

**Impacto da restrição proteica gestacional e lactacional sobre a próstata de ratos:
Relação entre a via de sinalização da Insulina/IGF, desenvolvimento e
envelhecimento.**

Sérgio Alexandre Alcantara dos Santos

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

Prof. Dr. Luis Antonio Justulin Junior

Botucatu – SP

2018



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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**Impacto da restrição proteica gestacional e lactacional sobre a próstata de ratos:
Relação entre a via de sinalização da Insulina/IGF, desenvolvimento e
envelhecimento.**

Sérgio Alexandre Alcantara dos Santos

Orientador Prof. Dr. Luis Antonio Justulin Junior

Coorientadora Prof. Dra. Jaqueline de Carvalho Rinadi

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

Prof. Dr. Luis Antonio Justulin Junior

Botucatu – SP

2018

Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada – UNESP
Distrito de Rubião Júnior s/n. Cx. Postal. 510. CEP: 18618-000 – Botucatu – SP – Brasil
Fone/Fax. +55 (14) 3811-6148 – posgraduacao@ibb.unesp.br / [HTTP://www.ibb.unesp.br](http://www.ibb.unesp.br)

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

Santos, Sérgio Alexandre Alcantara dos.

Impacto da restrição proteica gestacional e lactacional sobre a próstata de ratos : relação entre a via de sinalização da Insulina/IGF, desenvolvimento e envelhecimento / Sérgio Alexandre Alcantara dos Santos. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Luis Antonio Justulin Jr
Coorientador: Jaqueline de Carvalho Rinaldi
Capes: 20603002

1. Próstata. 2. Proteômica. 3. Restrição proteica.
4. Desenvolvimento fetal. 5. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: Desbalanço hormonal; Programação fetal ;
Próstata ventral; Proteômica; Restrição proteica materna.

Botucatu, 02 de março de 2018.

Santos, Sérgio Alexandre Alcantara dos

Impacto da restrição proteica gestacional e lactacional sobre a próstata de ratos: Relação entre a via de sinalização da Insulina/IGF, desenvolvimento e envelhecimento.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luis Antonio Justulin Junior
(Orientador – UNESP/Botucatu - SP).

Prof^a. Dr^a. Rejane Maira Góes
(UNESP/São José do Rio Preto - SP).

Prof^a. Dr^a. Renée Laufer Amorim
(UNESP/Botucatu - SP).

Prof.^a Dr.^a Erick José Ramo da Silva
(UNESP/Botucatu - SP).

Prof. Dr. Manoel Francisco Biancardi
(UFG/Goiânia - GO).

Dedicatória

À minha querida família,
Que sempre me apoiou e confiou em mim,
Um grande abraço a todos vocês.

Agradecimento Especial

Aos meus pais Leontil e Alcina,

Que são meu alicerce, muito obrigado pela boa educação e muito amor que sempre me deram.

As minhas queridas irmãs Fernanda e Aline,

Por toda ajuda e carinho todos estes anos, muito obrigado.

A minha querida companheira Thaís,

Thais, agradeço por ter aceitado seguir esta jornada ao meu lado, sou muito grato pela sua companhia diária que tanto me ajuda a enfrentar as dificuldades, obrigado pelos momentos maravilhosos que passamos nestes últimos anos, te amo.

Ao meu Orientador Professor Dr. Luís Antonio Justulin Junior,

Justo, muito obrigado pela amizade, pela grande ajuda neste projeto, grande abraço companheiro!

À Minha Coorientadora Professora Dra. Jaqueline de Carvalho Rinaldi,

Jack, muito obrigado pela ajuda no desenvolvimento deste projeto, muito obrigado.

Ao Professor Dr. Sérgio Luis Felisbino,

Obrigado por todos estes anos de ensinamento.

À Professora Dra. Flávia Karina Delella,

Obrigado pela ajuda da minha formação desde a iniciação científica.

Ao Professor Dr. Wellerson Rodrigo Scarano.

Obrigado por toda a ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Agradecimentos

Ao laboratório de matriz extracelular (LABMEC), Caros amigos, Flávia Bessi Constantino, Ana Carolina Lima Camargo, Ketlin Thassiani Colombelli, Bruno Martinucci, Helga Caputo Nunes, Maira Smaniotto Cuciello, Brenda Minatel, Caroline Nascimento Barquilha, Nilton José dos Santos, Luis Marcos Frediane, Suelen Franco, Elian Ribeiro David, Isabela Gaseta Ferraz Paiva, Teng Fwu Shing, Amanda Grosselli Toledo, Isabela Correa Barbosa, Matheus Naia Fioretto, Cecilia Luvizutti Ferreira da Silva, Juliana Trindade Caleffi, Isabelle Mira da Silva, Mariana Medeiros, agradeço a todos vocês por toda a ajuda durante esta etapa, vocês foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho, obrigado pela companhia, pelos cafés, e todas as conversas que tivemos nestes últimos anos.

Ao Laboratório do musculo estriado (LBME), Professora Dra. Maeli Dal Pai, Professor Dr. Robson Francisco Carvalho, Sarah Santiloni Cury, Paula Paccielli Freire, Grasieli de Oliveira, Bruna Tereza Thomazini Zanella, Rondinelle Artur Simões Salomão, Jéssica Silvino Valente, Rafaela Nunes da Silva, e em especial ao Bruno Oliveira da Silva Duran além de ser um grande amigo, deu grande suporte na realização das reações de PCR.

