

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Metilação de DNA como mecanismo epigenético da modulação de proteínas e genes diferencialmente expressas na próstata ventral de ratos submetidos à restrição proteica materna e em pacientes com câncer de próstata. Abordagem translacional *in silico*.

RAQUEL TOSHIE SAKAKIBARA

PROF.DR. LUIS ANTÔNIO JUSTULIN JR

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção de Bacharel em Ciências Biomédicas.

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

Sakakibara, Raquel Toshie.

Metilação de DNA como mecanismo epigenético da modulação de proteínas diferencialmente expressas na próstata ventral de ratos submetidos à restrição proteica materna e em pacientes com câncer de próstata : abordagem translacional in silico / Raquel Toshie Sakakibara. - Botucatu, 2022

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Luis Antônio Justulin Jr

Coorientador: Luis Marcos Frediani Portela

Capes: 20601000

1. Próstata - Câncer. 2. Câncer - Pacientes. 3. Metilação de DNA. 4. Epigenética. 5. Dieta com restrição de proteínas.

Palavras-chave: Câncer de próstata; DOHaD; Epigenética.

AGRADECIMENTOS

- ❖ Agradeço ao meu grupo do Laboratório DBMOL do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional – IBB/UNESP por todo o auxílio durante o trabalho;
- ❖ Agradeço à CNPq pelos recursos do processo 4098 4/2021 que possibilitaram a execução desse trabalho.

RESUMO

O conceito de DOHaD (Origens do Desenvolvimento da Saúde e da Doença) busca compreender a correlação entre a ocorrência de doenças metabólicas durante a vida adulta com injúrias sofridas durante o desenvolvimento intrauterino. Um dos modelos experimentais mais utilizados para esses estudos é a submissão de roedores a restrição proteica materna (RPM) durante a gestação e/ou a lactação, sendo descrito nesse modelo baixo peso da prole ao nascimento, alterações metabólicas sistêmicas, além de alterações órgão-específicas, incluindo próstata, sendo reportado atraso no desenvolvimento e aumento da incidência de câncer de próstata (CaP) com o envelhecimento. Os principais mecanismos epigenéticos abrangem a metilação de DNA, modificação pós-transcricional de histonas e RNAs não codificantes. Em destaque a metilação de DNA é uma modificação química herdável que ocorre em regiões promotoras de genes e tem papel significativo na regulação e no silenciamento da expressão gênica. O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial dos mRNAs (GDEs) e proteínas diferencialmente expressas (PDEs) na próstata ventral (PV) de ratos submetidos à RPM, no final do desenvolvimento prostático no DPN 21, integrando-os aos dados de metilação de DNA do *The Cancer Genoma Atlas – (PRAD-TCGA)* de pacientes com CaP. Na metodologia utilizamos os dados de RNA-Seq (GSE180673) e proteômica gerados pelo nosso grupo de pesquisa da PV de animais submetidos a RPM no DPN 21, e comparamos com os dados globais de metilação de CaP do TCGA-PRAD (499 amostras de CaP e 50 de tecidos normais adjacentes ao tumor) utilizando o pacote *TCGAbiolinks*. Identificamos as “ilhas CpG” (Probes ID) diferencialmente metiladas (DMGs), depois os relacionamos com os GDEs e PDEs na PV dos animais submetidos à RPM. Em seguida, utilizamos a ferramenta Shiny GO para análise funcional dos processos biológicos. O *The Human Protein Atlas* (HPA) database foi utilizado para a detecção da imunohistoquímica dos respectivos genes no tecido prostático normal e tumoral. A determinação da expressão gênica foi feita através do RT-qPCR. Nossos resultados demonstraram que a RPM altera os parâmetros epigenéticos durante o início da vida e persiste na vida adulta, destacando o gene *Cyp7b1* como um possível biomarcador da origem desenvolvimentista do CaP.

Palavras-chaves: Epigenética; DOHaD e Câncer de próstata.

ABSTRACT

The concept of DOHaD (Origins of Developmental Health and Disease) seeks to understand the correlation between the occurrence of metabolic diseases during adult life and injuries suffered during intrauterine development. One of the most used experimental models for these studies is the submission of rodents to maternal protein restriction (PMR) during pregnancy and/or lactation, being described in this model low weight of the offspring at birth, systemic metabolic alterations, in addition to organ-organ alterations. including prostate, developmental delay and increased incidence of prostate cancer (PCa) with aging have been reported. The main epigenetic mechanisms include DNA methylation, post-transcriptional modification of histones and non-coding RNAs. Highlights DNA methylation is an heritable chemical modification that occurs in gene promoter regions and plays a significant role in the regulation and silencing of gene expression. The objective of this work was to evaluate the potential of mRNAs (GDEs) and differentially expressed proteins (PDEs) in the ventral prostate (PV) of rats submitted to RPM, at the end of prostatic development in DPN 21, integrating them with DNA methylation data from The Cancer Genome Atlas – (PRAD-TCGA) of patients with PCa. In the methodology, we used RNA-Seq (GSE180673) and proteomics data generated by our PV research group from animals submitted to RPM at DPN 21, and compared with the global CaP methylation data from TCGA-PRAD (499 samples of CaP and 50 from normal tissues adjacent to the tumor) using the TCGAbiolinks package. We identified the differentially methylated “CpG islands” (Probes ID) (DMGs), then related them to the GDEs and PDEs in the PV of the animals submitted to RPM. Then, we used the Shiny GO tool for functional analysis of biological processes. The Human Protein Atlas (HPA) database was used for immunohistochemical detection of the respective genes in normal and tumoral prostate tissue. The determination of gene expression was performed using RT-qPCR. Our results demonstrated that RPM alters epigenetic parameters during early life and persists into adulthood, highlighting the *Cyp7b1* gene as a possible biomarker of the developmental origin of CaP.

Keywords: Epigenetics; DOHaD and Prostate Cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Heatmap representando os níveis de expressão gênica na próstata ventral (PV) de roedores controles (CTR) e submetidos à restrição proteica materna (GLLP).....	15
Figura 2 – Diagrama de Venn.....	16
Figura 3 – Diagrama de Venn.....	16
Figura 4 – Gráfico de Enriquecimento Funcional.....	18
Figura 5 – Imunomarcção dos genes no tecido prostático normal e tumoral gerados pelo The Human Protein Atlas.....	19
Figura 6 – Representação gráfica da expressão gênica obtida através da validação do gene <i>Cyp7b1</i>	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de primers para o método MSP.....	14
--	----

Sumário

1. INTRODUÇÃO	7
1.1. Enunciado do problema.....	7
1.2. A origem desenvolvimentista da Saúde e da Doença (DOHaD).....	7
1.3. Restrição Proteica Materna (RPM)	8
1.4. Alterações prostáticas desencadeadas pela RPM	9
1.5. Epigenética e DOHaD	9
2. OBJETIVOS	10
2.1. Objetivos específicos.....	10
3. METODOLOGIA	10
3.1. Os animais	10
3.2. Processamento do sequenciamento de mRNAs	11
3.3. Análise de proteínas diferencialmente expressas (PDEs)	12
3.4. Identificação do perfil global de metilação do CaP humano.....	12
3.5. Análise de comparação entre metilação e genes/proteínas diferencialmente expressas	13
3.6. Análise de enriquecimento funcional das vias moleculares e validações <i>in silico</i>	13
3.7. Validação da expressão gênica em RT-qPCR.....	13
3.8. PCR de metilação específica (MSP)	14
4. RESULTADOS	15
4.1. mRNAs e PDEs na PV de animais submetidos à RPM	15
4.2. Perfil global de metilação dos pacientes com CaP.....	15
4.3. Análise integrativa das PDEs e GDEs.....	15
4.4. Identificação das vias moleculares	17
4.5. Validação <i>in silico</i> em tecido tumoral prostático humano	18
4.6. Validação da expressão gênica da <i>Cyp7b1</i> em PV de animais submetidos à RPM	19
5. DISCUSSÃO	20
6. CONCLUSÃO.....	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

1. INTRODUÇÃO

1.1. Enunciado do problema

Nos últimos anos a Organização das Nações Unidas (ONU) têm pautado suas prioridades no marco dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Agenda de 2030, em que tem como propósito o apelo global para a implementação de políticas públicas até 2030 a fim de garantir uma melhor qualidade de vida mundial. Nas primeiras metas da ODS destacam-se: 1) a erradicação da pobreza, 2) Fome zero, agricultura sustentável, e 3) a saúde e bem-estar para todos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). Isso se torna uma problemática ainda maior quando pensamos na fome no mundo, onde inúmeros estudos associam-na ao aumento da incidência de doenças e o comprometimento da qualidade de vida do indivíduo (MERICQ *et al.*, 2016), logo é de suma importância a redução da desnutrição global.

Existem, vários tipos de desnutrição, dentre elas podemos citar a mais prevalente que é a desnutrição proteica, o qual é caracterizada pelo déficit na oferta de macronutrientes ao indivíduo levando-o ao desequilíbrio metabólico e a susceptibilidade a contrair doenças tais como obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares, renais e hepáticas (LEE, 2015). Infelizmente, ao longo dos últimos anos houve o aumento global do quadro de fome e pobreza pelo mundo, em destaque para os países em desenvolvimento, incluindo o Brasil. O relatório da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO do inglês, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*), estima-se que em 2022 mais de 828 milhões de pessoas no mundo sofrem com insegurança alimentar, e no Brasil esse número ultrapassa os 50 milhões de brasileiros, sendo que destes 33 milhões de brasileiros passam fome (FAO, 2022). Essa problemática torna-se ainda mais grave quando afetam mais jovens e mulheres em idade reprodutiva.

