos a restrição proteica materna no dia pós-natal (DPN) 21

Tabela Suplementar 3. Dados brutos da análise de predição de alvos dos miRNAs diferencialmente expressos na próstata ventral (PV) de animais submetidos a restrição proteica materna no dia pós-natal (DPN) 21, realizados na plataforma miRWalk 3.0.

Tabela Suplementar 4. Integração entre os alvos preditos dos miRNAs e dos mRNAs diferencialmente expressos na próstata ventral (PV) de animais submetidos a restrição proteica materna no dia pós-natal (DPN) 21.

Tabela Suplementar 5. Análise de enriquecimento das vias moleculares e termos ontológicos enriquecidos dos alvos preditos dos miRNAs, análise realizada na ferramenta Kobas 3.0.

Tabela Suplementar 6. Identificação dos clusters formados a partir da análise de enriquecimento das vias moleculares e termos ontológicos enriquecidos a partir dos alvos preditos dos miRNAs, análise realizada na ferramenta Kobas 3.0.

Tabela Suplementar 7. Identificação das 38 vias mais enriquecidas a partir dos alvos preditos dos miRNAs, análise realizada na ferramenta Kobas 3.0.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Gráfico de barras mostrando a expressão dos miRNAs diferencialmente expressos na PV de animais submetidos a RPM no DPN21. Os números estão representados em Log2 de Fold Change..... 19
- Figura 2. Heatmap representando os níveis de expressão gênica na próstata ventral (PV) de roedores controles (CTR) e submetidos à restrição proteica materna (GLLP). As amostras estão agrupadas por meio da distância euclidiana. As cores representam o valor de expressão, o azul indica diminuição e vermelho indica o aumento da expressão. 20
- Figura 3. Gráfico de circosplot mostrando a interação entre os miRNAs diferencialmente expressos na PV dos animais do grupo GLLP no DPN21 e os alvos preditos que foram identificados no transcriptoma da PV desses animais, note que os miRNAs e mRNAs apresentam sentidos opostos de expressão. 21
- Figura 4. Representação gráfica dos módulos de vias moleculares enriquecidas para os alvos preditos para os miRNAs DE na PV de ratos submetidos ao grupo GLLP. Gráfico gerado pela plataforma Kobas 3.0. As diferentes cores nos nós dos gráficos representam os diferentes módulos. 22
- Figura 5. Gráfico de barras mostrando as vias enriquecidas com valor de $p < 0,05$. O gráfico foi gerado pela plataforma Kobas 3.0 (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/>), com os alvos preditos dos miRNAs diferencialmente expressos os dados estão expressos em razão de enriquecimento (enrich ratio). 23
- Figura 6. Oncoprint mostrando as principais alterações dos alvos preditos dos miRNAs DE na PV de animais do grupo GLLP e sua associação aos pacientes com CaP humano. Os 18 genes estão alterados em 73% dos pacientes do conjunto de dados Prostate Adenocarcinoma (P PRAD) do The Cancer Genome Atlas (TCGA) (359/489). 24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PF	Programação Fetal
DE	Diferencial de Expressão
CaP	Câncer de Prostata
HPB	Hiperplasia Protática Benigna
PV	Próstata Ventral
TCGA	The Cancer Genome Atlas
RPM	Restrição Proteica Materna
DOHaD	Developmental Origins of Health and Disease

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 <i>Programação Fetal</i>	13
1.2 <i>Câncer de Próstata.....</i>	14
1.3 <i>Epigenética</i>	15
2. OBJETIVOS	16
2.1 <i>Objetivo geral.....</i>	16
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	16
3. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	16
3.1 <i>Animais e dietas.....</i>	16
3.2 <i>Processamento e quantificação de miRNAs</i>	17
3.3 <i>Identificação dos mRNAs.....</i>	17
3.4 <i>Análise de expressão diferencial de miRNAs e mRNAs.....</i>	18
3.5 <i>Análise de alvos e análise de enriquecimento de vias moleculares e sua associação com o CaP humano</i>	18
4. RESULTADOS	19
4.1 <i>Identificação dos miRNAs e mRNAs diferencialmente expressas</i>	19
4.2 <i>Análise de predição de alvos</i>	20
4.3 <i>Análise de enriquecimento de vias moleculares reguladas pelos miRNAs.....</i>	21
5. DISCUSSÃO	24
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	25
REFERÊNCIAS	26

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Programação Fetal*

O aumento da incidência de doenças crônicas não transmissíveis nos últimos anos é um fator preocupante, principalmente pelos impactos e gastos na saúde pública (FLODMARK, *et al*, 2004, SEIDELL, *et al*, 2016). Isto está relacionado diretamente aos novos hábitos de vida adquiridos globalmente nas últimas décadas, mais precisamente aos hábitos alimentares e sedentarismo. O consumo cada vez mais abundante de alimentos ultraprocessados com baixos índices nutritivos e com altos níveis de gordura e conservantes tem um papel protagonista nessa alta de doenças relacionadas ao metabolismo corporal (DEARDEN, *et al*, 2016, FRANK 2016). Evidências experimentais e epidemiológicas apontam cada vez mais que doenças que antes eram consideradas crônicas podem estar relacionadas à insultos sofridos durante a vida intrauterina, uma condição conhecida como Programação Fetal (PF). Isso mostra que é de suma importância que durante a gestação, período de alta vulnerabilidade, exista um cuidado e certa manutenção dos hábitos da gestante para que tanto ela quando o embrião/feto tenham um desenvolvimento saudável (MERICQ, *et al*, 2016).

Podemos dizer que ao longo das últimas décadas houve um aumento do número de estudos correlacionando alterações no período intrauterino e/ou primeira infância e suas consequências na vida da prole quando adulta. Essa associação foi descrita décadas atrás pelo epidemiologista David Barker, que deu origem a hipótese que carrega seu nome (BARKER, *et al*, 1989, BARKER, *et al*, 1986). Mesmo sendo inicialmente controversa, a hipótese Baker despertou interesse médico-científico, e com o passar dos anos esse fomentou-se a criação de uma sociedade internacional que tem como enfoque o estudo deste tema, a denominada *Origin of Health and Disease Development* (DOHaD) (SCHULZ, 1986).

Muitos dos resultados que foram obtidos em pesquisas relacionadas de PF vem de estudos com experimentação animal, principalmente roedores. Existem uma infinidade de modelos utilizados para analisar os impactos das alterações ambientais intrauterina da prole, como hábitos alimentares, a exposição ambiental a substâncias tóxicas, o etilismo, tabagismo, entre outros, mas sem dúvidas um dos modelos mais utilizados é a restrição proteica materna (RPM) durante o período de gestação e/ou lactação (COLOMBELLI, *et al*, 2017, OLIVEIRA, *et al*, 2016, OZANNE, 1999, OZANNE, 2001, PINHO, *et al*, 2014, SENE, *et al*, 2013, VEGA, *et al*, 2016). Podemos analisar em diversos estudos que este tipo de PF pode ser associado a um baixo peso ao nascer, crescimento reduzido de diferentes órgãos durante o desenvolvimento, resistência à insulina, elevação da pressão sistólica e alterações

no sistema reprodutor masculino e feminino (BRITO ALVES, *et al*, 2016, BRITO ALVES, *et al*, 2014, COSTA-SILVA, *et al*, 2009, FALCÃO-TEBAS, *et al*, 2012, FIDALGO, *et al*, 2012, LEANDRO, *et al*, 2012).

