

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 28/04/2022.



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

PG-BGA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**Análise integrativa do transcriptoma e proteoma da próstata
ventral da prole de ratos submetidos à restrição proteica
materna**

Ana Carolina Lima Camargo

Discente

Prof. Dr. Luis Antonio Justulin Junior

Orientador

Dr. Guilherme Targino Valente

Coorientador

BOTUCATU – SP

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**Análise integrativa do transcriptoma e proteoma da próstata
ventral da prole de ratos submetidos à restrição proteica
materna**

Ana Carolina Lima Camargo

Discente

Prof. Dr. Luis Antonio Justulin Junior

Orientador

Dr. Guilherme Targino Valente

Coorientador

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 Celular e Estrutural e Funcional.

Nome do orientador: *Prof. Dr. Luis Antonio Justulin
Junior*

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional-
Morfologia, IB- UNESP-Botucatu

Botucatu-SP

2021

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

Camargo, Ana Carolina Lima.

Análise integrativa do transcriptoma e proteômica da próstata ventral da prole de ratos submetidos à restrição proteica materna / Ana Carolina Lima Camargo. - Botucatu, 2021

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

Orientador: Luis Antonio Justulin Junior

Coorientador: Guilherme Targino Valente

Capes: 20603002

1. Próstata. 2. Transcriptoma. 3. Proteômica. 4. Dieta com restrição de proteínas. 5. Programação fetal.

Palavras-chave: Desenvolvimento; Programação fetal; Próstata ; Proteomica; Transcriptoma.

Dedicatória

*Com todo amor,
dedico as minhas avós Maria Auxiliadora e Magnólia!*

Esta obra é trabalho de fruto e dedicação não apenas meu, mas de várias pessoas que contribuíram para que fosse finalizada com sucesso. Reconheço que não seria possível realizá-la sozinha. Assim agradeço a todos que, a sua maneira, colaboraram com ela.

Agradeço,

Aos meus pais Aurilucia e Francisco

Obrigada por toda educação e por me apoiarem nessa caminhada.

Aos meus irmãos Eduardo e Victor, minha cunhada Jeniffer

Mesmo em momentos difíceis estiveram ao meu lado, e sempre acreditaram que eu era capaz.

Ao meu avô Francisco

Entende a minha distância e ausência, mas se emociona cada vez que me vê.

Ao meu orientador Prof. Dr Luis Antonio Justulin

São 8 anos de parceria, obrigada por todo aprendizado, por nos apoiar a cada dia, e nos ensinar a ser grandes profissionais.

Ao meu eterno coorientador Dr. Sergio Alexandre A Santos (Peidei)

Mesmo não sendo sua IC predileta, ainda sigo aprendo a cada dia mais com você.

Obrigada Pei, por toda parceria, aprendizado e risada ao longo desses 8 anos.

As minhas eternas parceiras Flávia Bessi (Klo) e Ketlin Colombelli

Flávia e Ketlin, obrigada por essa caminhada e parceria juntas, tenho certeza de que essa pós-graduação teria sido mais difícil sem vocês ao meu lado.

Aos colegas de laboratório Luiz Frediane e Matheus Fioretto

Pela amizade e ajuda durante todo esse processo.

Ao meu namorado, Rafael Borges

Pela compreensão nessa etapa, obrigada por tanto em tão pouco tempo.

A minha roommate, Amanda Lima

Pela companhia, conversas, muitas receitas de comidinhas.

Agradecimentos

Aos colegas do Laboratório de Matriz Extracelular (LabMEC), Nilton Santos, Caroline Barquilha, Franciele Moselle, Isabela Barbosa, Caio Monção, Luísa Annibal, Renato Mattos, Matheus Betta Oliveira, Cecilia Luvizutti, Elian Ribeiro, Ana Beathriz Lorente, Beatriz Remoli e Isabelle Tenori, agradeço por toda ajuda direta e indiretamente no trabalho e ambiente de trabalho.

Em especial aos que aqui já passaram Maira Cuciello (Sauza), Helga Nunes (Helguinha), Bruno Martinucci (Xi) e Brenda Minatel, acredito que os cafés e almoços juntos serão lembrados com muito carinho, ter convivido com vocês foi um prazer.