1.2. A origem desenvolvimentista da Saúde e da Doença (DOHaD)

Nas últimas décadas, houve inúmeros estudos acerca da compreensão entre a correlação da incidência de doenças metabólicas na vida adulta com os insultos ocorridos durante o desenvolvimento intrauterino. Em estudos pioneiros realizados pelo médico epidemiologista inglês David Barker e seus colaboradores, foram propostos que a restrição do crescimento intrauterino e pós-natal poderia ser um importante fator de risco para o desenvolvimento de hipertensão e doenças cardíacas na vida adulta, dando origem a *Hipótese*

de Barker (BARKER, 1990; BARKER *et al.*, 1989). Posteriormente, essa hipótese alavancou discussões na comunidade científica sobre **Programação Fetal** (PF) (LUCAS, 1991), estimulando um estudo com a temática “*Developmental Origins of Health and Disease*” (DOHaD) que contou com o apoio de políticas públicas e instituições de pesquisas ao redor do mundo (SCHULZ, 2010). Outro estudo de extrema importância e que sedimentou a Hipótese de Barker, foi realizado por Ravelli e seus colaboradores (1976), o qual foi baseado no episódio trágico da 2ª Guerra Mundial (1944-1945) conhecido como o Inverno da Fome Holandesa (*Dutch Hunger Winter*) (RAVELLI; STEIN; SUSSER, 1976). A partir desse episódio, diversos autores demonstraram que a desnutrição materna causa um impacto negativo sobre a prole e seus efeitos dependem do período gestacional em que o insulto ocorreu.

1.3. Restrição Proteica Materna (RPM)

Um dos modelos mais utilizados para estudos DOHaD, é a submissão de roedores à restrição proteica materna (RPM) durante a gestação e/ou lactação. Já foi atrelado a esse modelo de RPM baixo peso da prole ao nascer (COLOMBELLI *et al.*, 2017; RINALDI, *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2019), menor distância ano-genital (DAG) que é um importante fator associado a desenvolvimento genital, alterações metabólicas e órgão-específicas (RINALDI, *et al.*, 2018). Outro ponto relevante sobre o desenvolvimento da prole submetida à RPM, é que posteriormente desenvolvem um crescimento pós-natal acelerado (*catch-up growth*) e apresentam uma maior disposição a ter resistência à insulina e a diabetes tipo II na vida adulta (BERENDS *et al.*, 2013; KESAVAN; DEVASKAR, 2019), e isso é devido às alterações na expressão gênica os quais temos os mecanismos epigenéticos, que como consequência são alterações metabólicas sistêmicas e órgãos-específicas. Essas alterações são: na arquitetura do sistema nervoso central (GOULD *et al.*, 2018), diminuição da atividade dos hepatócitos (CAMPISANO *et al.*, 2017; MARTIN *et al.*, 2018; RAMADAN; ALSHIRAIHI; AL-KARIM, 2013), diminuição das células β pancreáticas que leva a uma diminuição dos níveis de insulina circulante (MORIMOTO *et al.*, 2012; SU *et al.*, 2016), redução de aproximadamente um terço do número de néfrons nos rins (RIZZI *et al.*, 2017), bem como alterações no sistema reprodutor feminino e masculino (GUZMÁN *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2019; ZAMBRANO *et al.*, 2014), favorecimento do surgimento do câncer de mama após exposição ao desregulador endócrino bisfenol A (BPA) (VARUZZA *et al.*, 2019), alteração na produção de espermatozoides no testículo (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2014, 2012), da vascularização, secreção epididimária (CAVARIANI *et al.*, 2019; DE MELLO SANTOS

et al., 2019) e alterações prostáticas (COLOMBELLI *et al.*, 2017; PORTELA, *et al.*, 2021; RINALDI, Jaqueline *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2020, 2019)

1.4. Alterações prostáticas desencadeadas pela RPM

A próstata é uma glândula acessória do sistema reprodutor masculino cujo seu desenvolvimento e homeostasia está sob o controle de hormônios androgênicos (CUNHA *et al.*, 2004). Nosso grupo de pesquisa nos últimos anos vem se dedicando a compreender quais são os efeitos desencadeados pela RPM na próstata, sendo descrito um atraso do desenvolvimento prostático em animais no dia pós-natal (DPN) 10 e 21 (COLOMBELLI *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2020, 2019), com um aumento de 50% na incidência do câncer de próstata (CaP) ao envelhecimento, sendo relatado alterações no padrão de resposta antioxidante e no perfil proteômico da glândula prostática no início da vida e no envelhecimento, sendo identificadas já no início da vida, a desregulação de vias moleculares associadas a carcinogênese prostática (PORTELA, *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2020, 2019). Além disso, foram realizadas análises de *RNA-Seq* e *small RNA sequence* da próstata desses animais para compreender o perfil global de expressão de mRNAs e miRNAs, esses dados encontram-se disponíveis no *Gene Expression Omnibus database* (GEO), sob código de acesso GSE180673 e GSE180674. Santos e seus colaboradores (2022) descreveram que a PV dos animais envelhecidos apresentou alterações em miRNAs que poderiam estar associados ao desenvolvimento ao CaP, bem como descreveram o papel funcional do miR-18a-5p em células prostáticas (SANTOS *et al.*, 2022).

1.5. Epigenética e DOHaD

Dentre os principais mecanismos epigenéticos temos a metilação do DNA, a modificação pós-transcricional de histonas e os RNAs não codificantes (ALLIS; JENUWEIN, 2016; HEERWAGEN *et al.*, 2010). As alterações epigenéticas podem aumentar ou inibir na transcrição de genes, levando a uma hipermetilação ou hipometilação do DNA. Desse modo, com a hipermetilação da região promotora da ilha CpG, a desacetilação de histonas e a hipometilação genômica global pode ocorrer o silenciamento transcricional dos genes supressores tumorais, ocasionando em processos patológicos como a carcinogênese (DAVALOS; ESTELLER, 2022; ESTELLER, 2002).

Por conseguinte, alguns estudos demonstraram que o aumento do estresse materno ocasionado pela desnutrição proteica e consequentemente o desequilíbrio da homeostasia do

organismo, está relacionado com alterações nas regiões de metilação do DNA e na programação fetal (GOYAL; LIMESAND; GOYAL, 2019). Entretanto, a exploração de mecanismos epigenéticos clássicos de metilação de DNA, que regulam tais processos, ainda não foram identificadas.

2. OBJETIVOS

Avaliar o potencial dos mRNAs e proteínas diferencialmente expressas na próstata ventral (PV) de ratos submetidos à RPM, no final do desenvolvimento prostático no dia pós-natal (DPN) 21, a serem metiladas a partir da integração dos dados de metilação de DNA do *The Cancer Genoma Atlas (Prostate Adenocarcinoma - PRAD-TCGA)* de pacientes com câncer de próstata (CaP).

2.1. Objetivos específicos

- ❖ Identificar as regiões diferencialmente expressas metiladas a partir de dados disponíveis do TCGA-PRAD;
- ❖ Caracterizar o perfil de metilação de DNA dos ProbesID diferencialmente metilados (GDMs);
- ❖ Comparar e integrar os dados dos ProbesID diferencialmente metilados (DMGs) com os genes e proteínas diferencialmente expressas (GDEs e PDEs) na PV dos animais submetidos à RPM no DPN21 e DPN540, e a partir disso selecionar os alvos importantes;
- ❖ A partir da análise dos alvos, identificar os termos ontológicos e as vias moleculares que são reguladas pelos alvos selecionados;
- ❖ Validar a expressão gênica de um alvo por RT-qPCR na PV de ratos submetidos à RPM no DPN21 e DPN540.

3. METODOLOGIA

3.1. Os animais

Foram utilizados ratos *Sprague Dawley* pesando de 200 a 300g, machos e fêmeas adultos, esses animais e suas proles foram mantidos no Biotério de Roedores do Setor de Morfologia, do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, IBB-UNESP, em caixas de polietileno, sendo dois animais por caixa, com substrato de maravalha autoclavada, em

condições controladas de luminosidade e temperatura média a 25°C, sendo ministrado água filtrada e ração *ad libitum*.

Após o período de adaptação, às ratas com 3 meses com aproximadamente 120 dias de idade pós-natal (DPN) foram submetidas ao sistema de acasalamento de harém, sendo 3 fêmeas para 1 macho. Depois de verificado a prenhez, através de esfregaço vaginal, 24 ratas foram colocadas, de maneira aleatória, em caixas individuais e foram alimentadas durante a gestação e lactação com ração padrão para roedores (grupo controle (CTR), n = 12, 17% de proteína) ou com ração hipoproteica (grupo de restrição proteica na gestação e lactação (GLLP), n = 12, 6% de proteína). A ração utilizada foi a AIN-93 modificada, seguindo os padrões descritos por Reeves e seus colaboradores (1993), sendo que as dietas são isocalóricas e normossódicas (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). Estas formulações já foram empregadas pelo nosso grupo de pesquisa em outros experimentos (COLOMBELLI *et al.*, 2017; PORTELA, *et al.*, 2021; RINALDI, *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2020, 2019). Posteriormente ao nascimento das proles, foram padronizados os números de animais para 8 filhotes por rata (proporção entre machos e fêmeas de 1:1), de forma que não ocorressem mudanças no cuidado materno. Desse modo, foram usados para a fase experimental 4 filhotes machos de cada rata, sendo 2 deles eutanasiados no dia pós-natal (DPN) 21 e os outros 2 no dia pós-natal (DPN) 540. No momento da eutanásia, a próstata ventral (PV) foi coletada, pesada e congelada a -80°C, até o ponto de extração do RNA total para o sequenciamento. Todos os experimentos seguiram as recomendações dos Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA) do Instituto de Biociências/UNESP (Protocolo nº 573).