Ao Laboratório de desreguladores endócrinos e carcinogênese (LABDECA), Ariana Musa de Aquino, Leonardo de Oliveira Mendes, Bianca Gonçalves Facchim, Joyce Zalotti Brandt, André Teves Aquino Gonçalves de Freitas, Cristiane Figueiredo Pinho.

Aos colegas do Departamento de Morfologia, IB, Unesp de Botucatu, obrigado pelos bons momentos vividos.

Ao Professor Dr. Pedro de Magalhães Padilha, ao Dr. José Cavalcante Souza Vieira, Izabela da Cunha Bataglioli e Janaína Macedo da Silva do departamento de química e bioquímica do IB da UNESP-Botucatu pela disponibilidade e ajuda com a realização das análises proteômicas.

À Professora Dra. Fernanda Mani do departamento de química e bioquímica do IB da UNESP-Botucatu, pela disponibilidade e ajuda na realização das análises séricas.

Ao Professor Dr. Barry T. Hinton e a Dra. Bingfang Xu, da Universidade da Virgínea, obrigado por me receberem tão bem em seu laboratório.

À Dra. Mileni Fernandes e Dra. Aline de Lima do laboratório de bioquímica da Universidade de São Paulo (USP) Bauru, que auxiliaram nas análises proteômicas.

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

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

Aos secretários da seção de pós-graduação pela paciência, competência e profissionalismo nos processos burocráticos para a execução desta dissertação.

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.

A todos os funcionários do Departamento de Morfologia, IB, UNESP de Botucatu pela colaboração e pela agradável convivência. Especialmente aos técnicos Vivian Tiemi H. Cypriano, José Eduardo Bozano, Ricardo André dos S. Teixeira, Renato Devidé, Luciana C. Montes Galendi, Keila Emílio de Almeida e Helton Luiz de Souza.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos (Processos 2014/08531-8 e 2016/25033-7).

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

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

Sumário

Lista de Abreviaturas.....	10
Capítulo 1.	12
1- INTRODUÇÃO	12
1.1 Programação Fetal	12
1.3 Próstata, Programação Fetal e Via Insulina/IGF.	17
1.4 Morfofisiologia prostática.	18
1.5 Alterações prostáticas	21
2. Justificativa e relevância do tema proposto	22
3. Objetivos.....	22
3.1 Objetivo geral	22
3.2 Objetivos específicos	22
4. Resultados	23
5. Referências	23
Capítulo 2.	30
Capítulo 3.	67

Lista de Abreviaturas

(Abreviações que aparecem no texto em português e em inglês que contém o mesmo significado estão apresentadas em conjunto)