Aos colegas do Laboratório do musculo estriado (LBME), Bruno Duran, Bruno Fantinatti, Sarah Santiloni Cury, Paula Paccielli Freire, Jéssica Silvino Valente e ao Laboratório de desreguladores endócrinos e carcinogênese (LABDECA) em especial Ariana Musa de Aquino, obrigada a todos por toda ajuda e paciência durante os experimentos e convívio. Aos demais discentes, docentes e funcionários do setor de Morfologia, obrigado pelos bons momentos vividos.

A família Beduschi, Eliete, Claudinei e Rian, desde a graduação me acolheram como parte da família e me ajudaram muito durante toda minha estadia em Botucatu.

Ao Dr. Carlos S Moreno, por me receber e transmitir o conhecimento durante meu estágio na Universidade de Emory (Georgia- EUA).

Aos Professores do Departamento de Morfologia, IB, UNESP de Botucatu pelo acolhimento, conhecimento compartilhado e pela oportunidade que me concederam de atuar em aulas na graduação através do estágio docência.

Aos professores membros da banca de qualificação Luiz Gustavo, Thomas Ong e Bruno Duran, pela contribuição nesse trabalho.

Aos Professores que aceitaram o convite para constituírem a banca examinadora desta tese. Obrigada por contribuírem com a minha formação.

À coordenadoria e professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada pela excelência na formação de seus alunos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos (Processos 2017/08715-0/ 2018/09408-6).

Aos animais experimentais, os quais tratamos com todo o respeito e consideração.

Por fim agradeço a todos que de uma forma ou de outra, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

*“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to
understand more, so that we may fear less”*

Marie Curie

Resumo

A exposição materna à dieta deficiente em proteína durante a gestação, está associada ao desenvolvimento de doenças na prole, em especial cardiovasculares, renais, metabólicas e até mesmo o câncer. Além disso, estudos do nosso grupo de pesquisa demonstram que a restrição proteica materna (RPM) impacta o desenvolvimento e aumenta a incidência de lesões prostáticas na prole de ratos velhos. Os mecanismos moleculares que desencadeiam estas alterações ainda são pouco conhecidos. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar o perfil de expressão global de RNAs mensageiros (transcriptoma) e de proteínas (proteoma) em amostras de próstata ventral de ratos jovens submetidos à RPM durante a gestação e lactação, e integrar vias moleculares envolvidas no desenvolvimento prostático em animais normais e restritos. Utilizamos ratos machos da linhagem *Sprague Dawley* no dia pós natal (DPN) 21 nascidos de mães alimentadas com ração padrão (17% de proteína) (grupo controle -CTR), ou de mães alimentadas com ração hipoproteica (6% de proteína) durante a gestação e lactação (Grupo restrito gestação e lactação (GLLP)). Após este período, os animais foram eutanasiados com overdose de anestésico, pesados e a próstata ventral (PV) coletada. Observamos atraso nas etapas do desenvolvimento prostático (menor peso corpóreo e peso PV ao nascimento no DPN 1), acompanhado do desbalanço hormonal (aumento nos níveis de colesterol, testosterona e estrógeno no DPN 21). Análises de proteoma (LC-MS/MS) revelou alteração no perfil proteômico da glândula prostática desses animais, apresentando o enriquecimento de vias moleculares associadas ao perfil de perturbação estrogênica e câncer. Análise de transcriptoma (HigSeq-2500, Illumina) revelou perfil gênico distinto entre os grupos CTR e GLLP, apresentando genes codificadores de proteínas envolvidos em vias de desenvolvimento, citocromo p450 e câncer. Ambos resultados foram comparados aos dados de transcriptoma e do proteoma para adenocarcinoma prostático (PRAD) no banco de dados *The Cancer Genome Atlas*, com o objetivo de investigar se a RPM é responsável por alterar a expressão gênica e proteica de alvos relacionados ao desenvolvimento de lesões prostáticas, dados associados aos animais no DPN 50 submetidos a RPM. Nossos resultados destacam que o papel da RPM, no desenvolvimento normal da próstata, alterando as vias moleculares que promovem a carcinogênese da próstata de crescimento lento com o envelhecimento. Além disso, a análise *in silico* pode ser uma ferramenta útil para caracterizar potenciais biomarcadores e vias moleculares envolvidas na carcinogênese da próstata de roedores e humanos.