3.2. Processamento do sequenciamento de mRNAs

Seguindo as instruções do fabricante, a extração de RNA foi realizada com Trizol (Ambion, EUA) contendo 1% de β -Mercaptoetanol. Utilizamos 5 amostras do grupo CTR e 4 amostras do grupo GLLP para sequenciamento de RNA de animais no DPN21. O NanoDrop (Thermo Scientific, EUA) foi utilizado para quantificar o RNA por espectrofotometria, o *RNA Integrity Number* (RIN) foi usado para medir a qualidade do RNA, o qual foi obtido através do sistema 2100 Bioanalyzer (Agilent, EUA). Sendo que apenas as amostras de RNA com RIN > 8 foram usadas para as próximas etapas. Os sequenciamentos foram realizados pela empresa Macrogen, na Coreia do Sul.

Os dados brutos foram analisados em termos de qualidade de leitura por meio do software FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) para avaliar as leituras e a baixa qualidade do adaptador. Posteriormente, foram removidas as sequências adaptadoras usando o software Trimmomatic (v. 0.36) (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014). Após o processamento por mídia com qualidade e de leitura, as leituras restantes foram alinhadas ao 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) (DOBIN; 2015; 2016). Os arquivos resultantes foram processados através do software Feature Counts (LIAO; SMYTH; SHI, 2014) para obter read counts e Cufflinks e assim obter fragmentos por kilobase de transcrição por milhão (FPKM) (TRAPNELL *et al.*, 2010). O diferencial de expressão (DE) dos mRNAs foram realizados em linguagem R, utilizando o pacote DESeq2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014). Foram considerados diferencialmente expressos os que apresentaram Fold Change $|\pm 0,66|$, com FDR > 0.05.

3.3. Análise de proteínas diferencialmente expressas (PDEs)

Os dados das PDEs na PV de ratos submetidos à RPM de animais no DPN21 foram extraídos do trabalho de Santos e seus colaboradores (2020). Foram consideradas PDEs consideradas up-reguladas ou down-reguladas, Log2 de Fold Change com $p > 0,95$ $p < 0,05$, respectivamente.

3.4. Identificação do perfil global de metilação do CaP humano

Para identificar o perfil global de metilação do CaP humano, utilizamos os dados brutos do estudo de *Prostate Adenocarcinoma* do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA-PRAD), adquiridos através do pacote *TCGAbiolinks* em linguagem R. Esse conjunto de dados possui 499 amostras de pacientes diagnosticados com CaP (amostras tumorais) e 50 amostras de tecidos normais adjacentes ao tumor (NAT, não tumoral). Os valores de metilação de DNA, descritos como valores de beta de metilação de DNA, que são variáveis contínuas entre 0 e 1, representam a razão entre a intensidade do tipo de grânulo metilado e a intensidade do locus combinada. Assim, valores beta mais elevados representam um nível mais elevado de metilação de DNA (hipermetilação), e valores beta mais baixos representam um nível mais baixo de metilação de DNA, hipometilação. Foram considerados diferencialmente expressos se a diferença média de metilação foi > 0.25 com um FDR de 5%.

3.5. Análise de comparação entre metilação e genes/proteínas diferencialmente expressas

Para avaliar o impacto da metilação de DNA na regulação local da expressão gênica dos genes codificadores de proteínas, foram realizadas uma correlação entre os valores β de CpGs localizados em regiões promotoras dos dados do TCGA e os valores de expressão (Log2 Fold Change) dos PDEs e GDEs correspondentes nos animais do grupo GLLP. Posteriormente, foram observadas as associações entre metilação-GDEs/PDEs.

3.6. Análise de enriquecimento funcional das vias moleculares e validações *in silico*

A análise de enriquecimento funcional das vias moleculares foi realizado através da ferramenta ShinyGO (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>), na qual utiliza banco de dados do Gene Ontology (<http://geneontology.org/>) e KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), e produz diagramas com seus genes destacados, árvores de agrupamento hierárquico. Após a identificação das vias moleculares, foram selecionados genes/proteínas para as validações *in silico*, através da mensuração da imunomarcação em tecidos prostáticos normais e tumorais, utilizando a plataforma *The Human Protein Atlas* (HPA) database (<https://www.proteinatlas.org/>).

3.7. Validação da expressão gênica em RT-qPCR

Em seguida, foi selecionado um gene para ter a validação da sua expressão gênica por RT-qPCR em amostras da PV de animais no DPN 21 (n=6 animais por grupo). A extração de RNA total foi realizada com TRIzol, seguindo as recomendações do fabricante. Para expressão de mRNA, alíquotas de 2 μ g de RNA total foram transcritas reversamente usando o High-Capacity Kit RNA-to-cDNA (Life Technologies, 4387406, EUA) em uma reação de 10 μ L de acordo com as instruções do fabricante. Alíquotas de cDNA de cada amostra foram adicionadas a uma mistura de reagentes contendo Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), primers "sense" e "anti-sense", e o volume foi completado para 10 μ L com água ultrapura. As reações foram realizadas em duplicata para cada mRNAs no Real Time QuantStudio 12K flex System (Applied Biosystems) em placas de 96 poços seguindo a ficha técnica do produto. A quantificação relativa de cada mRNA foi realizada usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ de acordo com Livak (2001) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os valores obtidos para todas as amostras foram normalizados pela razão obtida entre o gene informativo e a referência *Gusb* e *Gapdh* para mRNAs. Os valores foram calculados usando a razão de expressão dos grupos GLLP/CTR. O teste "t" de Student foi aplicado para

testar se a diferença era estatisticamente significativa entre os grupos, sendo a diferença de expressão considerada significativa quando $p < 0,05$.

3.8. PCR de metilação específica (MSP)

A modificação de DNA por bissulfito foi realizada de acordo com Current Protocols In Human Genetics (Dracopoli et al., 1994). Uma concentração de 2 μg de DNA foi desnaturada com NaOH (2 M) por 10 min a 37 ° C. Em seguida, o DNA foi incubado em uma solução de 10 M de hidroquinona e 3 M de bissulfito de sódio a pH 5 a 50°C por 16 horas. Posteriormente, o DNA modificado foi purificado usando um kit de purificação de DNA Wizard (Promega) seguindo o protocolo do fabricante. A modificação foi finalizada com o tratamento com NaOH 3 M por 5 min à temperatura ambiente, seguido por precipitação com etanol, e por fim diluído em água, estando pronto para ser analisado.

O DNA modificado foi submetido para duas reações de MSP, ambas para o gene *Cyp7b1*: uma reação específica para DNA metilado e outra específica para DNA não metilado. Foram utilizados os seguintes primers (**Tabela 1**). Para ambas as reações, foram adicionados o DNA modificado com bissulfito; Tampão de PCR 10X (Invitrogen); MgCl_2 50 mM; 1,25 mM de dNTP e 300 ng/ μL de cada primer. Primeiramente as reações foram iniciadas a 95°C por 5 min, em seguida foi adicionado 1,25 unidades de polimerase Taq (Invitrogen), para então seguir para os 35 ciclos os quais as configurações são distintas para primers metilados e não metilados: primers metilados, ciclos com 30s/ 95°C e 30s/61°C; para os primers de DNA não metilados, os ciclos foram a 60°C e 30s/72°C. A etapa final de extensão foi realizada a 72°C por 4 minutos. Para análise final do PCR foi utilizado o gel de agarose a 3%, o qual foi corado com brometo de etídio e visualizado diretamente sob iluminação UV.

Tabela 1. Lista de primers para o método MSP

Gene	Primer	Sequence	Start	Size	Product size
<i>Cyp7b1</i>	Left M primer	GAGGGAGTTACGATTTTAGATGTC	601	24	140
	Right M primer	GCATACGTAACCAACCTAAACG	740	22	
	Left U primer	GAGGGAGTTAGATTTTAGATGTTGT	601	26	141
	Right U primer	CACATACATAACCAACCTAAACACT	741	25	

4. RESULTADOS

4.1. mRNAs e PDEs na PV de animais submetidos à RPM

Analisando o perfil global de expressão de mRNAs e proteínas, foram identificados 411 GDEs, sendo 325 up-regulados e 86 down-regulados. E o perfil global de proteínas foram identificados 164 PDEs, 138 up-reguladas e 26 down-reguladas (**Figura 1**).