Enquanto a maioria dos estudos sobre PF tem como foco as alterações metabólicas (MOISIADIS, *et al*, 2014, MOISIADIS, *et al*, 2014), outros descrevem alterações órgão-específicas (PINHO, *et al*, 2014). Dessa forma o nosso grupo de pesquisa vem se dedicando a entender os efeitos negativos da RPM sobre a próstata ventral desses animais. Inclusive já foi demonstrado que a RPM reduz o processo de angiogênese prostática, implicando negativamente no desenvolvimento da próstata. Isso se dá devido a uma concentração mais baixa de um fator de crescimento se assemelha à insulina tipo 1 (IGF-1), testosterona e a própria insulina, que prejudicam os índices de proliferação e diferenciação do epitélio glandular (COLOMBELLI, *et al*, 2017). Outro fator importante observado recentemente é que ratos com idade avançada (540 dias de vida pós-natal) que passam por esse processo de programação fetal proveniente de uma dieta hipoproteica apresentam um alto índice de incidência de lesões prostáticas, tais como carcinoma in situ. Isso demonstra que a baixa ingestão de proteína durante o desenvolvimento da prole está associada a origem desenvolvimentista do Câncer de Próstata, contudo, os mecanismos moleculares e principalmente epigenéticos ainda não estão elucidados.

1.2 Câncer de Próstata

A próstata é uma importante glândula anexa do sistema reprodutor masculino cujo desenvolvimento e homeostase está sob o controle androgênico. Essa glândula é de suma importância para a reprodução, pois secreta um composto proteolítico e outros componentes que fazem parte do líquido que compõe o sêmen, compostos necessário para a perpetuação da espécie, pois garantem a sobrevivência dos espermatozoides no sistema reprodutor feminino (MARKER, *et al*, 2003, AUMÜLLER, *et al*, 1990, MACCIONI, *et al*, 2003).

Quando o assunto é o desenvolvimento morfogênico da próstata o período intrauterino e perinatal tem grande relevância, uma vez que o início do desenvolvimento prostático acontece por volta do 18º dia de gestação em ratos e por volta da 9ª à 10ª semana em humanos (WELSH, *et al*, 2008) e vários estudos mostram um impacto negativo na formação e fisiologia da próstata quando há alterações no ambiente intrauterino. Dentre as consequências negativas, podemos salientar a diminuição da função secretora e aumento do estresse oxidativo entre a prole de ratas que foram programadas com diabetes gestacional (CAMARGO, *et al*, 2017, SANTOS, *et al*, 2014) e crescimento hipertrófico da próstata na prole de ratos machos expostos a uma dieta com altos índices

de gordura durante a gestação e lactação (PYTLOWANCIV, *et al*, 2016). Outro fator importante é de que o período perinatal é caracterizado pela capacidade do feto em se adaptar às mudanças ambientais, alterando a expressão gênica por mecanismos pós-transicionais.

A próstata tem ganhado mais e mais enfoque nos últimos anos, tanto no âmbito médico quanto científico. Isso se dá devido ao alto índice de doenças que afetem essa glândula, principalmente o câncer de próstata (CaP) e a hiperplasia prostática benigna (HPB) (DASGUPTA, *et al*, 2016, SIEGEL, *et al*, 2013). Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o CaP é o segundo que mais mata homens no nosso país sendo que 1 a cada 6 homens tem a doença, e com uma estimativa de 625 mil novos casos por ano nos últimos 3 anos e uma projeção de 1,7 milhões de novos casos até 2030. E sendo que, com 80 a 95% de chance de cura quando o diagnóstico é precoce, ainda ser o segundo tipo de câncer que mais mata homens, ficando apenas atrás do de pulmão (INCA-Instituto Nacional do Câncer).

Estudos com RPM gestacional e lactacional relatam atraso do desenvolvimento prostático e a predisposição da glândula a uma maior incidência de CaP no envelhecimento (PYTLOWANCIV, *et al*, 2016, RINALDI, *et al*, 2013). Existem estudos do nosso grupo de pesquisa que demonstram que a restrição proteica materna induz CaP em filhotes na idade avançada (SANTOS, *et al*, 2018). Entretanto os mecanismos epigenéticos envolvidos nessa desregulação ainda permanecem escassos.

1.3 Epigenética

Está estabelecido que os mecanismos epigenéticos são moduladores-chave da expressão gênica, envolvidos em várias formas de programação fetal (JOUBERT, *et al*, 2016). Além disso, as mudanças ambientais podem alterar persistentemente os marcadores epigenéticos e desencadear respostas fenotípicas que afetarão a estrutura e as funções dos órgãos (SINCLAIR, *et al*, 2007).

O termo "epigenética" tem sido utilizado para se referir a alterações reversíveis e hereditárias no genoma capazes de afetar a expressão gênica e o fenótipo celular, sem, no entanto, alterar a sequência primária do DNA (DEANS, *et al*, 2014, FERNANDEZ-TWINN, *et al*, 2015). Os principais mecanismos de regulação epigenética incluem alterações na metilação do DNA, modificações pós-transcricionais de histonas, bem como a participação de RNAs não codificantes (ALLIS, *et al*, 2016, HEERWAGEN, *et al*, 2010). Os RNAs não codificantes são pequenas moléculas (17-35 nt) ou RNAs longos (> 200 nt) que, como o próprio nome já diz, não codificam proteínas, e são conhecidos como microRNAs. Estas moléculas estão presentes quando falamos de funções celulares como apoptose, resposta ao estresse, proliferação e regulação transcricional, além de serem capazes de regular a expressão genica em nível pró-transcricional, no entanto, os miRNAs demonstraram modular a

expressão gênica por meio de uma infinidade de mecanismos, afetando as vias celulares tanto em contextos fisiológicos quanto patológicos, tendo importante papel no desenvolvimento de tumores, pois visto que influenciam tanto na proliferação quanto na morte das células, tudo dependendo do contexto e do tipo celular no qual estão inseridos (ANASTASIADOU, *et al*, 2017).

Estudos em modelo de PF por restrição proteica demonstraram a participação de mecanismos epigenéticos e, embora esses mecanismos tenham sido amplamente estudados no contexto do desenvolvimento embrionário e da biologia do câncer, o conhecimento sobre como a epigenética contribui para a programação fetal ainda é escasso (LANE, 2014). Isso é particularmente importante uma vez que mudanças em fatores ambientais como a nutrição materna impactam fortemente os padrões de expressão gênica na prole (HEERWAGEN, *et al*, 2010).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar o impacto da restrição proteica materna (RPM) sobre o perfil global de expressão dos miRNAs na Próstata Ventral (PV) de ratos machos *Sprague Dawley* no dia pós-natal (DPN) 21 e associar essas moléculas como potenciais biomarcadores da origem desenvolvimentista do Cancer de Próstata.