Palavras- chave: Próstata, DoHaD, Transcriptoma e Proteoma

Abstract

Maternal exposure to a protein-deficient diet during pregnancy is associated with the development of diseases in the offspring, especially cardiovascular, renal, metabolic and even cancer. In addition, studies by our research group demonstrate that maternal low protein diet (LPD) impacts development and increases the incidence of prostatic lesions in the offspring of old rats. The molecular mechanisms that trigger these changes are still poorly understood. Thus, in this study was to identify the global expression profile of messenger RNAs (transcriptome) and proteins (proteome) in ventral prostate (VP) samples from young rats submitted to maternal LPD during gestation and lactation, and to integrate molecular pathways involved in prostate development in normal and restricted animals. We used male *Sprague Dawley* rats on the postnatal day (PND) 21 born to dams fed standard diet (17% protein) (control group -CTR), or dams fed LPD (6% protein) during gestation and lactation (gestation and lactation LPD group -GLLP). After this period, the animals were euthanized with anesthetic overdose, weighed and the VP collected. We observed a delay in the stages of prostate development (lower body weight and PV weight) at birth on PND 1), accompanied by disbalance hormonal (increased levels of cholesterol, testosterone and estrogen on PND 21). Proteome analyzes (LC-MS/MS) revealed changes in the pretein profile of the prostate gland in these animals, showing enrichment of molecular pathways associated with the estrogenic disturbance and cancer profile. Transcriptome analysis (HigSeq-2500, Illumina) revealed a distinct gene profile between the CTR and GLLP groups, showing genes alteraed by maternal LPD were involved in development, cytochrome p450 and cancer pathways. All results were compared to the transcriptome and proteome data for prostate adenocarcionoma (PRAD) in The Cancer Genome Atlas (TCGA) database, with the aim of investigating whether maternal LPD is responsible for altering the gene and protein expression of targets related to the development of lesions prostatic, data associated with the profile of animals in DPN 50 submitted to maternal LPD. Our results highlight that the role of RPM in the normal development of the prostate, altering the molecular pathways that promote the carcinogenesis of the slow-growing prostate with aging. In addition, *in silico* analysis can be a useful tool to characterize potential biomarkers and molecular pathways involved in rodent and human prostate carcinogenesis.

Keywords: Prostate, DoHaD, Transcriptome and Proteome

Lista de Abreviações

AR – Receptor de Andrógeno

CaP- Câncer de Próstata

CTR- Grupo Controle

CYP- Citocromo p450

DNMT- DNA metil transferase

DPN- Dia pós-natal

DHEA- Desidroepiandrosterona

DHT- Di-hidrotestosterona

DOHaD- *Development Origins Heath and Disease*

ER α – Receptor de estrógeno alfa

ER β – Receptor de estrógeno beta

FOAD – Fetal Origin of Adults Disease

GLLP- Grupo *Gestacional and Lactacional Low Protein*

HPB - Hiperplasia prostática benigna

INCA- Instituto Nacional do Câncer

PIN- neoplasia intraepitelial

PF- Programação Fetal

PV- Próstata ventral

PA- Próstata anterior

PD- Próstata dorsal

PL- Próstata lateral

RPM- Restrição proteica materna

TCGA- *The Cancer Genome Atlas*

Lista de Figuras

Capítulo 1

Figura 1. Anatomia macroscópica e microscópica da próstata humana.....	22
Figura 2. Localização e organização anatômica da próstata de roedores.....	23
Figura 3. Esquema dos tipos celulares encontrados na próstata adulta.	24
Figura 4. Estágios do desenvolvimento da próstata dos roedores.....	25
Figura 5. Diagrama ilustrando o desenvolvimento prostático e diferenciação das células epiteliais do camundongo.....	26
Figura 6. Diferentes mecanismos epigenéticos e processos que regulam a expressão gênica.	31

Capítulo 2

Figure 1. Schematic representation of the experimental design, data analysis, and results.	45
Figure 2. Animals and prostate morphology..	54
Figure 3. Gene expression analysis in CTR and GLLP groups.	55
Figure 4. Enrichment pathway analysis of differentially expressed genes in the VP of maternally malnourished offspring rats.	56
Figure 5. Representative images of RT-qPCR analysis of Cyp1b1 (A and E), Rspo3 (B and F), Cyp7b1 (C and G) and Gadd45g (D and H), in the different experimental groups..	57
Figure 6. Expression of mRNA levels and Functional enrichment.....	59
Figure 7. Genetic alterations and gene expression of genes set in TCGA.	60
Figure 8. Methylation status in our animals and PRAD-TCGA samples..	61
Figure 9. Molecular mechanisms altered by maternal LPD in GLLP animals on PND 21 and 540.	65
Supplementary Figure 1. Genetic alterations in DEGs.....	77
Supplementary Figure 2. Expression genes across PRAD- TCGA.....	78