AKT- Proteína Quinase B

CaP- Câncer de Próstata

DPN- Dia Pós-Natal

ERK- Quinase Regulada por Sinal Extracelular

HE- Hematoxilina e Eosina

HPB- Hiperplasia Prostática Benigna

IGF-1I- Fator de Crescimento semelhante a Insulina I

IGF1-IR- Receptor do Fator de Crescimento semelhante a Insulina I

IGF-II- Fator de Crescimento semelhante a Insulina II

IGF-IIR- Receptor do Fator de Crescimento semelhante a Insulina II

IR- Receptor de Insulina

IRA- Receptor de Insulina A

IRB- Receptor de Insulina B

IRS1I- Substrato do Receptor de Insulina I

IRSII2- Substrato do Receptor de Insulina II

MEC- Complexo de Matriz Extracelular

PA- Próstata Anterior

PD- Próstata Dorsal

PF- Programação Fetal

PI3K- Fosfatidilinositol 3 Quinase

PIN- Neoplasia Intra-epitelial Prostática

PL- Próstata Lateral

PSA- Antígeno Prostático Específico

PV- Próstata Ventral

Shc- Proteína de colágeno/homóloga- Src

RPM- Restrição proteica materna

Resumo

Condições gestacionais adversas podem acarretar alterações morfofuncionais irreversíveis no feto, fenômeno conhecido como Programação Fetal (PF). A restrição proteica intrauterina/perinatal (modelo de PF amplamente conhecido) é responsável por baixo peso ao nascimento e desenvolvimento de desordens metabólicas na vida adulta. A PF também altera os níveis de hormônios esteroides e fatores de crescimento, tais como estrógeno, testosterona, insulina e os IGFs na prole, sendo estas alterações intensificadas quando a restrição proteica é prolongada na vida pós-natal. Estes hormônios participam diretamente do desenvolvimento e homeostasia prostáticos, sendo que o desequilíbrio entre eles está relacionado com o aumento de incidência de desordens prostáticas com o envelhecimento. Neste contexto, objetivou-se investigar os efeitos da exposição materna à dieta hipoproteica, durante os períodos gestacional e lactacional, sobre a prole ratos machos, com ênfase ao desenvolvimento/maturação glandular e incidência de patologias prostáticas com o envelhecimento. Para isso, foram utilizados ratos *Sprague Dawley machos*, nascidos de mães alimentadas com ração padrão (17% de proteína, grupo controle – CTR) ou com ração hipoproteica (6% de proteína) durante a gestação (grupo GLP, do inglês *gestational low protein*), ou durante a gestação e lactação (grupo GLLP, *gestational and lactation low protein*). A próstata ventral (PV) e o sangue foram coletados nos dias pós-natal (DPN) 21 e 540. Foram realizadas análises hormonais séricas, e a PV foi submetida às análises morfológicas/morfométricas, de imunohistoquímica, western blotting, qPCR nos dois períodos e de proteômica no DPN540. Nossos resultados demonstram baixo peso ao nascimento dos animais dos grupos GLP e GLLP. Houve atraso no desenvolvimento prostático no DPN21 e menor atividade secretora no DPN540. Análises hormonais evidenciaram um desequilíbrio dos hormônios testosterona, estrógeno e insulina/IGF-1 nos animais submetidos restrição proteica materna, o que resultou em alteração das vias moleculares de sinalização responsivas a estes hormônios nas duas idades analisadas. Destaca-se como resultado inédito a detecção de carcinoma in situ exclusivamente nos animais velhos submetidos à restrição proteica materna, fato que foi relacionado ao desequilíbrio do ambiente intrauterino/perinatal pela restrição proteica, agravado pela desregulação do balanço estrógeno/testosterona em animais velhos. Análises proteômicas da PV de animais no DPN540 revelaram o enriquecimento de vias moleculares reconhecidamente associadas a carcinogênese prostática, principalmente no grupo GLLP, que apresentou maior incidência e severidade de lesões. Estes resultados apontam a restrição proteica materna como um importante fator de risco para o desenvolvimento do câncer de próstata.

Palavras-chave: Restrição proteica gestacional e lactacional, programação fetal, próstata ventral, insulina, câncer de próstata.

Capítulo 1.

1- INTRODUÇÃO

1.1 Programação Fetal

Evidências demonstram que doenças habitualmente consideradas crônicas podem ter origem a partir de insultos ocorridos durante o período intrauterino e neonatal, uma vez que esta fase de desenvolvimento representa um período de alta vulnerabilidade tanto para a gestante como para embrião/feto (MERICQ et al., 2016). Nesta fase, a exposição materna a condições estressantes, tais como drogas, agentes químicos, dietas não balanceadas, radiação podem afetar de maneira irreversível o desenvolvimento da prole. Os efeitos desencadeados podem variar conforme o tipo, dose e tempo de exposição a tal insulto. As consequências são diversas, desde baixo peso ao nascimento, alterações no desenvolvimento e maior susceptibilidade a doenças na vida adulta. Tais efeitos, que ocorrem em resposta ao agente estressor, tem início a partir de mudanças na expressão/regulação da expressão gênica de vias de sinalização que atuam durante o período de morfogênese, como as vias de controle de proliferação/diferenciação celular, cuja alteração pode levar a mudança na quantidade e proporção dos diferentes tipos celulares, o que acarreta alterações morfofisiológicas e afeta de modo irreversível o funcionamento dos órgãos (QASEM et al., 2012).

Estas respostas adaptativas de um organismo frente a insultos durante o período pré e/ou perinatal são coletivamente denominadas de Programação Fetal (PF) (BARKER et al., 1989). Um dos primeiros pesquisadores a demonstrar correlação entre insultos maternos durante a gestação e o aumento de casos de doenças nos descendentes foi o epidemiologista inglês David Barker. Em seu primeiro estudo, Barker e seus colaboradores coletaram dados de recém-nascidos (entre os anos de 1911 e 1930) em um hospital na região de Hertfordshire, Inglaterra. O total de mortes por doença cardíaca na idade adulta em indivíduos com baixo peso corpóreo para 1 ano de idade foi 2.7 vezes maior que indivíduos com peso considerado normal (Barker et al., 1989). Na década de 1980, Barker e colaboradores demonstraram correlação entre a nutrição infantil, incidência de mortalidade neonatal e de mortes por doenças cardíacas na idade adulta em regiões pobres da Inglaterra e do País de Gales (Barker et al., 1986).

Em um outro estudo, Barker coletou dados de gestantes e recém-nascidos na região de Lancashire, Inglaterra, nascidos entre os anos de 1935 e 1944. Analisando dados de peso corpóreo ao nascimento, peso da placenta, peso corpóreo e pressão arterial na idade adulta, Barker e seus colaboradores demonstraram que indivíduos com baixo peso ao nascimento associado a maior tamanho de placentas apresentaram maior pressão arterial (Barker et al., 1990). Estes autores

propuseram que a restrição de crescimento intrauterino e pós-natal poderia ser um importante fator de risco para o desenvolvimento de hipertensão e doenças cardíacas, dando origem à **Hipótese de Barker**. Inicialmente controversa, esta teoria tem alavancado o interesse médico-científico sobre a PF, além de fomentar a criação de uma sociedade internacional, destinada ao estudo desta temática, denominada Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) (Schulz, 2010).