2.2 Objetivos específicos

- ❖ Identificar miRNAs desregulados na PV de animais submetidos a RPM;
- ❖ Identificar os mRNAs diferencialmente expressos na PV de animais submetidos a RPM
- ❖ Realizar predição de alvos dos miRNAs
- ❖ Integrar os alvos preditos aos miRNAs e integrá-los aos dados globais de mRNAs na PV dos animais submetidos a RPM;
- ❖ Identificar as vias moleculares associadas aos miRNAs desregulados a PV dos animais.

3. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

3.1 Animais e dietas

Foram utilizados ratos *Sprague Dawley* com 90 dias de idade, pesando entre 200-300 gramas, os animais foram mantidos em biotério com controle de temperatura mantendo-se entre 22°C e 25°C, fotoperíodo de 12h/12h e tendo acesso livre a água e ração. A reprodução foi em uma distribuição de harém, onde a proporção de 1 macho para cada 3 fêmeas. Ao constatar a prenhes por esfregaço vaginal, foi determinado o dia gestacional 1 (DG1). Assim as ratas foram divididas em dois

grupos, sendo o Grupo Controle (CTR) onde as ratas prenhes foram alimentadas com uma dieta padrão em níveis de proteína (17% de proteína, n=10) durante todo o período de gestação e lactação; e o Grupo Restrição Proteica Gestacional e Lactacional (GLLP) que neste caso as ratas foram alimentadas nos mesmos períodos com uma dieta hipoproteica (6% de proteína, n=10). Ambas as dietas seguiram os padrões AIN-93 descritos por Reeves et al. (1993) e foram fornecidos pela PragSoluções (PragSoluções, SP, Brasil) (REEVES, *et al*, 1993).

As ninhadas foram reduzidas para oito filhotes com uma proporção igual entre machos e fêmeas no dia pós-natal (DPN) 1 a fim de maximizar o desempenho da lactação (FISCHBECK, 1987). Os parâmetros biométricos da mãe e da prole foram medidos até o final do experimento. Os filhotes machos (21 dias de idade) de cada ninhada foram eutanasiados através de overdose de cetamina e xilazina, seguido de decapitação. As próstatas ventrais (PV) dos animais foram coletadas e processadas conforme descritas a seguir. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biociências/UNESP (Protocolo nº 1178). Os dados de sequenciamento de miRNAs e mRNAs estão depositados na plataforma Gene Expression Omnibus (GEO), sob código de acesso GSE180673 e GSE180674 respectivamente.

3.2 Processamento e quantificação de miRNAs

Foram analisados por small RNA sequence amostras do grupo CTR (n=3) e GLLP (n=4), que estão disponíveis no Gene Expression Omnibus (GEO) sob código de acesso 180674. Uma vez baixado, os dados de sequenciamento de miRNAs foram analisados usando a plataforma Oasis (<https://oasis.dzne.de>), que quantifica pequenas espécies de RNA não codificantes anotadas, bem como prevê novas moléculas de miRNA usando o algoritmo miRDeep2 (LANE, 2014). Resumidamente, os arquivos FASTQ foram pré-processados por ajuste de adaptador e filtragem de qualidade, com base no índice de qualidade Phred (≥ 20). As leituras de sequência foram alinhadas à versão atual do genoma de *Rattus Novegicus* (Rnor_6.0) usando o alinhador Spliced Transcripts Alignment to a Reference (STAR) e espécies de RNA não codificantes anotadas quantificadas com base em loci genômicos (RAHMAN, *et al*, 2018, CAPECE, *et al*, 2015).

3.3 Identificação dos mRNAs

Para dar mais informações sobre a relação entre as redes miRNAs-mRNAs, reanalizamos os dados transcriptômicos do PV dos grupos CTR (n=5) e GLLP (n=4) gerados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa. Esses dados foram extraídos do banco de dados *Gene Expression Omnibus* (GEO), como arquivos *raw Illumina mRNA-Seq FASTQ*, e podem ser encontrados com o número de acesso GSE180673.

Os dados brutos foram analisados em termos de qualidade de leitura por meio do software FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) (AGUIRRE-GAMBOA, *et al*, 2013) para avaliar as leituras e a baixa qualidade do adaptador. Posteriormente, as leituras de extremidade única foram aparadas usando o software Trimmomatic (v. 0.36) e parâmetros padrão (BOLGER, *et al*, 2014). Após o processamento por mídia com qualidade de leitura, as leituras restantes foram alinhadas contra o genoma de referência de *Rattus Norvegicus* (Genome assembly: Rnor_6.0GCA_000001895.4) obtido através do Ensembl (<http://useast.ensembl.org/index.html>) por meio de o software STAR (v. 2.5.1a) (DOLBIN, *et al*, 2015). 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*, 2010).

3.4 Análise de expressão diferencial de miRNAs e mRNAs

O diferencial de expressão (DE) dos miRNAs e mRNAs foram realizados em linguagem R de programação, usando o pacote DESeq2 (LOVE, *et al*, 2014). Foram considerados diferencialmente expressos os que apresentaram Fold Change $|\pm 0,66|$, com FDR > 0.05 .

3.5 Análise de alvos e análise de enriquecimento de vias moleculares e sua associação com o CaP humano

A análise de previsão de alvo dos miRNAs foi realizada na plataforma miRWalk 3.0 (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>) utilizando dataset de *Rattus Norvegicus*, usando p-value $< 0,05$. Em seguida, foram correlacionados a expressão dos miRNAs/mRNAs considerando valores de Fold Change opostos (down/up ou up/down).

As análises de enriquecimento funcional foram realizadas utilizando os resultados da análise integrativa e foi realizada separadamente para alvos regulados positivamente e regulados negativamente. Para isso utilizamos a plataforma 3.0 (KOBAS) (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/kobas3/?t=1>). Esta plataforma gera um enriquecimento de várias bases de dados como Gene Ontology, Panther, KEGG e Reactome. As vias foram consideradas enriquecidas com p ajustado $< 0,05$.

Para comparar os efeitos desses genes em pacientes com CaP, esses alvos foram utilizados para realizar análises genômicas (de amplificação, deleção, mutação e aumento da expressão do mRNA) utilizando a ferramenta CBioPortal (<http://www.cbioportal.org/>). No CBioPortal foram utilizados os dados do Prostate Adenocarcinoma (TCGA, Pan Cancer Atlas) que usa como base os dados de cerca de 500 pacientes.