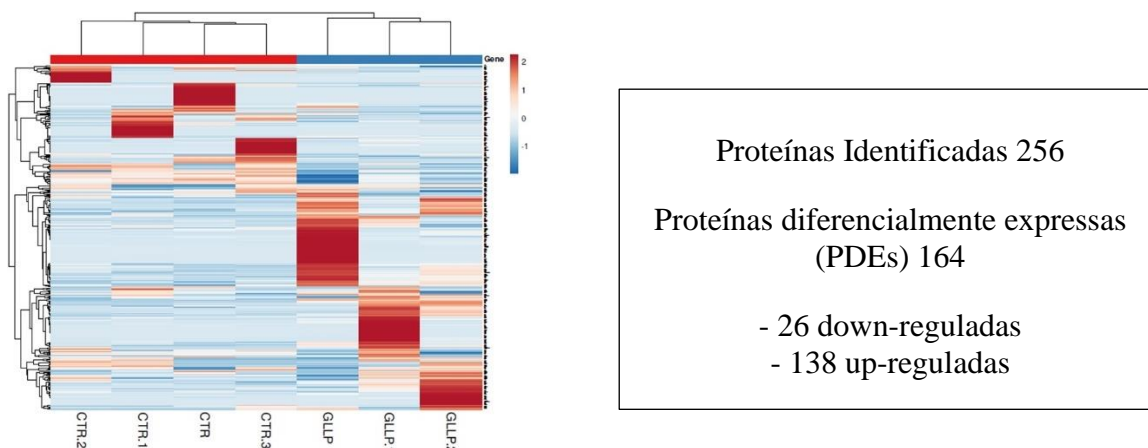


Figura 1. A) Heatmap representando os níveis de expressão gênica na próstata ventral (PV) de roedores controles (CTR) e submetidos à restrição proteica materna (GLLP). As amostras estão agrupadas por meio da distância euclidiana. As cores representam o valor de expressão, o azul indica diminuição da expressão e vermelho indica o aumento da expressão. B) Representação das Proteínas diferencialmente expressas (PDEs) no PV de animais do grupo GLLP.

4.2. Perfil global de metilação dos pacientes com CaP

A partir dos dados obtidos da metilação global de pacientes com CaP, foram identificados 4.193 probesID (região promotora de gene codificador de proteínas) diferencialmente metiladas, sendo 3.394 hipermetilados e 799 hipometiladas.

4.3. Análise integrativa das PDEs e GDEs

A partir da identificação dos probesID, PDEs e GDEs, foram realizadas análises integrativas, sendo que as comparações estão representadas na **Figura 2**. No qual foram identificados 49 GDEs interceptados com os probesID, 7 genes PDEs/probesID, e 1 gene identificado na intersecção de PDEs, GDEs e probesID.

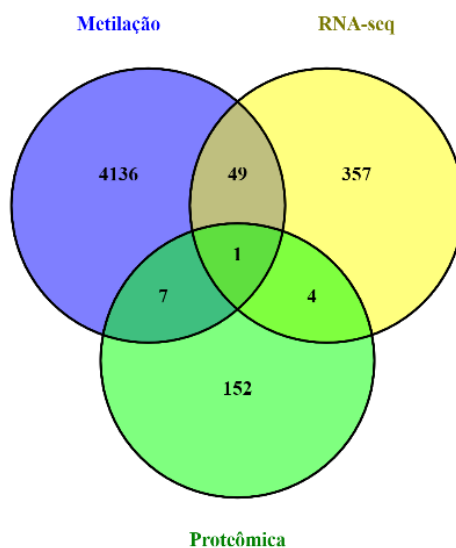


Figura 2. Diagrama de Venn. Comparação dos DMGs com DEGs e PDEs na PV dos ratos submetidos à RPM no DPN21. DMGs = Genes diferencialmente metilados; DEGs = Genes diferencialmente expressos; PV = Próstata Ventral; RPM = Restrição proteica materna; DPN = Dia Pós-Natal.

Ao detalhar o sentido de expressão dos genes/proteínas que foram intersectados, observamos que entre dos 49 GDEs-probesID se resumiam a 6 genes hipermetilados/down-regulados e 8 genes hipometilados/up-regulados, logo, havia 14 GDEs-probesID que apresentavam correlação entre o sentido de expressão e os fenômenos de metilação. Além disso, das 6 PDEs interceptadas com os probesID, 5 estavam hipermetilados/down-regulados (**Figura 3**).

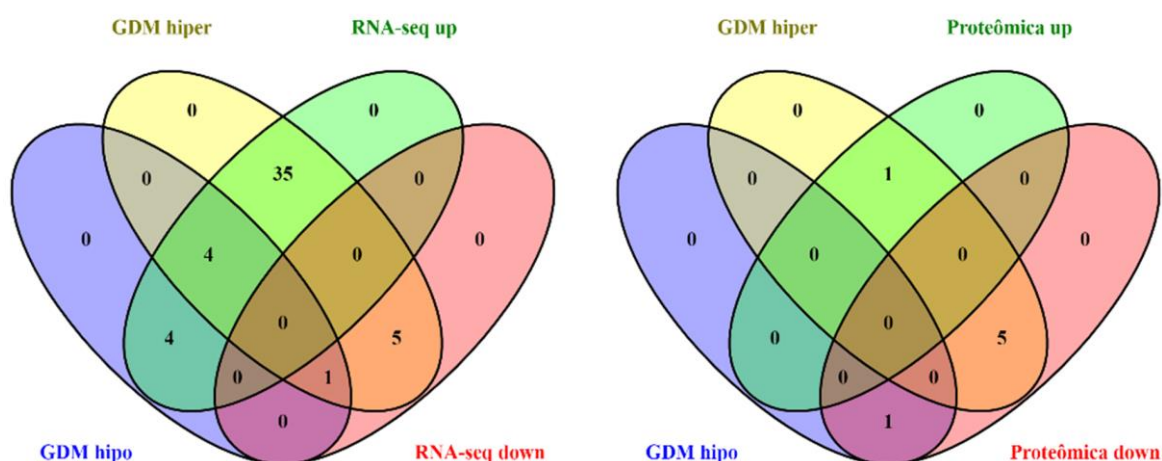


Figura 3. Diagrama de Venn. A) Comparação dos GDEs compartilhados entre os grupos GDM hiper/hipo e RNA-seq up/down. GDM hiper = Gene diferencialmente expresso hipermetilado; GDM hipo = Gene diferencialmente expresso hipometilado; RNA-seq up = transcriptoma up-regulado; RNA-seq down = transcriptoma down regulado. B) GDEs compartilhados entre os grupos GDM hiper/hipo e Proteômica up/down.

GDM hiper = Gene diferencialmente expresso hipermetilado; GDM hipo = Gene diferencialmente expresso hipometilado; proteômica up = proteômica up-regulado; proteômica down = proteômica down regulado.

4.4. Identificação das vias moleculares

Após a identificação dos GDEs e PDEs em comum com as probesID, nós realizamos as análises de enriquecimento de vias moleculares, usando a plataforma ShinyGO (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>), onde foram enriquecidas 15 vias significativas. Dos genes down-regulados com hipermetilação, foram enriquecidas seis vias: *smooth muscle adaptation*, *response to activity endotelial*, *cell proliferation*, *regulation of endotelial cell proliferation*, *positive regulation of endotelial cell proliferation*, *endotelial cell-cell adhesion* (**Figura 4A**), sendo regulados pelos genes *Cyba*, *Myh4*, *Thbs4*. Dos GDEs up-regulados e hipometilados, foram enriquecidas seis vias moleculares *glycerol transport*, *negative regulation of intracellular estrogen receptor signaling pathway*, *cellular response to organic cyclic compound*, *fluid transport*, *prostate gland epithelium morphogenesis*, *prostate gland morphogenesis* (**Figura 4B**), sendo regulados pelos genes *Cyp7b1*, *Aqp9*. Olhando para as PDEs down-reguladas com hipermetilação foram enriquecidas três vias moleculares, sendo elas *ECM-receptor interaction*, *cell adhesion molecules*, *proteoglycans in cancer* (**Figura 4C**), sendo regulados pelas proteínas *Sdc4*. Em conjunto, podemos observar que moléculas desreguladas na PV dos animais no início da vida, estão associadas a carcinogênese prostática, podendo ser importantes reguladores da origem desenvolvimentista do CaP.

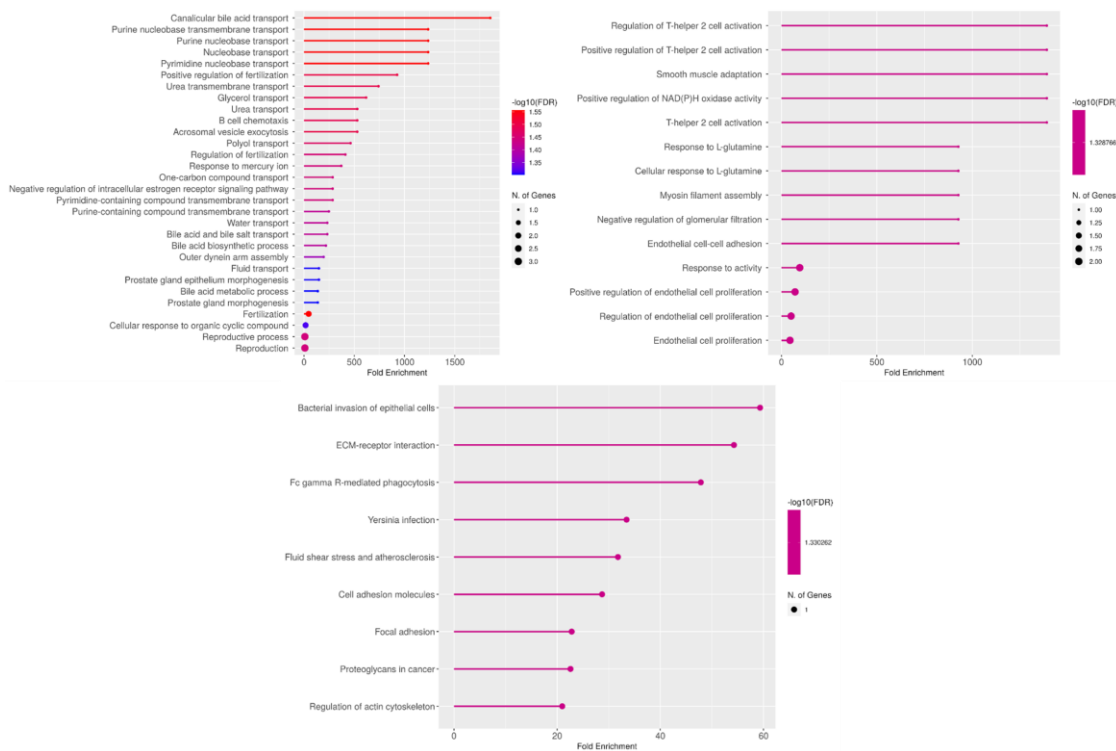


Figura 4. Gráfico de Enriquecimento Funcional. **A)** Dos 6 GDEs-probesID hiper/down com 6 principais vias moleculares (*Cyba*, *Myh4*, *Thbs4*). **B)** Dos 8 GDEs hipo/up com 6 principais vias moleculares (*Cyp7b1*, *Aqp9*). **C)** Dos 5 PDEs-probesID hiper/down com 3 principais vias moleculares (*Sdc4*).