Em uma das poucas oportunidades de se avaliar a influência de fatores externos sobre o desenvolvimento humano, Ravelli et al. (1976) demonstraram o impacto da restrição alimentar sobre os filhos de mulheres expostas a um período de escassez alimentar durante o cerco alemão à Holanda ao final da 2ª Guerra Mundial (1944-1945), episódio conhecido como Inverno da Fome Holandesa (*Dutch Hunger Winter*), onde o consumo alimentar foi limitado a 400-800 calorias/dia, inclusive para gestantes. Na vida adulta, esses indivíduos cujas mães sofreram restrição alimentar, apresentaram padrões diferenciados de composição corporal dependendo da fase da gestação em que haviam sido expostos à desnutrição materna. Caso a mãe tivesse sofrido desnutrição durante o último trimestre da gestação, esse grupo apresentava uma baixa incidência de obesidade. No entanto, se a desnutrição tivesse ocorrido no primeiro trimestre da gestação, a incidência de obesidade aumentava significativamente. Com isso, os autores demonstraram que, além do impacto negativo da desnutrição materna sobre a prole, seus efeitos dependem do período gestacional em que o insulto ocorre. Este evento, embora trágico, proporcionou condições para melhor entendimento dos efeitos da restrição alimentar intrauterina sobre a saúde humana, sendo fundamental para alicerçar o interesse sobre a DOHaD (Schulz, 2010).

Outros estudos epidemiológicos sugerem forte associação entre o baixo peso ao nascimento e o risco aumentado de obesidade e doenças metabólicas na vida adulta (BARKER, 2003). Hales & Barker (1992) propuseram inicialmente que a principal alteração adaptativa causada pelo PF com repercussão sistêmica seria o atraso no desenvolvimento/diferenciação das células beta-pancreáticas produtoras de insulina, o que resultaria em alterações metabólicas sistêmicas e aumento da incidência de diabetes do tipo 2 na vida adulta. Mais recentemente, tem sido proposto que o aumento da incidência de doenças metabólicas se dá através de mecanismos genéticos e epigenéticos de programação intrauterina. Neste modelo, a placenta é um componente crucial, pois integra a gestante e o embrião/feto, respondendo a sinais ambientais e interferindo no desenvolvimento e crescimento intrauterino. Esses processos são mediados em parte pelo aumento da expressão de fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-I) e do seu receptor (IGF-IR) como um mecanismo compensatório em resposta à restrição de crescimento fetal, que pode induzir influxo de aminoácidos e glicose do sangue materno para o feto via placenta. Após o nascimento, ocorre um período de

aumento da sensibilidade à insulina e de crescimento acelerado da prole. Este padrão de resposta tem sido denominado, em inglês, de *catch-up growth* (Figura 1).

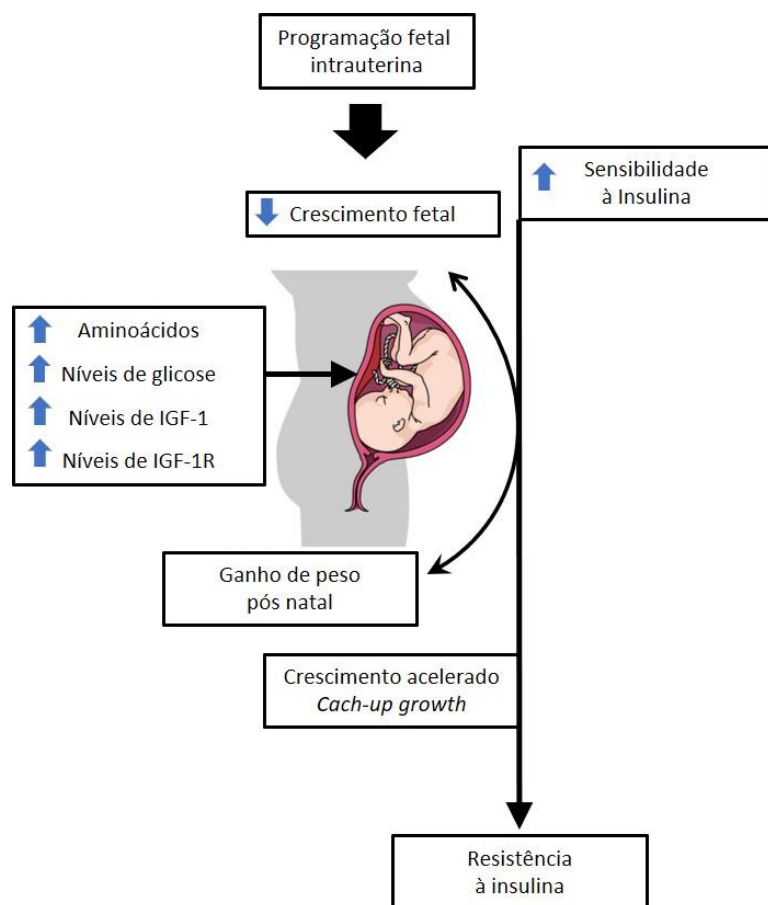


Figura 1. Modelo de programação fetal (comunicação pessoal).