4. RESULTADOS

4.1 Identificação dos miRNAs e mRNAs diferencialmente expressas

Analisando os resultados obtidos observamos 513 miRNAs expressos na PV dos animais no DPN21, contudo, se comparando os níveis de expressão entre o grupo tratado e controle foi possível notar que, 20 miRNAs eram diferencialmente regulados no grupo GLLP, sendo 14 miRNAs up-regulados e 6 down-regulados (Figura 1, Tabela Suplementar 1).

miRNAs diferencialmente expressos na PV do grupo GLLP no DPN21

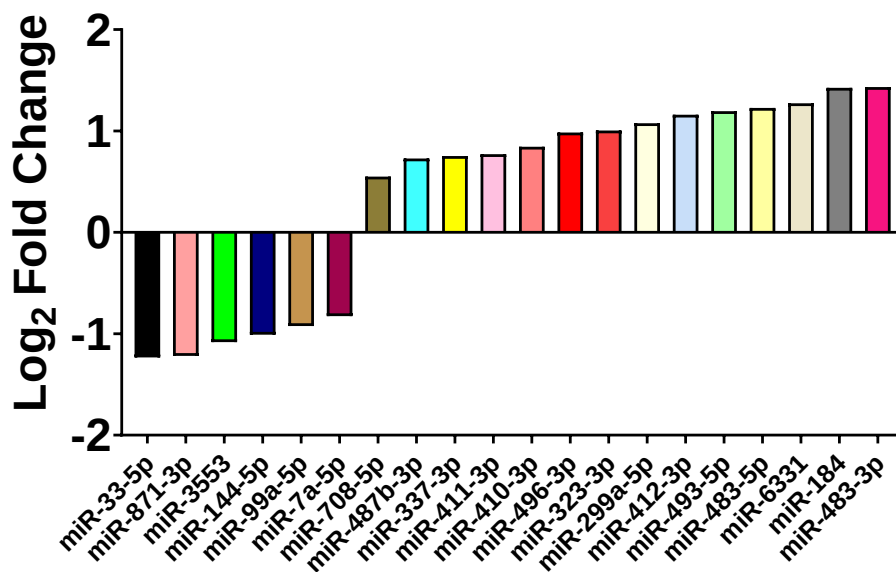


Figura 1. Gráfico de barras mostrando a expressão dos miRNAs diferencialmente expressos na PV de animais submetidos a RPM no DPN21. Os números estão representados em Log₂ de Fold Change.

Os dados de mRNAs mostraram 408 genes diferencialmente expressos (DEGs), sendo 86 down-regulados e 322 up-regulados. O heatmap representado na Figura 2 está mostrando a distribuição da expressão dos DEGs nas amostras em ambos os grupos experimentais (Tabela Suplementar 2).

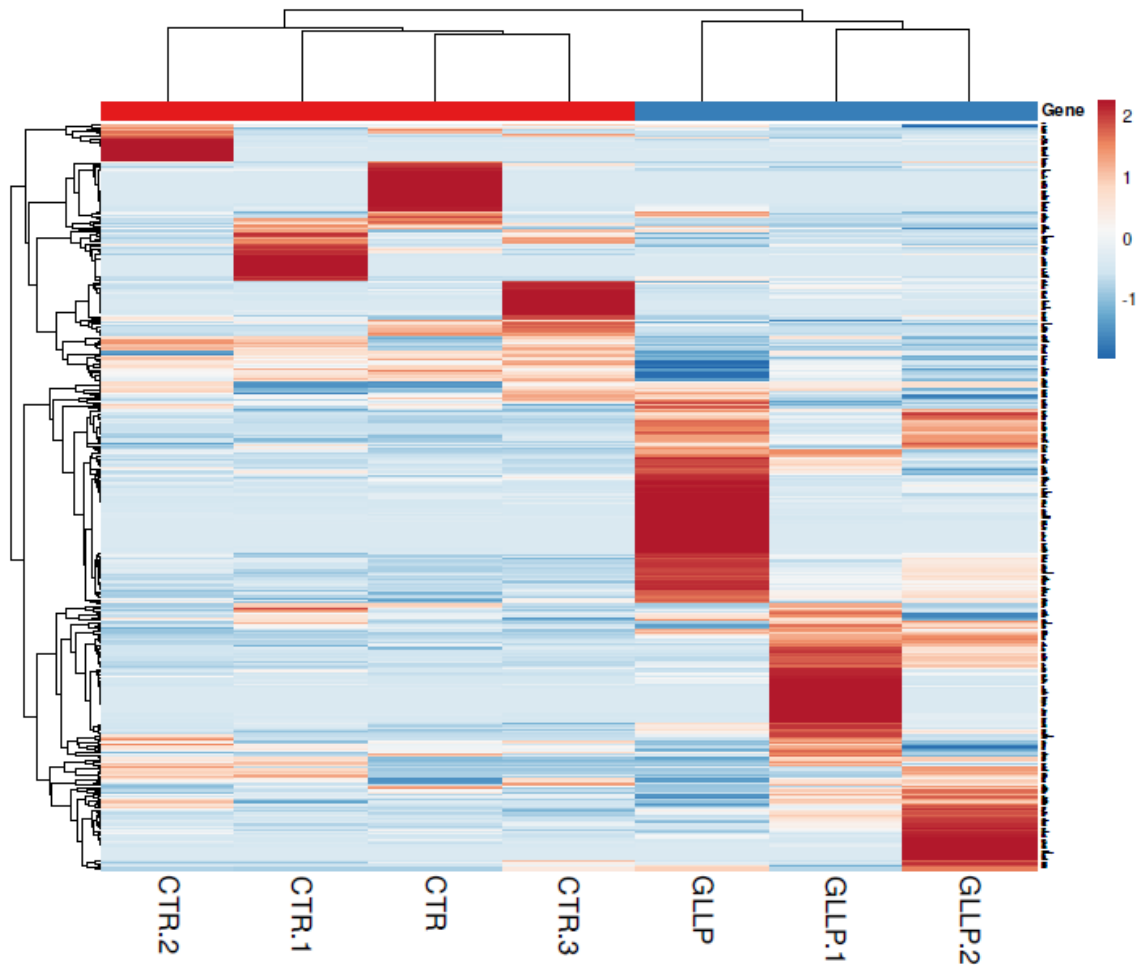


Figura 2. Heatmap representando os níveis de expressão gênica na próstata ventral (PV) de roedores controles (CTR) e submetidos à restrição proteica materna (GLLP). As amostras estão agrupadas por meio da distância euclidiana. As cores representam o valor de expressão, o azul indica diminuição e vermelho indica o aumento da expressão.

4.2 Análise de predição de alvos

As análises de predição, realizadas na plataforma miRWalk 3.0, nos mostrou que os 20 miRNAs tinham como potenciais alvos preditos 29.363 (Tabela Suplementar 3). Ao integrar os dados dos alvos preditos dos miRNAs e os DEGs (levando em consideração expressão oposta) foram observados 19 miRNAs regulando 73 mRNAs, a rede de interação entre essas moléculas está representado na Figura 3 (Tabela suplementar 4).