4.5. Validação *in silico* em tecido tumoral prostático humano

Baseado nisso, destacamos 6 genes (*Cyba*, *Cyp7b1*, *Myh4*, *Aqp9*, *Thbs4* e *Sdc4*), os quais foram os que mais enriqueceram as vias moleculares e analisamos as suas marcações nos tecidos prostáticos normais e tumorais a partir das imuno-histoquímicas depositadas no banco de dados do *The Human Protein Atlas (HPA)* (**Figura 5**).


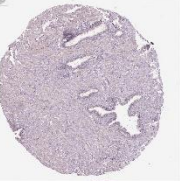
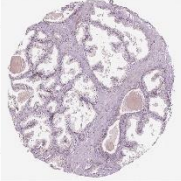

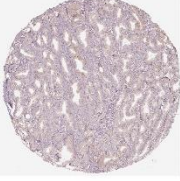
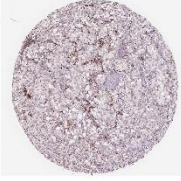
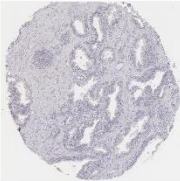
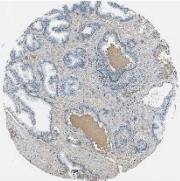
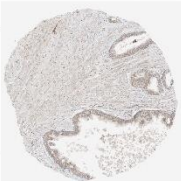
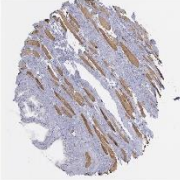
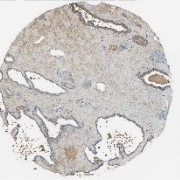

	<i>Cyp7b1</i>	<i>Aqp9</i>	<i>Cyba</i>
Normal	 <p>HPA017761 Homem, 51 anos Id Paciente: 2053 Marcação: Médio Intensidade: Moderado Quantificação: > 75% Localização: Citoplasmática e Membrana nuclear</p>	 <p>CAB075684 Homem, 55 anos Id Paciente: 3316 Marcação: Não detectada Intensidade: Negativa Quantificação: Negativa Localização: Negativa</p>	 <p>CAB009492 Homem, 61 anos Id Paciente: 5474 Marcação: Não detectada Intensidade: Negativa Quantificação: Negativa Localização: Negativa</p>
Tumor	 <p>HPA017761 Homem, 69 anos Id Paciente: 3580 Marcação: Médio Intensidade: Moderado Quantificação: > 75% Localização: Citoplasmática e Membrana nuclear</p>	 <p>CAB075684 Homem, 71 anos Id Paciente: 5119 Marcação: Baixa Intensidade: Fraca Quantificação: 25 – 75% Localização: Citoplasmática e Membrana</p>	 <p>CAB009492 Homem, 86 anos Id Paciente: 2728 Marcação: Não detectada Intensidade: Negativa Quantificação: Negativa Localização: Negativa</p>
	<i>Myh4</i>	<i>Thbs4</i>	<i>Sdc4</i>
Normal	 <p>HPA001349 Homem, 51 anos Id Paciente: 2053 Marcação: Não detectado Intensidade: Negativa Quantificação: Negativa Localização: Negativa</p>	 <p>CAB004597 Homem, 60 anos Id Paciente: 2098 Marcação: Não detectada Intensidade: Negativa Quantificação: Negativa Localização: Negativa</p>	 <p>HPA005716 Homem, 60 anos Id Paciente: 2098 Marcação: Alta Intensidade: Forte Quantificação: > 75% Localização: Citoplasmática e Membrana</p>
Tumor	 <p>HPA001349 Homem, 72 anos Id Paciente: 244 Marcação: Não detectado Intensidade: Negativa Quantificação: Negativa Localização: Negativa</p>	 <p>CAB004597 Homem, 64 anos Id Paciente: 3581 Marcação: Baixa Intensidade: Moderada Quantificação: Negativa Localização: Citoplasmática e membrana</p>	 <p>HPA005716 Homem, 60 anos Id Paciente: 3453 Marcação: Alta Intensidade: Forte Quantificação: > 75% Localização: Citoplasmática e Membrana</p>

Figura 5. Imunomarcção para os genes *Cyp7b1*, *Aqp9*, *Cyba*, *Myh4*, *Thbs4* e *Sdc4* em tecidos prostáticos normais e tumorais gerados pelo banco de dados *The Human Protein Atlas* (HPA).

4.6. Validação da expressão gênica da *Cyp7b1* em PV de animais submetidos à RPM

Por conseguinte, selecionamos o gene *Cyp7b1* para seguir com a validação in vivo, esse gene foi escolhido uma vez que ele é descrito na literatura como um pró-carcinógeno para a próstata e que atua na resposta a hormônios esteroides (LUNDQVIST e NORLIN, 2012). Observamos que a expressão gênica por RT-qPCR do gene *Cyp7b1* estava diminuída na PV dos animais do grupo GLLP no DPN21 (**Figura 6A**). Utilizando a técnica de PCR MSP, na PV dos animais no DPN21 para a região promotora do gene *Cyp7b1*, observamos um aumento da metilação na região promotora desse gene (**Figura 6B**).

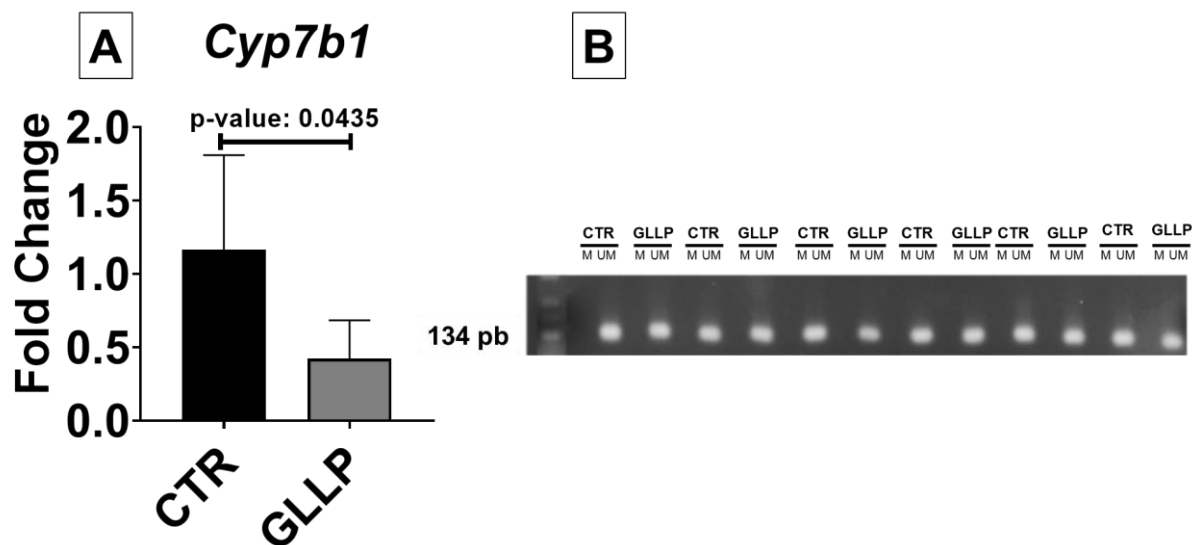


Figura 6. Representação gráfica da expressão gênica obtida através da validação do gene *Cyp7b1* comparado o grupo com controle (CTR) e restrição proteica materna (GLLP), no dia pós-natal 21 (A). Perfil de metilação do gene *Cyp7b1* nas regiões promotoras dos grupos controle (CTR) e restrito (GLLP). (B). * $p < 0.05$.

5. DISCUSSÃO

Nos últimos tempos, o conceito DOHaD se solidificou demonstrando que a desnutrição proteica materna é um importante fator de risco para o aumento da incidência de doenças crônicas não transmissíveis na prole, incluindo o câncer de mama e próstata (CaP) (GOFFIN *et al.*, 2005; KEINAN-BOKER *et al.*, 2009; LEVINE *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2020, 2019). Segundo alguns estudos experimentais foram confirmados que a exposição materna e pós-natal precoce ao estrogênio ou disruptores químicos endócrinos, como ftalatos ou bisfenol A (BPA), podem ocasionar num atraso do desenvolvimento prostático, podendo desencadear alterações prostáticas com o envelhecimento (CHEONG *et al.*, 2016; SCARANO *et al.*, 2019). Condição semelhante foi descrita na população afro-americana, cujas mães apresentaram níveis mais elevados de estrogênio durante a gravidez em comparação com mulheres caucasianas (POWELL; MEYSKENS, 2001), e os filhos apresentaram altos riscos para o desenvolvimento do CaP. De acordo com Keinan-Boker *et al.* (2009), em seus estudos foram demonstrados que homens judeus expostos à fome e estresse durante o início da vida no Holocausto apresentaram um alto risco de desenvolvimento do CaP com o envelhecimento (KEINAN-BOKER *et al.*, 2009). Além disso, outros estudos experimentais também demonstraram que a prole exposta à desnutrição materna estava em alto risco de desenvolver CaP e mama com o envelhecimento (PINHO *et al.*, 2014; PORTELA, *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2020, 2019; SCARANO *et al.*, 2019; VARUZZA *et al.*, 2019; WALKER; HO, 2012).

