

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta Tese
será disponibilizado somente a partir
de 21/11/2022.



Instituto de Biociências



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



PG-BGA

Perfil global de expressão de MicroRNAs na próstata ventral de ratos submetidos à restrição proteica materna: Efeitos perinatais e reflexos no envelhecimento

MS. FLÁVIA BESSI CONSTANTINO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Estrutural e Funcional.

BOTUCATU – SP

2021



Instituto de Biociências



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



PG-BGA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências-Departamento de Biologia Estrutural e Funcional

Perfil global de expressão de MicroRNAs na próstata ventral de ratos submetidos à restrição proteica materna: Efeitos perinatais e reflexos no envelhecimento

MS. FLÁVIA BESSI CONSTANTINO

PROF. DR. LUIS ANTONIO JUSTULIN JUNIOR

PROF. DR. ROBSON FRANCISCO CARVALHO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Estrutural e Funcional.

BOTUCATU – SP

2021

Ficha catalográfica

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

Constantino, Flavia Bessi.

Perfil global de expressão de MicroRNAs na próstata ventral de ratos submetidos à restrição proteica materna : efeitos perinatais e reflexos no envelhecimento / Flavia Bessi Constantino. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Luis Antonio Justulin Junior

Coorientador: Robson Francisco Carvalho

Capes: 20603002

1. Próstata - Câncer. 2. MicroRNAs. 3. Carcinogênese. 4. Ratos Sprague-Dawley. 5. Dieta de baixo teor proteico.

Palavras-chave: Cancer; DOHaD; Prostata; miRNAs.

A minha Família, Namorado e Amigos...

Dedico

Agradecimentos

Ao **Dr. Luis Antonio Justulin Junior**, pelo conhecimento compartilhado, pela confiança em meu trabalho, por sempre acreditar em meu potencial e me apoiar sempre, sem você não teria chegado tão longe. Obrigada por me receber de braços abertos no laboratório e me tornar uma amante da pesquisa.

Ao **Laboratório de Matriz Extracelular (Labmec)** e agregados, pelo companheirismo, conhecimento compartilhado, por todo apoio em momentos difíceis e pelas risadas.

Ao **Miguel Antunes**, por sempre acreditar em mim, me fazer buscar sempre mais, por todo apoio e carinho. Obrigada por além de ser meu técnico, ser meu amigo.

A **minha Família**, por sempre serem meu porto seguro e me fazerem alçar voos mais altos. Obrigada por sempre me apoiarem e estarem sempre presentes mesmo longe.

Ao **Renato Colenci**, por sempre estar ao meu lado, por me fazer uma pessoa melhor, por sempre me ouvir e dar conselhos, por fazer meus dias mais felizes. Obrigada, sem o seu apoio não teria conseguido.

As agências de fomento **FAPESP** (processo nº2017/08716-6) e **CAPEs** pelo suporte financeiro.

E a **todos que contribuíram** de alguma forma para o meu crescimento e para a confecção desta tese.

*"A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que
ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê."*

(Arthur Schopenhauer)

Sumário

Lista de abreviaturas	9
Lista de Figuras	11
Lista de tabelas	12
Resumo	14
Capítulo 1: Revisão Bibliográfica.....	15
1.1 Programação Fetal.....	15
1.2 Programação Fetal e baixa ingesta de Proteína	16
1.3 Próstata e a programação Fetal por baixa ingesta de proteína.....	18
1.4 Mecanismos Epigenéticos Envolvidos na Programação Fetal	22
Referencias	27
Capítulo 2: MiRNAome integrative analysis reveals molecular mechanisms associated with development of PCa in the offspring subjected to maternal low protein diet.	28
Abstract.....	29
1.0 Introduction	30
2.0 Material and Methods.....	32
3.0 Results	39
4.0 Discussion.....	49
5.0 Referencie	54
Capítulo 3: Prediction of non-canonical routes for SARS-CoV-2 infection in human placenta cells – submitted to Science Signaling.....	67
Abstract.....	69
1. Introduction	70
2. Results	72