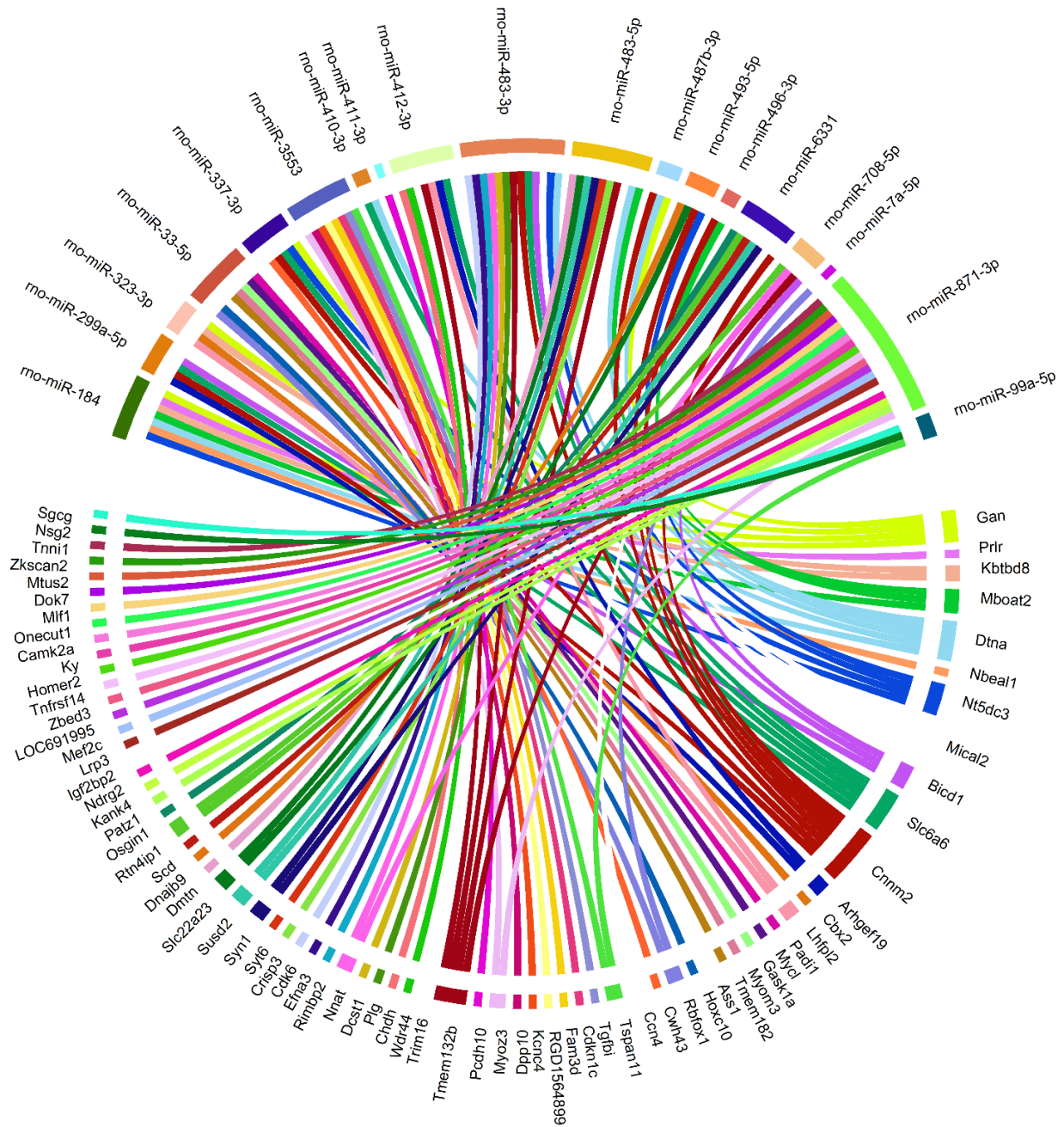


Figura 3. Gráfico de circusplot mostrando a interação entre os miRNAs diferencialmente expressos na PV dos animais do grupo GLLP no DPN21 e os alvos preditos que foram identificados no transcriptoma da PV desses animais, note que os miRNAs e mRNAs apresentam sentidos opostos de expressão.

4.3 Análise de enriquecimento de vias moleculares reguladas pelos miRNAs

As análises de enriquecimento de vias moleculares no Koba 3.0 (Tabela Suplementar 5) identificaram 7 módulos funcionais, sendo um associado a doenças (C1), estímulo para crescimento celular (C2), vias de transcrição e tradução (C3), metabolismo lipídico (C4), vias de diferenciação celular (C5), doenças cardíacas (C6) e vias de sinalização celular (C7). Esses módulos estão representados na figura 4 (Tabela Suplementar 6).

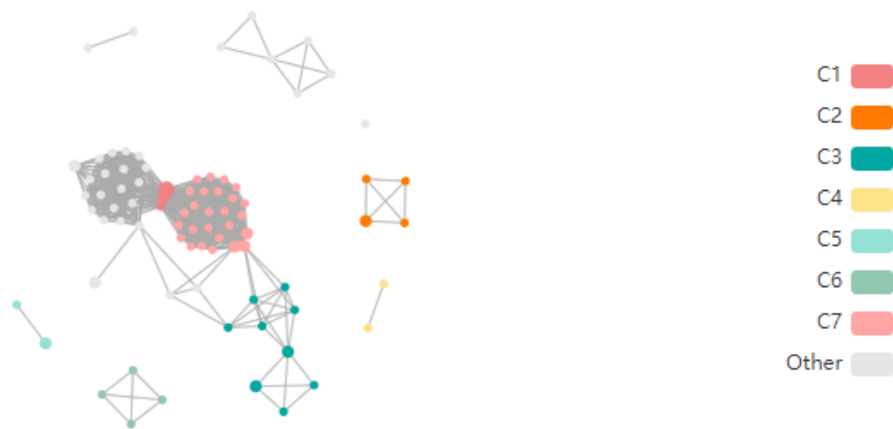


Figura 4. Representação gráfica dos módulos de vias moleculares enriquecidas para os alvos preditos para os miRNAs DE na PV de ratos submetidos ao grupo GLLP. Gráfico gerado pela plataforma Kobas 3.0. As diferentes cores nos nós dos gráficos representam os diferentes módulos.

O total de vias enriquecidas 271 vias moleculares, sendo 38 delas significativas (valor de $p < 0,05$), na figura 5 estão representadas as vias significativas e representado em quais módulos cada termo está inserido (Tabela Suplementar 7). Essas 38 vias eram reguladas por 18 genes (*Mef2c*, *Syt6*, *Cdkn1c*, *Kcnc4*, *Camk2a*, *Ass1*, *Onecut1*, *Cbx2*, *Prhr*, *Ccn4*, *Pcdh10*, *Syn1*, *Cdk6*, *Slc6a6*, *Efna3*, *Homer2*, *Rbfox1* e *Mycl*).