Capítulo 3

Figure 1. Body weight (A, B) and hormonal levels (C, D) of male offspring on PND 21 and 540.....	85
Figure 2. Representative histological sections of the VP lobes from the CTR and GLLP groups on PND 21 and 540, stained with hematoxylin-eosin (HE).....	86
Figure 3. Venn diagram. (A) Shared proteins between CTR and GLLP groups in PND 21 and 540. (B) Shared proteins differentially expressed between the CTR and GLLP groups on PND 21 and 540.....	87
Figure 4. (A) Ontological enrichment of upregulated (red) and downregulated (blue) proteins on PND 21 by KOBAs 3.0.. ..	88
Figure 5. (A) Ontological enrichment of upregulated (red) and downregulated (blue) proteins on PND 540 using the KOBAs 3.0 tool.....	88
Figure 6. (A) Clustergram generated by Enrichr using upregulated proteins on PND 21. (B) Clustergram generated by Enrichr using downregulated. proteins on PND 21.	89
Figure 7. (A) Clustergram generated by Enrichr using upregulated proteins on PND 540. (B) Clustergram generated by Enrichr using downregulated proteins on PND 540.	90
Figure 8. Protein-protein interaction network between commonly upregulated proteins on both PND 21 and 540.....	91
Figure 9. (A) Heatmap showing the commonly differentially targets from our set of DEP and RNA-seq data from ventral, dorsal, lateral, and anterior prostate lobes in the mice model of PCa (PB-Cre/PtenloxP/loxP). (B) The commonly deregulated targets between our DEP and those extracted from RNA-seq data by GEPIA. (C) Immunostaining of normal and prostate tumor samples for five commonly upregulated targets in our samples and GEPIA database (http://gepia.cancerpku.cn/).....	92
Figure 10. Representative immunohistochemistry reaction for Calreticulin (CALR) in the VP lobes from the CTR and GLLP groups on PND 21 (A–D) and 540 (E–H). RT-qPCR reaction for CALR in the VP lobes from CTR and GLLP groups on PND 21 (I) and 540 (J).	93
Supplementary Figure 1. Protein-protein interaction network between upregulated proteins on PND 21.	107

Supplementary Figure 2. Protein-protein interaction network between downregulated proteins on PND 21. 108

Supplementary Figure 3. Protein-protein interaction network between upregulated proteins on PND 540..... 109

Supplementary Figure 4. Protein-protein interaction network between downregulated proteins on PND 540..... 110

Lista de Tabelas

Capítulo 2

Table 1. Specification for Primers used for qRT-PCR.	51
Table 2. Biometric and hormonal parameters of male offspring on PND21.	53
Supplementary Table 1. Composition of control diet and low protein diet.	79
Supplementary Table 2. Differentially expressed genes (DEGs)- file excel	79
Supplementary Table 3. Enrichment terms of upregulated and downregulated DEGs (Excel).....	79
Supplementary Table 4. Bibliographic of four protein-coding genes by PubMed.....	80
Supplementary Table 5. Functional enrichment terms by Enrichr tool.	80

Capítulo 3

Supplementary Table 1. Composition of the control (CTR) (AIN-76A) and low protein diet (LPD) (AIN-93).....	111
---	------------

SUMÁRIO

Resumo	9
Abstract.....	10
Lista de Abreviações	11
Lista de Figuras	12
Lista de Tabelas.....	15
Capítulo 1 - Revisão de Literatura	17
1. Programação Fetal	18
1.2 Morfofisiologia da próstata: aspectos normais e alterados.....	21
1.3 Próstata e Programação Fetal	26
1.4 Estrógeno e próstata	28
1.5 Epigenética, Programação Fetal e Estrógeno	29
2. Justificativa e relevância do tema proposto	32
3. Objetivo	32
3.1 Objetivo geral.....	32
3.2 Objetivos específicos.....	32
4. Resultados	33
5. Referências.....	33
Capítulo 2 – Artigo I	43
Capítulo 3 – Artigo II.....	81
Capítulo 4- Anexo.....	113