3. Discussion	74
4. Materials and Methods	77
References	79

Lista de abreviaturas

ACE2: angiotensin-converting enzyme 2
BPH: Benign prostatic hyperplasia
CaP: câncer de próstata
CEEa: Comissão de Ética na Experimentação Animal
COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COVID-19: coronavirus disease 2019
CTR: Controle
CTSL: cathepsin L
CUG: complexo urogenital
DAG: distância ano genital
DEGs: differentially expressed genes
DG: Dia gestacional
DM2: Diabetes mellitus do tipo 2
DNMT: DNA metil transferases
DOHaD: Developmental Origins of Health and Disease
DPN: dias pós-natal
DPP4: dipeptidyl peptidase 4
GEO: Gene Expression Omnibus
GLLP: *Gestational and lactational low protein diet*
GSEA: Gene Set Enrichment Analysis
GSH: Glutathione Peroxidase
HAC: histona acetilase
HDAC: deacetilase
HE: hematoxilina-eosina
HPB: hiperplasia prostática benigna
IGF-1: Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
KOBAS: *KEGG Orthology Based Annotation System*
LPD: Low protein diet

LR: Likelihood Ratio
miRNA: microRNAs
mRNAs: RNA mensageiro
ORF8: open reading frame 8
PA: lobo anterior
PCA: análise de componentes principais
PCa: Prostate cancer
PDL: lobo dorsolateral
PF: Programação Fetal
PND: Postnatal day
PPI: protein-protein interactions
PTHrP: *parathyroid hormone-related protein*
PV: lobo ventral
RBD: receptor-binding domain
RTKs: receptores de tirosina-quinase
SARS-CoV-2: severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
Shh: Sonic hedgehog
SOD: Superóxido Dismutase
Tbx3: *T-box transcription factor*
TCGA: *The Cancer Genome Atlas*
TMPRSS2: cellular transmembrane serine protease 2
USG: seio urogenital
ZIKV: Zika virus

Lista de Figuras

Capítulo 1

Figura 1. Organização anatômica da próstata.

Figura 2. Estágios do desenvolvimento da próstata de rato e humano.

Figura 3. Esquema da glândula prostática. Imagem de Mateus Betta de Oliveira

Figura 4. Esquema da biogênese dos miRNAs.

Capítulo 2

Figure 1. The GLLP group has lower weight, late prostate development and a higher level of testosterone and estrogen.

Figure 2. MiRNAs differentially expressed in the GLLP group have predicted targets related to interesting enriched pathways.

Figure 3. GLLP group presents some deregulated miRNAs in common with prostate cancer patients.

Figure 4. Expression of mir-33-5p using the RT-qPCR technique in different organs showing the lower expression in prostate, testicle and liver and a higher level in adrenal gland in GLLP group when compared to CTR.

Figure 5. miR-33a-5p overexpression causes low levels of cell viability

Figure 6. The predicted mir-33-5p targets are involved in all selected pathways and with prostate cancer.

Capítulo 3

Figure 1. The expression landscape of human placenta proteins potentially interacting with SARS-CoV-2.

Figure 2. Single-cell analysis of the human placenta indicates potential non-canonical routes of SARS-CoV-2.

Supplementary Figure 1. Gene expression profile of gestational trimesters and its potential to interact with SARS-CoV-2 proteins.

Supplementary Figure 2. Gene expression of ACE2, TMPRSS2, CTSL, DPP4, DAAM1, and PAICS in scRNA-seq of fetal tissues.

Lista de tabelas

Capítulo 1

Capítulo 2

Table 1. Rat and prostate weight and stereological results.

Supplementary Table 1. Differentially expressed miRNAs in prostate tissue between CTR group and GLLP group (Log2FC $\geq$ |0.4|; FDR < 0.05).

Supplementary Table 2. Target prediction analysis of the differentially expressed miRNAs generated in the mirwalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>)

Supplementary Table 3. Differentially expressed mRNAs and proteins in prostate tissue between the CTR GLLP groups of rats on the postnatal day 21 (mRNAs-Log2FC $\geq$ |0.66|; p value < 0.05. Proteins-Log2FC $\geq$ |1|; p value < 0.05).

Supplementary Table 4. Integrative analysis combining the prediction of the miRNAs targets with differentially expressed mRNAs and proteins, taking into account inverted log2 fold change values.

Supplementary Table 5. Functional enrichment analysis x up-regulated targets resulting from the integrative analysis using the KOBAS tool (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/kobas3/?t=1>) [DOI:10.1093/nar/gkr483]

Supplementary Table 6. Functional enrichment analysis x down-regulated targets resulting from the integrative analysis using the KOBAS tool (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/kobas3/?t=1>) [DOI:10.1093/nar/gkr483]

Supplementary Table 7. Differentially expressed miRNAs in prostate tissue between CTR and cancer groups (Log2FC $\geq$ |0.4|; FDR < 0.05) from The Cancer Genome Atlas (TCGA).