Apesar dos mecanismos moleculares relacionados à origem do desenvolvimento do CaP ainda não tenham sido completamente compreendidos, pesquisadores como Santos e seus colaboradores (2020) conseguiram identificar a desregulação de importantes vias de sinalização alteradas tanto na próstata de ratos jovens quanto em ratos mais velhos expostos à RPM. As vias de sinalização que apresentaram estar mais enriquecidas nos filhotes de ratos jovens e velhos foram assimiladas às vias de sinalização esteroidogênica, as atividades do retículo endoplasmático, metabolismo energético e sensores moleculares de dobramento de proteínas e homeostase de Ca^{2+} , isso tudo em consonância com o perfil proteômico. Portanto, a identificação de importantes vias moleculares demonstraram que à RPM altera a estrutura biológica da próstata no início da vida, propiciando a uma maior ocorrência de doenças prostáticas com o envelhecimento.

Nos últimos anos, com o avanço dos estudos ômicos, a epigenética tem se mostrado como um importante regulador da biologia molecular, sendo responsável na reprogramação da biologia do desenvolvimento, podendo levar à uma plasticidade fenotípica durante a vida adulta. Desse modo, um dos principais marcadores epigenéticos envolvidos na modulação da expressão gênica é a metilação do DNA (ALLIS; JENUWEIN, 2016; HEERWAGEN *et al.*, 2010), que está associada ao desenvolvimento do CaP e as várias hormonais (CHEONG *et al.*, 2016).

Ao compararmos nossos genes e proteínas diferencialmente expressas no início da vida, com o potencial de metilação observamos várias moléculas enriquecendo vias clássicas da biologia tumoral, no entanto destacamos o gene *Cyp7b1*, o qual teve sua expressão gênica reduzida nos animais do grupo GLLP no início da vida (DPN21) com um aumento da sua metilação na região promotora, observado através do PCR MSP. O que corroborou com as análises de bioinformática desenvolvimento desse trabalho, nos indicando que a alteração da expressão do gene *Cyp7b1* estava atrelada ao mecanismo de metilação da região promotora.

Segundo a literatura, o gene *Cyp7b1*, é um gene importante pois codifica um membro da superfamília de enzimas do citocromo P450, essas proteínas estão envolvidas em diversos processos metabólicos, tais como na resposta a fármacos, ao metabolismo de lipídios e principalmente o metabolismo dos hormônios esteroides (STILES *et al.*, 2009). A sinalização androgênica possui um papel importante tanto no desenvolvimento do sistema reprodutor masculino, principalmente a próstata, bem como tem fator central na progressão do CaP, e que os seus efeitos são mediados pelo receptor de andrógeno (AR), o qual pode ser ativado

por vários esteroides, sendo os mais prevalentes a di-hidrotestosterona (DHT) e a testosterona. Um produto de degradação importante do DHT é o 3 β -Adiol, o qual antagoniza a sinalização androgênica ativando os receptores de estrogênio (LUNDQVIST; NORLIN, 2012; WEIHUA *et al.*, 2002). E a principal enzima responsável pela conversão do 3 β -Adiol é a *Cyp7b1*. Assim, a diminuição da expressão da *Cyp7b1* na PV dos animais no DPN21, pode levar a um aumento dos andrógenos em detrimento dos estrógenos numa tentativa da glândula prostática em diminuir a sinalização de estrogênio e aumentar a estrogênica (LUTZ *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2017). Santos e seus colaboradores (2019; 2021) demonstram um aumento sistêmico do estrogênio nos animais submetidos a RPM. Além disso, Tang e Norlin (2006) demonstraram que a *Cyp7b1* pode ser um mediador da regulação estrogênica e androgênica pela conversão de ligantes AR em metabólitos menos ativos, nesse mesmo sentido, Olsson e seus colaboradores (2007), demonstraram que a enzima *Cyp7b1* também é co-expressa com o Receptor de Estrogênio beta (ER β) na próstata, afetando vias que controlam a proliferação celular de células prostáticas (OLSSON *et al.*, 2007; TANG; NORLIN, 2006).

6. CONCLUSÃO

Nosso trabalho evidencia a participação da metilação do DNA em regiões promotoras como mecanismo epigenético desencadeados pela RPM na biologia prostática, bem como a participação da *Cyp7b1*, como um possível biomarcador da origem desenvolvimentista do CaP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLIS, C. D.; JENUWEIN, T. The molecular hallmarks of epigenetic control. **Nature reviews. Genetics**, vol. 17, no. 8, p. 487–500, 1 Aug. 2016. DOI 10.1038/NRG.2016.59. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27346641/>. Accessed on: 28 Jan. 2023.
- BARKER, D. J. P. The fetal and infant origins of adult disease. **BMJ (Clinical research ed.)**, vol. 301, no. 6761, p. 1111, 1990. DOI 10.1136/BMJ.301.6761.1111. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2252919/>. Accessed on: 19 Jan. 2022.
- BARKER, D. J. P.; OSMOND, C.; WINTER, P. D.; MARGETTS, B.; SIMMONDS, S. J. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. **Lancet (London, England)**, vol. 2, no. 8663, p. 577–580, 9 Sep. 1989. DOI 10.1016/S0140-6736(89)90710-1. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2570282/>. Accessed on: 19 Jan. 2022.
- BERENDS, L. M.; FERNANDEZ-TWINN, D. S.; MARTIN-GRONERT, M. S.; CRIPPS, R. L.; OZANNE, S. E. Catch-up growth following intra-uterine growth-restriction programmes an insulin-resistant phenotype in adipose tissue. **International journal of obesity (2005)**, vol. 37, no. 8, p. 1051–7, Aug. 2013. <https://doi.org/10.1038/ijo.2012.196>.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, vol. 30, no. 15, p. 2114–2120, Aug. 2014. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
- CAMPISANO, S. E.; ECHARTE, S. M.; PODAZA, E.; CHISARI, A. N. Protein malnutrition during fetal programming induces fatty liver in adult male offspring rats. **Journal of physiology and biochemistry**, vol. 73, no. 2, p. 275–285, May 2017. <https://doi.org/10.1007/s13105-017-0549-1>.
- CAVARIANI, M. M.; SANTOS, T. de M.; PEREIRA, D. N.; DE ALMEIDA CHUFFA, L. G.; PINHEIRO, P. F. F.; SCARANO, W. R.; DOMENICONI, R. F. Maternal protein restriction differentially alters the expression of AQP1, AQP9 and VEGFr-2 in the epididymis of rat offspring. **International journal of molecular sciences**, vol. 20, no. 3, 1 Feb. 2019. DOI 10.3390/IJMS20030469. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30678254/>. Accessed on: 19 Jan. 2022.
- CHEONG, A.; ZHANG, X.; CHEUNG, Y.-Y.; TANG, W.; CHEN, J.; YE, S.-H.; MEDVEDOVIC, M.; LEUNG, Y.-K.; PRINS, G. S.; HO, S.-M. DNA methylome changes by estradiol benzoate and bisphenol A links early-life environmental exposures to prostate cancer risk. **Epigenetics**, vol. 11, no. 9, p. 674–689, Sep. 2016. <https://doi.org/10.1080/15592294.2016.1208891>.
- COLOMBELLI, K. T.; SANTOS, S. A. A.; CAMARGO, A. C. L.; CONSTANTINO, F. B.; BARQUILHA, C. N.; RINALDI, J. C.; FELISBINO, S. L.; JUSTULIN, L. A. Impairment of microvascular angiogenesis is associated with delay in prostatic development in rat offspring of maternal protein malnutrition. **General and comparative endocrinology**, vol.