Muitos modelos de PF têm sido desenvolvidos na atualidade, principalmente utilizando modelos roedores. Dentre estes, o oferecimento de dieta hipoproteica às ratas prenhes durante o período gestacional e/ou lactacional, têm sido um dos mais estudados. Com a utilização deste modelo, vários autores demonstraram associação de consumo de dieta hipoproteica por ratas prenhes e o baixo peso ao nascimento, redução no crescimento de diferentes órgãos, elevação da pressão sistólica, dislipidemia e resistência à insulina (COLOMBELLI et al., 2017; FIDALGO et al., 2013; OZANNE, 1999, 2001a; PAULINO-SILVA; COSTA-SILVA, 2016; PINHO et al., 2014; RINALDI et al., 2013; SENE et al., 2013; VEGA et al., 2016).

Análises de órgãos específicos demonstram que a restrição proteica materna acarretar em menor número de néfrons no rim (HABIB; ZHANG; BAUM, 2011), menor quantidade de células beta e de ilhotas pancreáticas (DAHRI et al., 1991), proporção alterada entre os tipos celulares do fígado (BURNS et al., 1997), redução no número de capilares do cérebro (BENNIS-TALEB et al., 1999), menor número de neurônios reguladores do apetite no hipotálamo (PLAGEMANN et al., 2000) e de

alvéolos pulmonares (ZANA-TAIEB et al., 2013), além de impactar negativamente na via de sinalização da insulina (NICHOLAS et al., 2013).

1.2 Via de Sinalização da Insulina/IGFs

A via de sinalização da insulina é uma das mais afetadas pela PF. Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que a desregulação deste eixo durante o desenvolvimento intrauterino está associada à restrição de crescimento e desenvolvimento de diabetes tipo 2 na vida adulta (MURPHY et al., 2006).

A via de sinalização da insulina/IGFs é composta por 3 ligantes: Insulina e os Fatores de Crescimento Semelhantes à Insulina (IGFs) I e II. A ação da insulina é mediada pelo receptor de insulina (IR) e também pode ser ativado pela ligação ao IGF-I e II, porém com menor afinidade. A ativação do IR leva a um aumento da proliferação em células-alvo. Além disso sua ativação em tecidos adultos, tem papel essencialmente metabólico, controlando o metabolismo de glicose, lipídeos e proteínas. Este último, é ativado exclusivamente pela ligação à insulina (DUPONT; HOLZENBERGER, 2003; SINGH; ALEX; BAST, 2014)

Os IGF-I e II também desempenham importante função na regulação da proliferação, diferenciação e transformação celular, além da apoptose, sendo seus efeitos mediados pelos receptores IGF-IR e IGF-IIR (KOJIMA et al., 2009; LONG; HUYNH; ZHAO, 1998). A insulina e os IGFs possuem estrutura molecular bastante similar, o que possibilita uma sobreposição em suas vias de sinalização. Assim, os IGFs-I e II podem se ligar ao IR, da mesma maneira que a insulina pode se ligar ao IGF-IR e IGF-IIR (SINGH; ALEX; BAST, 2014) (Figura 2).

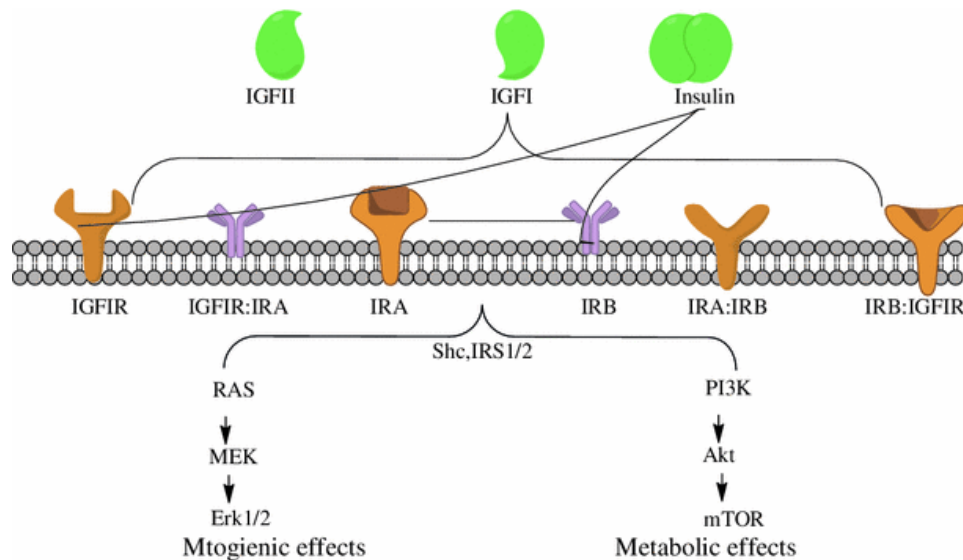


Figura 2. Representação esquemática da via de sinalização da Insulina/IGF. São observadas 3 moléculas ligantes (insulina, IGF-I e IGF-II) e seus receptores (IRA e IRB IGF-IR, IGF-IIR) e formação de receptores de conformação híbrida entre os IGF-IR, IRA e IRB (SINGH; ALEX; BAST, 2014).

A ligação destes fatores de crescimento aos seus receptores leva a uma cascata de sinalização intracelular, como a fosforilação da família dos substratos do receptor da insulina I/II (IRS1/II) e o Shc (proteína colágeno/homóloga- Src). Estes, por sua vez, levam à ativação de vias que controlam tanto os níveis de proliferação celular (ERK- quinase regulada por sinal extracelular e AKT - proteína quinase B) como metabolismo tecidual (PI3K, fosfatidilinositol 3 quinase) (SINGH; ALEX; BAST, 2014).