Supplementary Table 8. Deregulated miRNAs shared by rats and patients with prostate cancer.

Capítulo 3

Supplementary Table 1. Differentially expressed genes in placenta tissue during the gestation (1^o trimester x 2^o trimester and 1^o trimester x 3^o trimester; Log2FC $\geq$ |0.5|; FDR < 0.05).

Supplementary Table 2. Functional enrichment analysis generated in the Metascape tool (<https://metascape.org>) [DOI: 10.1038/s41467-019-09234-6] for each cluster generated for placenta gene expression during gestation.

Supplementary Table 3. Functional enrichment analysis list generated in the Metascape tool (<https://metascape.org>) [DOI: 10.1038/s41467-019-09234-6] for DEGs in the placenta tissues (1^o trimester x 2^o trimester and 1^o trimester x 2^o trimester).

Supplementary Table 4. Human-SARS-CoV Interactome based on the in silico computational framework P-HIPSTer (<http://hipster.org/>).

Supplementary Table 5. Human-ZIKA Interactome based on the in silico computational framework P-HIPSTer (<http://hipster.org/>).

Supplementary Table 6. The Human-SARS-CoV interactome obtained in the P-HIPSTer (<http://hipster.org/>) for placenta.

Supplementary Table 7. The Human-ZIKA interactome obtained in the P-HIPSTer (<http://hipster.org/>) for placenta.

Supplementary table 8. Human-SARs Interactome based on literature.

Resumo

Nas últimas décadas, foi observado aumento na incidência de câncer na população. Estudos mostram que o câncer pode se originar de insultos sofridos por indivíduos durante a vida intrauterina, visto que este período é caracterizado pela capacidade do embrião/feto em se adaptar às mudanças ambientais, alterando a expressão gênica por mecanismos pós-transcricionais. Já foi demonstrado que a restrição proteica materna promove a carcinogênese da próstata em ratos idosos; No entanto, há falta de informações sobre o mecanismo molecular envolvido nesse processo. Assim, objetivamos identificar os possíveis microRNAs desregulados em ratos jovens programados e localizar seus possíveis alvos associados à carcinogênese da próstata. Para isso, ratos machos Sprague Dawley nascidos de mães alimentadas com dieta padrão (17% de proteína), grupo controle (CTR), ou dieta pobre em proteínas (6% de proteína), grupo *gestational and lactational low protein diet* (GLLP), durante a gestação e lactação foram sacrificados no dia pós-natal 21. O sangue foi coletado para análises hormonais e a próstata ventral foi processada para morfologia e por sequenciamento, HigSeq -2500 Illumina, para determinar o perfil do microRNoma. Dados de sequenciamento de miRNAs de pacientes com câncer de próstata, oriundos do *the cancer genome atlas* (TCGA), foram reanalisados para comparação com os resultados de ratos. Além disso, foi realizada a transfecção do miR-33 em células PNT-2 para avaliar a expressão de seus alvos e a viabilidade celular após tratamento através da técnica de MTT. Assim, foi observado atraso no desenvolvimento da próstata ventral e aumento dos níveis de testosterona e expressão de estrogênio em ratos GLLP. Além disso, 20 miRNAs foram identificados como diferencialmente expressos, 6 *down* regulados e 14 *up* regulados. Os resultados de enriquecimento para miRNAs *down* regulados estão relacionados às vias do câncer e da angiogênese, enquanto os miRNAs *up* regulados estão enriquecendo vias de retículo endoplasmático e de carcinoma. A reanálise do sequenciamento de miRNA de TCGA revelou 7 em comum com o grupo GLLP. Um deles é o miR-33 que, além de ser *down* regulado na próstata, também é desregulado no testículo, na glândula adrenal e no fígado, dados gerados através do RTq-PCR. Sua supra expressão nas células transfectadas causou uma diminuição na viabilidade celular e seu alvo, CYP1B1, é uma enzima importante no metabolismo do estrogênio, que pode levar à carcinogênese mediada por mudanças nos níveis hormonais e transformação do estradiol. Concluímos que o miR-33 é um alvo importante para explicar as alterações causadas pela LPD materna podendo, ser considerado um considerável biomarcador por ser desregulado em vários órgãos analisados.

Palavras-Chave: Programação Fetal, Câncer de Próstata e MicroRNAs