- 246, p. 258–269, 15 May 2017. DOI 10.1016/J.YGCEN.2016.12.016. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28041790/>. Accessed on: 19 Jan. 2022.
- CUNHA, G. R.; RICKE, W.; THOMSON, A.; MARKER, P. C.; RISBRIDGER, G.; HAYWARD, S. W.; WANG, Y. Z.; DONJACOUR, A. A.; KURITA, T. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, vol. 92, no. 4, p. 221–236, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.10.017>.
- DAVALOS, V.; ESTELLER, M. Cancer epigenetics in clinical practice. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, 13 Dec. 2022. DOI 10.3322/CAAC.21765. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21765>. Accessed on: 28 Jan. 2023.
- DE MELLO SANTOS, T.; CAVARIANI, M. M.; PEREIRA, D. N.; SCHIMMING, B. C.; CHUFFA, L. G. de A.; DOMENICONI, R. F. Maternal Protein Restriction Modulates Angiogenesis and AQP9 Expression Leading to a Delay in Postnatal Epididymal Development in Rat. **Cells**, vol. 8, no. 9, 17 Sep. 2019. <https://doi.org/10.3390/cells8091094>.
- DOBIN, A; GINGERAS, T. Mapping RNA-seq Reads with STAR. **Current protocols in bioinformatics**, vol. 51, no. 1, p. 11.14.1-11.14.19, Sep. 2015. <https://doi.org/10.1002/0471250953.BI1114S51>.
- DOBIN, Alexander; GINGERAS, T. R. Optimizing RNA-Seq Mapping with STAR. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, vol. 1415, p. 245–62, 2016. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3572-7_13.
- ESTELLER, M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. **Oncogene** 2002 21:35, vol. 21, no. 35, p. 5427–5440, 5 Aug. 2002. DOI 10.1038/sj.onc.1205600. Available at: <https://www.nature.com/articles/1205600>. Accessed on: 28 Jan. 2023.
- FAO, O. para a A. e A. The State of Food Security and Nutrition in the World 2022 - UNICEF DATA. 2022. Available at: https://data.unicef.org/resources/sofi-2022/?_ga=2.24966654.559586220.1674948081-986221005.1674948081&_gl=1*1uib31s*_ga*OTg2MjlxMDA1LjE2NzQ5NDgwODE.*_ga_88Z86505FT*MTY3NDk0ODA4Mi4xLjAuMTY3NDk0ODA4Mi42MC4wLjA.*_ga_ZEPV2PX419*MTY3NDk0ODA4Mi4xLjAuMTY3NDk0ODA. Accessed on: 28 Jan. 2023.
- GOFFIN, V.; BERNICHTEIN, S.; TOURAINE, P.; KELLY, P. a. Development and potential clinical uses of human prolactin receptor antagonists. **Endocrine Reviews**, vol. 26, no. 3, p. 400–422, 2005. <https://doi.org/10.1210/er.2004-0016>.
- GOULD, J. M.; SMITH, P. J.; AIREY, C. J.; MORT, E. J.; AIREY, L. E.; WARRICKER, F. D. M.; PEARSON-FARR, J. E.; WESTON, E. C.; GOULD, P. J. W.; SEMMENCE, O. G.; RESTALL, K. L.; WATTS, J. A.; MCHUGH, P. C.; SMITH, S. J.; DEWING, J. M.;

- FLEMING, T. P.; WILLAIME-MORAWEK, S. Mouse maternal protein restriction during preimplantation alone permanently alters brain neuron proportion and adult short-term memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 115, no. 31, p. E7398–E7407, Jul. 2018. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721876115>.
- GOYAL, D.; LIMESAND, S. W.; GOYAL, R. Epigenetic responses and the developmental origins of health and disease. **The Journal of endocrinology**, vol. 242, no. 1, p. T105–T119, 2019. DOI 10.1530/JOE-19-0009. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31091503/>. Accessed on: 28 Jan. 2023.
- GUZMÁN, C.; CABRERA, R.; CÁRDENAS, M.; LARREA, F.; NATHANIELSZ, P. W.; ZAMBRANO, E. Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. **Journal of Physiology**, vol. 572, no. 1, p. 97–108, Apr. 2006. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.103903>.
- HEERWAGEN, M. J. R.; MILLER, M. R.; BARBOUR, L. A.; FRIEDMAN, J. E. Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, vol. 299, no. 3, Sep. 2010. DOI 10.1152/AJPREGU.00310.2010. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20631295/>. Accessed on: 28 Jan. 2023.
- KEINAN-BOKER, L.; VIN-RAVIV, N.; LIPSHITZ, I.; LINN, S.; BARCHANA, M. Cancer incidence in Israeli Jewish survivors of World War II. **Journal of the National Cancer Institute**, vol. 101, no. 21, p. 1489–1500, Nov. 2009. DOI 10.1093/JNCI/DJP327. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19861305/>. Accessed on: 20 Jan. 2022.
- KESAVAN, K.; DEVASKAR, S. U. Intrauterine Growth Restriction: Postnatal Monitoring and Outcomes. **Pediatric Clinics of North America**, vol. 66, no. 2, p. 403–423, Apr. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2018.12.009>.
- LEE, H.-S. Impact of Maternal Diet on the Epigenome during In Utero Life and the Developmental Programming of Diseases in Childhood and Adulthood. **Nutrients**, vol. 7, p. 9492–9507, Nov. 2015. <https://doi.org/10.3390/nu7115467>.
- LEVINE, M. E.; SUAREZ, J. A.; BRANDHORST, S.; BALASUBRAMANIAN, P.; CHENG, C.-W.; MADIA, F.; FONTANA, L.; MIRISOLA, M. G.; GUEVARA-AGUIRRE, J.; WAN, J.; PASSARINO, G.; KENNEDY, B. K.; WEI, M.; COHEN, P.; CRIMMINS, E. M.; LONGO, V. D. Low protein intake is associated with a major reduction in IGF-1, cancer, and overall mortality in the 65 and younger but not older population. **Cell metabolism**, vol. 19, no. 3, p. 407–17, Mar. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.02.006>.
- LIAO, Y.; SMYTH, G. K.; SHI, W. FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. **Bioinformatics**, vol. 30, no. 7, p. 923–930, 2014. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>.

- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, vol. 25, no. 4, p. 402–408, 2001. DOI 10.1006/METH.2001.1262. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11846609/>. Accessed on: 20 Jan. 2022.
- LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, vol. 15, no. 12, p. 1–21, 5 Dec. 2014. DOI 10.1186/S13059-014-0550-8/FIGURES/9. Available at: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-014-0550-8>. Accessed on: 20 Jan. 2022.
- LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. The childhood environment and adult disease. **The childhood environment and adult disease**, , p. 38–55, 1991. .
- LUNDQVIST, J.; NORLIN, M. Effects of CYP7B1-related steroids on androgen receptor activation in different cell lines. **Biochimica et biophysica acta**, vol. 1821, no. 7, p. 973–979, Jul. 2012. DOI 10.1016/J.BBALIP.2012.03.007. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22484622/>. Accessed on: 28 Jan. 2023.
- LUTZ, S. Z.; HENNENLOTTER, J.; SCHARPF, M. O.; SAILER, C.; FRITSCH, L.; SCHMID, V.; KANTARTZIS, K.; WAGNER, R.; LEHMANN, R.; BERTI, L.; PETER, A.; STAIGER, H.; FRITSCH, A.; FEND, F.; TODENHÖFER, T.; STENZL, A.; HÄRING, H. U.; HENI, M. Androgen receptor overexpression in prostate cancer in type 2 diabetes. **Molecular Metabolism**, vol. 8, p. 158, 1 Feb. 2018. DOI 10.1016/J.MOLMET.2017.11.013. Available at: </pmc/articles/PMC5985051/>. Accessed on: 28 Jan. 2023.
- MARTIN, L. J.; MENG, Q.; BLENCOWE, M.; LAGARRIGUE, S.; XIAO, S.; PAN, C.; WIER, J.; TEMPLE, W. C.; DEVASKAR, S. U.; LUSIS, A. J.; YANG, X. Maternal High-Protein and Low-Protein Diets Perturb Hypothalamus and Liver Transcriptome and Metabolic Homeostasis in Adult Mouse Offspring. **Frontiers in Genetics**, vol. 9, Dec. 2018. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00642>.
- MERICQ, V.; MARTINEZ-AGUAYO, A.; UAUY, R.; IÑIGUEZ, G.; VAN DER STEEN, M.; HOKKEN-KOELEGA, A. Long-term metabolic risk among children born premature or small for gestational age. **Nature Reviews Endocrinology**, vol. 13, no. 1, p. 50–62, Aug. 2016. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.127>.
- MORIMOTO, S.; SOSA, T.; CALZADA, L.; REYES-CASTRO, L.; DÍAZ-DÍAZ, E.; MORALES, A.; NATHANIELSZ, P.; ZAMBRANO, E. Developmental programming of aging of isolated pancreatic islet glucose-stimulated insulin secretion in female offspring of mothers fed low-protein diets in pregnancy and/or lactation. **Journal of developmental origins of health and disease**, vol. 3, no. 6, p. 483–488, Dec. 2012. <https://doi.org/10.1017/S2040174412000463>.
- OLSSON, M.; GUSTAFSSON, O.; SKOGASTIERNA, C.; TOLF, A.; DU RIETZ, B.; MORFIN,