Berends et al. (2013) demonstraram que ratos submetidos à restrição proteica intrauterina apresentaram redução dos níveis de expressão proteica de várias proteínas da via insulina/IGF (IRS-1, PI3K e AKT fosforilados) em tecido adiposo periepídídimo, sendo este resultado considerado um indicador do desenvolvimento de resistência à insulina e síndrome metabólica na idade adulta. Estes autores não observaram variação nos níveis de expressão do RNAm e das proteínas totais destas vias. Resultados similares foram observados por Chen et al. (2009), que demonstraram redução apenas na expressão da forma fosforilada de AKT e PI3K no músculo estriado esquelético de ratos machos que sofreram restrição proteica intrauterina. Em conjunto, estes resultados além de evidenciar a alteração da via insulina/IGF em animais submetidos à restrição proteica, também reforçam a necessidade de se avaliar não somente a expressão gênica destes alvos, mas também eventos pós-traducionais, para um melhor entendimento destas vias.

1.3 Próstata, Programação Fetal e Via Insulina/IGF.

Nos últimos anos tem aumentado o número de estudos avaliando as funções reprodutivas em animais submetidos à restrição proteica durante a gestação/lactação (COLOMBELLI et al., 2017; PINHO et al., 2014; RINALDI et al., 2013; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2012; ZAMBRANO et al., 2005). Estes estudos relatam que os animais submetidos a uma gestação restrita demonstram alterações como: atraso no tempo de instalação da puberdade, menor taxa de fertilidade, redução da distância ano-genital, alteração na concentração sérica de testosterona e estradiol, menor expressão de receptores de andrógenos no testículo e na próstata, mas os efeitos do envelhecimento neste modelo ainda são escassos.

Particularmente, a via de sinalização da Insulina/IGF tem sido diretamente relacionada à morfofisiologia prostática (CULIG et al., 1996; RUAN et al., 1999), assim como no desenvolvimento da hiperplasia prostática benigna e do câncer de próstata com o envelhecimento (SINGH; ALEX; BAST, 2014; VIKRAM; JENA, 2011; WU; YU, 2014). O IGF-I é considerado o principal fator de crescimento que regula positivamente a proliferação e a diferenciação do compartimento epitelial prostático, sendo tão necessário quanto à testosterona para o desenvolvimento e crescimento glandular normal (KLEINBERG et al., 2007; RUAN et al., 1999). Na próstata, o estroma é a maior fonte de IGF-I, que é secretado e se liga ao IGF-IR na membrana plasmática das células epiteliais, induzindo a expressão de genes alvo (OHLSON et al., 2007).

Ruan et al. (1999) demonstraram que camundongos com 44 dias de idade *knockout* para (IGF-I/-) apresentaram próstatas com ácinos pouco desenvolvidos e com menos ramificações ductais. Ainda, esses autores demonstraram que o tratamento com IGF-I exógeno foi capaz de reverter parcialmente os efeitos observados nos animais transgênicos. Em outro experimento, foi demonstrado que a administração de testosterona a ratos diabéticos (diabetes tipo 1) castrados não foi suficiente para recuperar a atrofia glandular induzida pela privação androgênica. Entretanto, quando estes animais foram tratados com testosterona e insulina após a castração, ocorreu completa recuperação glandular (VIKRAM; JENA, 2011). Estes resultados enfatizam a importância do eixo Insulina/IGF como indutor do crescimento prostático (SANTOS et al., 2014).

Além de sua importância para a fertilidade, nos últimos anos, a próstata tem despertado grande interesse médico-científico pela alta incidência de doenças, principalmente a hiperplasia prostática benigna (HPB) e o câncer de próstata (CaP) em indivíduos senis (DASGUPTA; SRINIDHI; VISHWANATHA, 2012; SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2013). Alterações morfofuncionais associadas ao envelhecimento estão intimamente relacionadas à maior incidência de distúrbios prostáticos. Estas incluem: diminuição do nível de andrógenos (WANG et al., 2017), acúmulo de

danos no DNA (MALINS et al., 2001) e desequilíbrio entre os níveis de proliferação e morte celular (BANERJEE; BANERJEE; BROWN, 2000). Além disso, alterações na sensibilidade hormonal e nos níveis de expressão de fatores de crescimento, como os do eixo Insulina/IGF estão relacionados às características hiperproliferativas da próstata de homens idosos (CAMPOS et al., 2010; ER et al., 2017; QU et al., 2017; RUFFION et al., 2003).

Estudos experimentais demonstraram que a prole feminina de ratas submetidas à restrição proteica gestacional e lactacional desenvolveram hiperinsulinemia, resistência à insulina e diabetes tipo 2 aos 21 meses de idade. Estes resultados foram atribuídos à desregulação na via de sinalização da insulina induzida pela programação fetal por restrição proteica (BERENDS et al., 2013; FERNANDEZ-TWINN et al., 2004; OZANNE, 2001b).