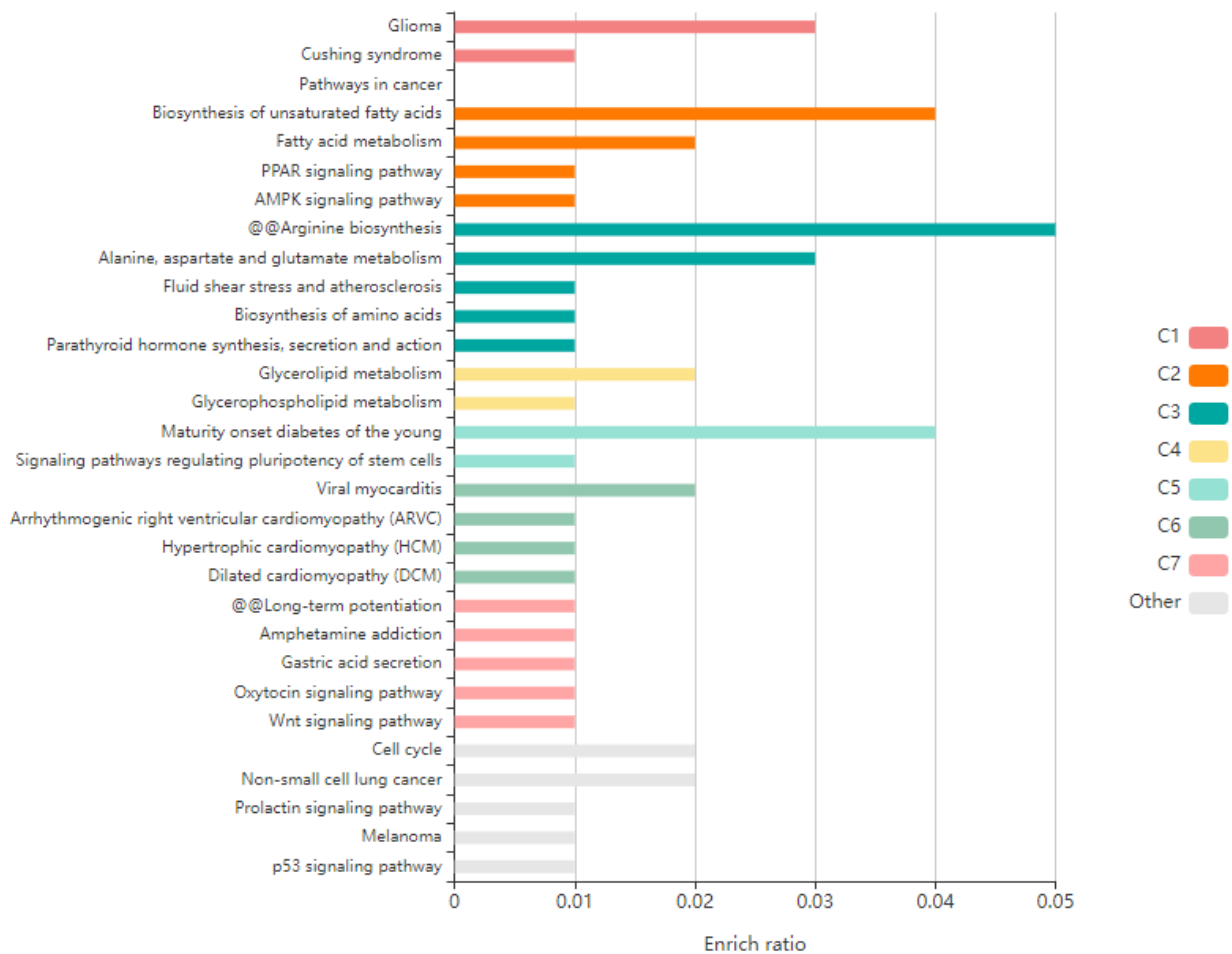


Figura 5. Gráfico de barras mostrando as vias enriquecidas com valor de $p < 0,05$. O gráfico foi gerado pela plataforma Kobas 3.0 (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/>), com os alvos preditos dos miRNAs diferencialmente expressos os dados estão expressos em razão de enriquecimento (enrich ratio).

Ao associar os dados desses 18 genes aos dados dos pacientes com CaP humano, pudemos observar que 359 dos 489 pacientes apresentavam alteração em pelos menos um desses genes, ou seja 73% dos pacientes apresentavam alteração nesses genes. E as alterações associadas a esses genes são: amplificação, depleção, aumento e diminuição da expressão dos níveis de mRNA. Essas alterações estão representadas no gráfico de oncoprint geradas pela plataforma Cbioportal (Figura 6).

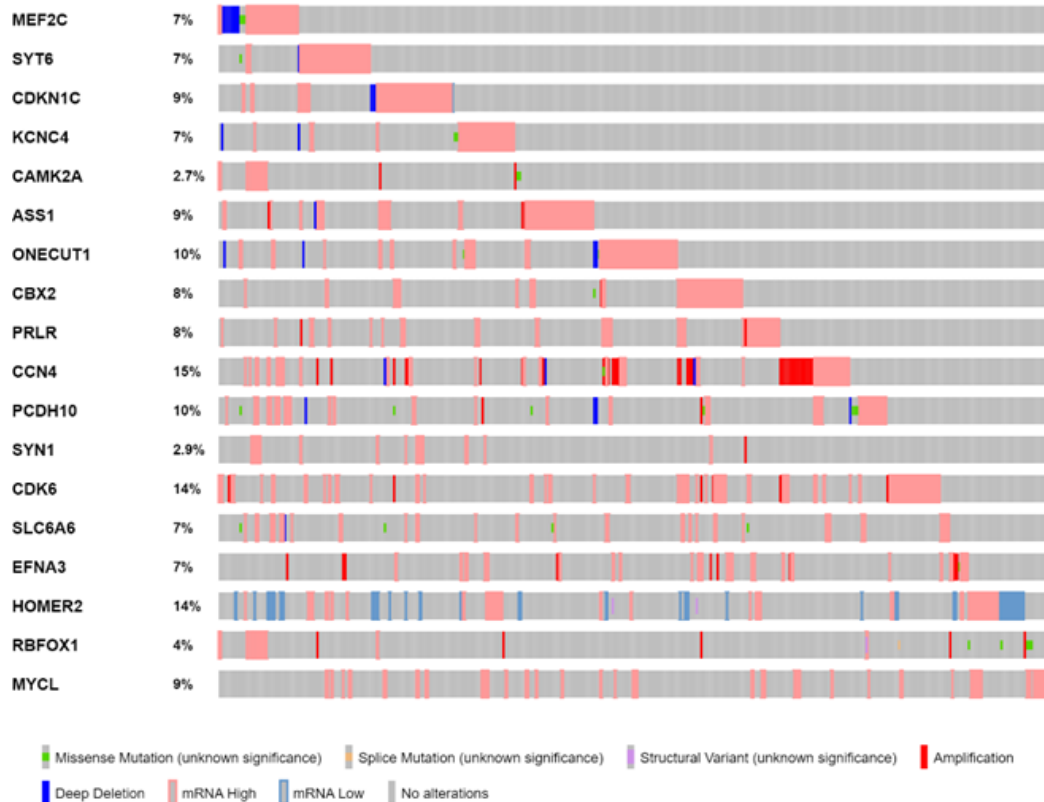


Figura 6. Oncoprint mostrando as principais alterações dos alvos preditos dos miRNAs DE na PV de animais do grupo GLLP e sua associação aos pacientes com CaP humano. Os 18 genes estão alterados em 73% dos pacientes do conjunto de dados Prostate Adenocarcinoma (P PRAD) do The Cancer Genome Atlas (TCGA) (359/489).