- R.; RANE, A.; EKSTRÖM, L. Regulation and expression of human CYP7B1 in prostate: overexpression of CYP7B1 during progression of prostatic adenocarcinoma. **The Prostate**, vol. 67, no. 13, p. 1439–1446, 15 Sep. 2007. DOI 10.1002/PROS.20630. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17639508/>. Accessed on: 28 Jan. 2023.
- PINHO, C. F.; RIBEIRO, M. A.; RINALDI, J. C.; FELISBINO, S. L.; PINHEIRO, P. F.; DOMENICONI, R. F.; FOCHI, R. A.; BOER, P. A.; SCARANO, W. R. Gestational protein restriction delays prostate morphogenesis in male rats. **Reproduction, fertility, and development**, vol. 26, no. 7, p. 967–973, 2014. DOI 10.1071/RD13132. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23920146/>. Accessed on: 19 Jan. 2022.
- PORTELA, L. M.; SANTOS, S. A.; CONSTANTINO, F. B.; CAMARGO, A. C.; COLOMBELLI, K. T.; FIORETTO, M. N.; BARQUILHA, C. N.; PÉRICO, L. L.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SCARANO, W. R.; ZAMBRANO, E.; JUSTULIN, L. A. Increased oxidative stress and cancer biomarkers in the ventral prostate of older rats submitted to maternal malnutrition. **Molecular and cellular endocrinology**, vol. 523, 1 Mar. 2021. DOI 10.1016/J.MCE.2020.111148. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33387600/>. Accessed on: 19 Jan. 2022.
- POWELL, I. J.; MEYSKENS, F. L. African American men and hereditary/familial prostate cancer: Intermediate-risk populations for chemoprevention trials. **Urology**, vol. 57, no. 4 Suppl 1, p. 178–81, Apr. 2001. .
- RAMADAN, W. S.; ALSHIRAIHI, I.; AL-KARIM, S. Effect of maternal low protein diet during pregnancy on the fetal liver of rats. **Annals of Anatomy**, vol. 195, no. 1, p. 68–76, Jan. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2012.05.006>.
- RAVELLI, G. P. G.-P.; STEIN, Z. A. A.; SUSSER, M. W. W. Obesity in Young Men after Famine Exposure in Utero and Early Infancy. **New England Journal of Medicine**, vol. 295, no. 7, p. 349–353, Aug. 1976. <https://doi.org/10.1056/NEJM197608122950701>.
- REEVES; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. 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. **The Journal of nutrition**, vol. 123, no. 11, p. 1939–1951, 1993. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- RINALDI, J. C.; SANTOS, S. A. A.; COLOMBELLI, K. T.; BIRCH, L.; PRINS, G. S.; JUSTULIN, L. A.; FELISBINO, S. L. Maternal protein malnutrition: effects on prostate development and adult disease. **Journal of developmental origins of health and disease**, vol. 9, no. 4, p. 361–372, 1 Aug. 2018. DOI 10.1017/S2040174418000168. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29582717/>. Accessed on: 19 Jan. 2022.
- RINALDI, J. C.; JUSTULIN, L. A.; LACORTE, L. M.; SAROBO, C.; BOER, P. A.; SCARANO, W. R.; FELISBINO, S. L. Implications of intrauterine protein malnutrition on prostate growth, maturation and aging. **Life sciences**, vol. 92, no. 13, p. 763–774, 19 Apr. 2013.

- DOI 10.1016/J.LFS.2013.02.007. Available at:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23439325/>. Accessed on: 19 Jan. 2022.
- RIZZI, V.; SENE, L.; FERNANDEZ, C.; GONTIJO, J.; BOER, P. Impact of long-term high-fat diet intake gestational protein-restricted offspring on kidney morphology and function. **Journal of developmental origins of health and disease**, vol. 8, no. 1, p. 89–100, Feb. 2017. <https://doi.org/10.1017/S2040174416000398>.
- RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, G. L.; REYES-CASTRO, L. A.; VEGA, C. C.; BOECK, L.; IBÁÑEZ, C.; NATHANIELSZ, P. W.; LARREA, F.; ZAMBRANO, E. Accelerated aging of reproductive capacity in male rat offspring of protein-restricted mothers is associated with increased testicular and sperm oxidative stress. **Age (Dordrecht, Netherlands)**, vol. 36, no. 6, p. 9721, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11357-014-9721-5>.
- RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, G. L.; VIGUERAS-VILLASEÑOR, R. M.; MILLÁN, S.; MORAN, N.; TREJO, R.; NATHANIELSZ, P. W.; LARREA, F.; ZAMBRANO, E. Maternal protein restriction in pregnancy and/or lactation affects seminiferous tubule organization in male rat offspring. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, vol. 3, no. 05, p. 321–326, Oct. 2012. <https://doi.org/10.1017/S2040174412000360>.
- SANTOS, S. A. A.; CAMARGO, A. C.; CONSTANTINO, F. B.; COLOMBELLI, K. T.; MANI, F.; RINALDI, J. C.; FRANCO, S.; PORTELA, L. M. F.; DURAN, B. O. S.; SCARANO, W. R.; HINTON, B. T.; FELISBINO, S. L.; JUSTULIN, L. A. Maternal Low-Protein Diet Impairs Prostate Growth in Young Rat Offspring and Induces Prostate Carcinogenesis With Aging. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, vol. 74, no. 6, p. 751–759, 16 May 2019b. DOI 10.1093/GERONA/GLY118. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29762647/>. Accessed on: 14 Mar. 2022.
- SANTOS, S. A. A.; LIMA CAMARGO, A. C.; CONSTANTINO, F. B.; COLOMBELLI, K. T.; FREDIANI PORTELA, L. M.; FIORETTO, M. N.; SOUZA VIEIRA, J. C.; PADILHA, P. M.; DE OLIVEIRA, M. B.; FELISBINO, S. L.; CARVALHO, R. F.; JUSTULIN, L. A. Identification of potential molecular pathways involved in prostate carcinogenesis in offspring exposed to maternal malnutrition. **Ageing**, vol. 12, no. 20, p. 19954–19978, 1 Jan. 2020a. DOI 10.18632/AGING.104093. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33049715/>. Accessed on: 14 Mar. 2022.
- SCARANO, W. R.; BEDRAT, A.; ALONSO-COSTA, L. G.; AQUINO, A. M.; FANTINATTI, B. E. A.; JUSTULIN, L. A.; BARBISAN, L. F.; FREIRE, P. P.; FLAWS, J. A.; LEMOS, B. Exposure to an environmentally relevant phthalate mixture during prostate development induces microRNA upregulation and transcriptome modulation in rats. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, vol. 171, no. 1, p. 84–97, 1 Sep. 2019. DOI 10.1093/TOXSCI/KFZ141. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31199487/>. Accessed on: 19 Jan. 2022.

- SCHULZ, L. C. The Dutch Hunger Winter and the developmental origins of health and disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 107, no. 39, p. 16757–16758, Sep. 2010. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012911107>.
- STILES, A. R.; MCDONALD, J. G.; BAUMAN, D. R.; RUSSELL, D. W. CYP7B1: one cytochrome P450, two human genetic diseases, and multiple physiological functions. **The Journal of biological chemistry**, vol. 284, no. 42, p. 28485–28489, 16 Oct. 2009. DOI 10.1074/JBC.R109.042168. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19687010/>. Accessed on: 28 Jan. 2023.
- SU, Y.; JIANG, X.; LI, Y.; LI, F.; CHENG, Y.; PENG, Y.; SONG, D.; HONG, J.; NING, G.; CAO, Y.; WANG, W. Maternal low protein isocaloric diet suppresses pancreatic β -cell proliferation in mouse offspring via miR-15b. **Endocrinology**, vol. 157, no. 12, p. 4782–4793, Dec. 2016. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1167>.
- TANG, W.; NORLIN, M. Regulation of steroid hydroxylase CYP7B1 by androgens and estrogens in prostate cancer LNCaP cells. **Biochemical and biophysical research communications**, vol. 344, no. 2, p. 540–546, 2 Jun. 2006. DOI 10.1016/J.BBRC.2006.03.175. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16630558/>. Accessed on: 28 Jan. 2023.
- TRAPNELL, C.; WILLIAMS, B. A.; PERTEA, G.; MORTAZAVI, A.; KWAN, G.; VAN BAREN, M. J.; SALZBERG, S. L.; WOLD, B. J.; PACHTER, L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. **Nature Biotechnology**, vol. 28, no. 5, p. 511–515, May 2010. <https://doi.org/10.1038/nbt.1621>.
- VARUZZA, M. B.; ZAPATERINI, J. R.; COLOMBELLI, K. T.; BARQUILHA, C. N.; JUSTULIN, L. A.; MUÑOZ-DE-TORO, M.; KASS, L.; BARBISAN, L. F. Impact of gestational low protein diet and postnatal bisphenol A exposure on chemically induced mammary carcinogenesis in female offspring rats. **Environmental Toxicology**, vol. 34, no. 11, p. 1263–1272, 1 Nov. 2019. <https://doi.org/10.1002/tox.22827>.
- WALKER, C. L.; HO, S. Developmental reprogramming of cancer susceptibility. **Nature Reviews Cancer**, vol. 12, no. 7, p. 479–486, Jun. 2012. <https://doi.org/10.1038/nrc3220>.
- WEIHUA, Z.; LATHE, R.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J. Å. An endocrine pathway in the prostate, ER β , AR, 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol, and CYP7B1, regulates prostate growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 99, no. 21, p. 13589–13594, 15 Oct. 2002. DOI 10.1073/PNAS.162477299. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12370428/>. Accessed on: 28 Jan. 2023.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO | World Health Organization. 2021. .
- WU, W. F.; MANEIX, L.; INSUNZA, J.; NALVARTE, I.; ANTONSON, P.; KERE, J.; YU, N. Y.

L.; TOHONEN, V.; KATAYAMA, S.; EINARSDOTTIR, E.; KRJUTSKOV, K.; DAI, Y. B.; HUANG, B.; SU, W.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J. Å. Estrogen receptor β , a regulator of androgen receptor signaling in the mouse ventral prostate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 114, no. 19, p. E3816–E3822, 9 May 2017. DOI 10.1073/PNAS.1702211114/-DCSUPPLEMENTAL. Available at: [/pmc/articles/PMC5441728/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24045010/). Accessed on: 28 Jan. 2023.

ZAMBRANO, E.; GUZMÁN, C.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, G. L.; DURAND-CARBAJAL, M.; NATHANIELSZ, P. W. Fetal programming of sexual development and reproductive function. **Molecular and cellular endocrinology**, vol. 382, no. 1, p. 538–549, 25 Jan. 2014. DOI 10.1016/J.MCE.2013.09.008. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24045010/>. Accessed on: 19 Jan. 2022.