Além disso, já foi demonstrado aumento dos níveis de estradiol circulante em ratas gestantes alimentadas com uma dieta hipoproteica (BRAZ et al., 2017). Considerando o papel da via da Insulina/IGF, assim como do estrógeno para o desenvolvimento e manutenção glandular, estes resultados evidenciam impacto negativo da restrição proteica gestacional sobre a próstata. Desta maneira, a via de sinalização da Insulina/IGF parece um alvo promissor para estudos que visam a descoberta de agentes terapêuticos para o tratamento de desordens prostáticas (MEINBACH; LOKESHWAR, 2006; WU et al., 2006).

1.4 Morfofisiologia prostática.

A próstata é uma glândula exócrina acessória do sistema genital masculino cujo desenvolvimento e homeostasia se encontram sob controle androgênico (CUNHA et al., 1985). É composta por dois compartimentos principais, o epitélio e o estroma, que interagem de forma recíproca através de diferentes vias de sinalização (NIETO; RIDER; CRAMER, 2014). Sua secreção, importante para formar o fluido seminal, é composta de fosfatase ácida, ácido cítrico, fibrinolizina, enzimas específicas e outros fatores componentes deste fluido. Esta secreção é essencial para o sucesso reprodutivo, pois influencia a motilidade espermática e a capacidade dos espermatozoides em fecundar o ovócito (AUMÜLLER; SEITZ, 1990).

Além disso, a secreção prostática também participa da formação do plug copulatório em algumas espécies, que atua como uma proteção contra a superfecundação (CUNHA et al., 1987). A principal proteína secretada pela próstata do homem é o antígeno prostático específico (PSA), pertencente à família das calicreínas. Esta serina protease é importante para a dissolução do coágulo seminal (WANG et al., 2017).

Anatomicamente, a próstata está localizada no compartimento subperitoneal entre o diafragma pélvico e a cavidade peritoneal. Está localizada posterior à sínfise púbica, anterior ao reto e inferior

à bexiga urinária. Em condições normais em um indivíduo adulto, tem a forma de uma “noz” e pesa aproximadamente 30-40 gramas e circunda a parte prostática da uretra (LEE; AKIN-OLUGBADE; KIRSCHENBAUM, 2011).

A próstata do homem é um órgão dividido em três conjuntos de glândulas túbulo alveolares, como descritas a seguir: 1) glândulas da zona central (equivale a 5% da próstata); 2) glândulas da zona periférica (que corresponde a 70% da próstata e é a região mais acometida por câncer); 3) glândulas da zona de transição (compreende cerca de 25% do tecido prostático (Figura 4A). Externamente, a próstata é envolvida por uma camada de tecido fibroelástico, conferindo-lhe uma aparência não lobulada (ROY-BURMAN et al., 2004; VALKENBURG; WILLIAMS, 2011).

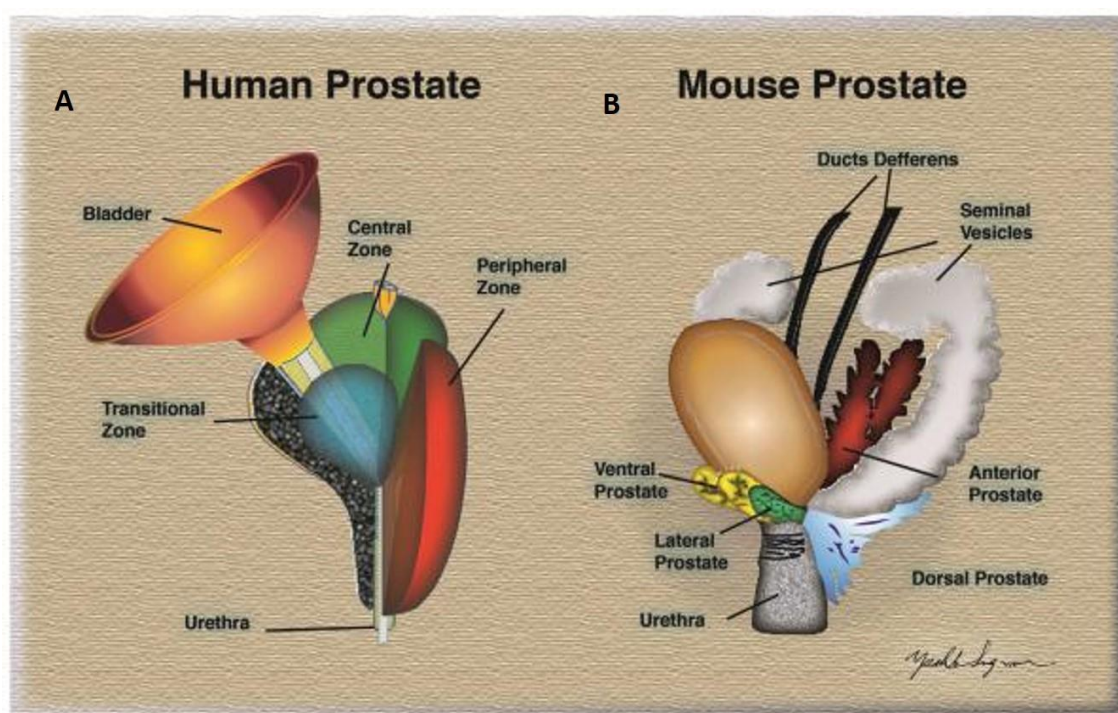


Figura 4. Organização anatômica da próstata humana (A) e da próstata de roedores (B). (AARON; FRANCO; HAYWARD, 2016).