5. DISCUSSÃO

Nas últimas décadas o aumento dos casos de CaP vem tornando os estudos que investigam suas causas cada vez mais importantes, com isso o conceito DOHaD se estabeleceu mostrando o quão a desnutrição materna pode ser prejudicial a vida da prole em sua fase adulta, aumentando de forma alarmante os índices de doenças crônicas não transmissíveis, incluindo é claro, câncer de mama e próstata (MERICQ *et al*, 2017; SANTOS *et al*, 2019; 2020; 2022; PORTELA *et al*, 2020; ZAPATERINI *et al*, 2022; GOFFIN 2005; LEVINE 2014; KEINAN-BOKER 2009). Embora a dúvida inicial de vincular a exposição precoce a estressores ambientais com consequências de longo prazo para o CaP, dados experimentais confirmaram que a exposição gestacional e pós-natal precoce ao estrogênio ou desreguladores químicos endócrinos, como ftalatos ou BPA, pode desencadear a biologia do desenvolvimento da próstata, com última consequência para o CaP com o envelhecimento (SCARANO, *et al*, 2019; CHEONG *et al*, 2018). Tal condição foi descrita na população afro-americana, cujas mães apresentaram níveis mais elevados de estrogênio durante a gravidez em comparação com mulheres caucasianas (POWELL, 2001), e os filhos apresentaram altos riscos para câncer de próstata (CaP). Em uma das poucas oportunidades para avaliar o papel da exposição precoce a condições adversas na carcinogênese da próstata humana, (KEINAN-BOKER, 2009) demonstraram que homens judeus expostos à fome e estresse durante o início da vida no Holocausto estão em alto

risco de CaP com o envelhecimento. Dados experimentais também demonstraram que a prole exposta à desnutrição materna estava em alto risco de desenvolver CaP com o envelhecimento (PORTELA, *et al*, 2020; SANTOS, *et al*, 2019; 2020). Então, neste trabalho foram demonstrados achados relevantes em relação ao perfil global de expressão dos miRNAs e potenciais alvos preditos na PV de ratos machos expostos a desnutrição proteica materna na gestação e lactação. Demonstramos, analisando a próstata ventral dos animais submetidos a RPM, que existem uma série de miRNAs desregulados que poderiam vir a servir como biomarcadores que podem estar associados ao desenvolvimento de câncer de próstata na idade avançada.

Analisando os dados brutos obtidos, foi vista uma grande quantidade de miRNAs expressos na PV desses animais, no entanto ao realizarmos filtros e integrá-los os mRNAs, diferencialmente expressos, pudemos dar um significado biológico a essa regulação epigenética. A formação dos 7 clusters de módulos funcionais, nos mostram que os miRNAs estão regulando vias associadas a doenças, resposta celular ao ambiente, metabolismo e vias de crescimento e diferenciação celular. Em conjunto, esses dados indicam que vias clássicas do câncer estão desreguladas (HANNA, 2022).

Por fim associando os genes que regulam essas vias a pacientes humanos com câncer de próstata, pudemos observar que mais de 70% dos pacientes apresentavam alteração estrutural em pelo menos um dos genes identificados, sendo responsáveis por alterações na amplificação, depleção aumento e diminuição da expressão dos níveis de mRNA. No geral, os achados indicam que a restrição proteica materna altera a biologia da próstata no início da vida, predispondo, através de alterações genicas, a uma maior incidência de doenças prostáticas ao atingir a idade avançada.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se então que a restrição proteica materna está relacionada a alterações intrauterinas que desencadeiam um desbalanço de miRNAs envolvidos em vias importantes para o desenvolvimento prostático da prole, acarretando alterações genicas e epigenéticas que podem servir de biomarcadores para o desenvolvimento de doenças relacionadas a próstata na velhice.

REFERÊNCIAS

1. Flodmark, C.-E., Lissau, I., Moreno, L. A., Pietrobelli, A. & Widhalm, K. New insights into the field of children and adolescents' obesity: the European perspective. *Int. J. Obes.* 28, 1189–1196 (2004).
2. Seidell, J. C. & Halberstadt, J. Obesity: The obesity epidemic in the USA — no end in sight? *Nat. Rev. Endocrinol.* 12, 499–500 (2016).
3. Dearden, L. & Ozanne, S. E. The road between early growth and obesity: New twists and turns. *Am. J. Clin. Nutr.* 100, 6–7 (2014).
4. Frank, J. Origins of the obesity pandemic can be analysed. *Nature* 532, 149–149 (2016).
5. Mericq, V. et al. Long-term metabolic risk among children born premature or small for gestational age. *Nat. Rev. Endocrinol.* 13, 50–62 (2016).
6. Barker, D. J., Osmond, C., Golding, J., Kuh, D. & Wadsworth, M. E. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *Bmj* 298, 564–567 (1989).
7. Barker, D. J. P. & Osmond, C. Infant Mortality, Childhood Nutrition, and Ischaemic Heart Disease in England and Wales. *Lancet* 327, 1077–1081 (1986).
8. Schulz, L. C. The Dutch Hunger Winter and the developmental origins of health and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 16757–16758 (2010).
9. Colombelli, K. T. et al. Impairment of microvascular angiogenesis is associated with delay in prostatic development in rat offspring of maternal protein malnutrition. *Gen. Comp. Endocrinol.* 246, 258–269 (2017).
10. De Oliveira, J. C. et al. Protein restriction during the last third of pregnancy malprograms the neuroendocrine axes to induce metabolic syndrome in adult male rat offspring. *Endocrinology* 157, 1799–1812 (2016).
11. Ozanne, S. E. Programming of hepatic and peripheral tissue insulin sensitivity by maternal protein restriction. *Biochem Soc Trans* 27, 94–97 (1999).
12. Ozanne, S. E. Metabolic programming in animals. *Br. Med. Bull.* 60, 143–152 (2001).
13. Pinho, C. F. et al. Gestational protein restriction delays prostate morphogenesis in male rats. *Reprod. Fertil. Dev.* 26, 967–973 (2014).
14. Sene, L. D. B. et al. Involvement of renal corpuscle microRNA expression on epithelial-to-mesenchymal transition in maternal low protein diet in adult programmed rats. *PLoS One* 8, e71310 (2013).
15. Vega, C. C. et al. Resveratrol partially prevents oxidative stress and metabolic dysfunction in pregnant rats fed a low protein diet and their offspring. *J. Physiol.* 594, 1483–1499 (2016).
16. de Brito Alves, J. L. et al. Maternal protein restriction induced-hypertension is associated to oxidative disruption at transcriptional and functional levels in the medulla oblongata. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 43, 1177–1184 (2016).
17. de Brito Alves, J. L. et al. Short- and long-term effects of a maternal low-protein diet on ventilation, O₂/CO₂ chemoreception and arterial blood pressure in male rat offspring. *Br. J. Nutr.* 111, 606–615 (2014).
18. Costa-Silva, J. H. et al. Chronic undernutrition alters renal active Na⁺ transport in young rats: Potential hidden basis for pathophysiological alterations in adulthood? *Eur. J. Nutr.* 48, 437–445 (2009).

19. Falcao-Tebas, F. et al. Maternal low-protein diet-induced delayed reflex ontogeny is attenuated by moderate physical training during gestation in rats. *Br J Nutr* 107, 372–377 (2012).
20. Fidalgo, M. et al. Programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during gestation and lactation are attenuated by maternal moderate–low physical training. *Br. J. Nutr.* 109, 1–8 (2012).
21. Leandro, C. G. et al. Maternal moderate physical training during pregnancy attenuates the effects of a low-protein diet on the impaired secretion of insulin in rats: Potential role for compensation of insulin resistance and preventing gestational diabetes mellitus. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 1–7 (2012).
22. Moisiadis, V. G. & Matthews, S. G. Glucocorticoids and fetal programming part 1: outcomes. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10, 391–402 (2014).
23. Moisiadis, V. G. & Matthews, S. G. Glucocorticoids and fetal programming part 2: mechanisms. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10, 403–411 (2014).
24. Cunha, G. R., Bigsby, R. M., Cooke, P. S. & Sugimura, Y. Stromal-epithelial interactions in adult organs. *Cell Differ.* 17, 137–148 (1985).
25. Marker, P. C., Donjacour, A. a., Dahiya, R. & Cunha, G. R. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev. Biol.* 253, 165–174 (2003).
26. Aumüller, G. & Seitz, J. Protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands. *Int. Rev. Cytol.* 121, 127–231 (1990).
27. Maccioni, M., Cabezas, L. E. & Rivero, V. E. Effect of prostatein, the major protein produced by the rat ventral prostate, on phagocytic cell functions. *Am. J. Reprod. Immunol.* 50, 473–480 (2003).
28. Welsh, M. et al. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *J. Clin. Invest.* 118, 1479–90 (2008).
29. Camargo, A. C. L. et al. Streptozotocin-Induced Maternal Hyperglycemia Increases the Expression of Antioxidant Enzymes and Mast Cell Number in Offspring Rat Ventral Prostate. *Anat. Rec.* 300, 291–299 (2017).
30. Santos, S. A. A. et al. Impact of gestational diabetes and lactational insulin replacement on structure and secretory function of offspring rat ventral prostate. *Gen. Comp. Endocrinol.* 206, 60–71 (2014).
31. Pytlowanciv, E. Z. et al. Differential ontogenetic exposure to obesogenic environment induces hyperproliferative status and nuclear receptors imbalance in the rat prostate at adulthood. *Prostate* 76, 662–678 (2016).
32. Dasgupta, S., Vishwanatha, J. & Srinidhi, S. Oncogenic activation in prostate cancer progression and metastasis: Molecular insights and future challenges. *J. Carcinog.* 11, 4 (2012).
33. Siegel, R., Naishadham, D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2013. *CA. Cancer J. Clin.* 63, 11–30 (2013).
34. INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2020. Available at: <https://www.inca.gov.br/estimativa/estado-capital/brasil>. (Accessed: 28th July 2022)
35. Rinaldi, J. C. et al. Implications of intrauterine protein malnutrition on prostate growth, maturation and aging. *Life Sci.* 92, 763–774 (2013).
36. Santos, S. A. A. et al. Maternal Low Protein Diet Impairs Prostate Growth in Young Rat Offspring and Induces Prostate Carcinogenesis with Aging. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* (2018). doi:10.1093/gerona/gly118
37. Joubert, B. R. et al. DNA Methylation in Newborns and Maternal Smoking in Pregnancy: Genome-wide Consortium Meta-analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 98, 680–696 (2016).

38. Sinclair, K., Lea, R., Rees, W. & Young, L. The developmental origins of health and disease: current theories and epigenetic mechanisms. *Reprod. Domest. Ruminants* 6, 425–443 (2007).
39. Deans, C. & Maggert, K. A. What do you mean, “Epigenetic”? *Genetics* 199, 887–896 (2015).
40. Fernandez-Twinn, D. S., Constância, M. & Ozanne, S. E. Intergenerational epigenetic inheritance in models of developmental programming of adult disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* 43, 85–95 (2015).
41. Allis, C. D. & Jenuwein, T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat. Rev. Genet.* 17, 487–500 (2016).
42. Heerwagen, M. J. R., Miller, M. R., Barbour, L. A. & Friedman, J. E. Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* 299, R711–R722 (2010).
43. Anastasiadou, E., Jacob, L. S. & Slack, F. J. Non-coding RNA networks in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 18, 5–18 (2017).
44. Lane, R. H. Fetal Programming, Epigenetics, and Adult Onset Disease. *Clin. Perinatol.* 41, 815–831 (2014).
45. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123:1939–1951. <https://doi.org/10.1093/JN/123.11.1939>
46. Fischbeck KL, Rasmussen KM (1987) Effect of repeated reproductive cycles on maternal nutritional status, lactational performance and litter growth in ad libitum-fed and chronically food-restricted rats. *J Nutr* 117:1967–1975. <https://doi.org/10.1093/JN/117.11.1967>
47. Rahman, R.-U. et al. Oasis 2: improved online analysis of small RNA-seq data. *BMC Bioinformatics* 19, 54 (2018).
48. Capece, V. et al. Oasis: online analysis of small RNA deep sequencing data. *Bioinformatics* 31, 2205–2207 (2015).
49. R. Aguirre-Gamboa, H. Gomez-Rueda, E. Martínez-Ledesma, A. Martínez-Torteya, R. Chacolla-Huaringa, A. Rodriguez-Barrientos, J. G. Tamez-Peña, & V. Treviño, SurvExpress: An Online Biomarker Validation Tool and Database for Cancer Gene Expression Data Using Survival Analysis. *PLoS ONE*, 8 (2013) 74250. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0074250>.
50. A. M. Bolger, M. Lohse, & B. Usadel, Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30 (2014) 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
51. A. Dobin & T. Gingeras, Mapping RNA-seq Reads with STAR. *Current protocols in bioinformatics*, 51 (2015) 11.14.1-11.14.19. <https://doi.org/10.1002/0471250953.BI1114S51>.
52. Y. Liao, G. K. Smyth, & W. Shi, FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30 (2014) 923–930. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>.
53. C. Trapnell, B. A. Williams, G. Pertea, A. Mortazavi, G. Kwan, M. J. van Baren, S. L. Salzberg, B. J. Wold, & L. Pachter, Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*, 28 (2010) 511–515. <https://doi.org/10.1038/nbt.1621>.
54. M. I. Love, W. Huber, & S. Anders, Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15 (2014) 1–21. <https://doi.org/10.1186/S13059-014-0550-8/FIGURES/9>.