A próstata de roedores tem um padrão diferentes da próstata do homem, ela se divide em pares de lobos, são eles: ventrais, dorsais, laterais e anteriores (AARON; FRANCO; HAYWARD, 2016) (Figura 4 B). Apesar das diferenças anatômicas, tanto a próstata humana como a de roedores é composta por estruturas tubuloalveolares revestidas por epitélio simples, constituído de células secretoras, basais e neuroendócrinas, todas apoiadas em uma membrana basal composta principalmente por laminina e colágeno tipo IV (NEMETH; LEE, 1996). O epitélio é sustentado por estroma formado de células musculares lisas e fibroblastos, além de mastócitos, macrófagos, vasos e

nervos. Ao redor destas células, existe uma complexa matriz extracelular (MEC) composta por fibras colágenas, fibras reticulares, fibras do sistema elástico, proteoglicanos e diversas glicoproteínas. O estroma é denso na próstata humana e mais frouxo nos lobos prostáticos dos roedores (MCNEAL, 1988; NEMETH; LEE, 1996).

No rato, os lobos são envoltos por uma capsula de tecido conjuntivo e por tecido adiposo. Os diferentes lobos prostáticos diferem quanto ao padrão de ramificação dos ductos (HAYASHI et al., 1991), padrão de expressão gênica (TAKEDA et al., 1990) e resposta à hormônios (PRINS et al., 2006). Além disso cada lobo apresenta características histológicas próprias como extensas pregas epiteliais na próstata anterior (PA), dobras epiteliais menores na próstata dorsal (PD) e lateral (PL) e pregas mínimas na próstata ventral (PV), a exceção da região distal dos ductos, que apresentam-se altamente pregueados (CUNHA et al., 1987) (Figura 5).

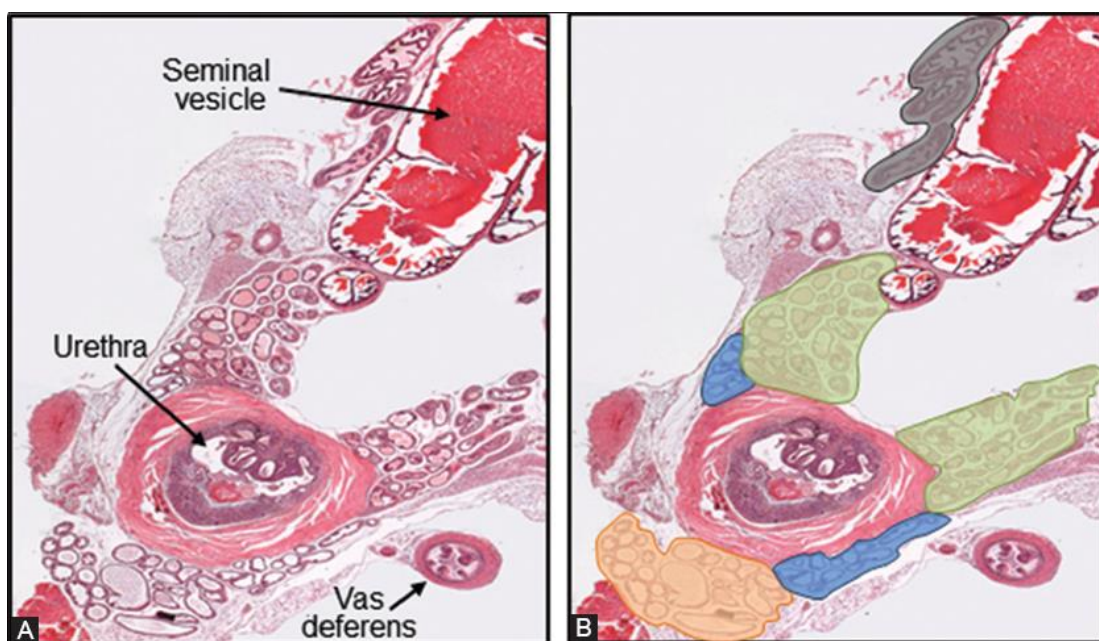


Figura 5. Secção transversal de um trato urogenital normal de um rato macho adulto. (A) adjacente aos lobos da próstata pode ser visto a uretra e um canal deferente; (B) os diferentes lóbulos da próstata foram destacados em laranja (Próstata ventral- PV), azul claro (Próstata lateral- PL), verde (Próstata dorsal- PD) e cinza (Próstata anterior- PA). Coloração: Hematoxilina e Eosina (HE) (OLIVEIRA et al., 2016).

1.5 Alterações prostáticas

A próstata é a glândula acessória do sistema genital masculino mais acometida por lesões com o envelhecimento. Atualmente, o câncer de próstata é a segunda causa de morte relacionada ao câncer no homem, atrás apenas do câncer de pele não-melanoma (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016). Além dos andrógenos, os estrógenos desempenham papel fundamental na homeostase da próstata e também podem contribuir para o desenvolvimento de doenças (NELLES; HU; PRINS, 2011). Assim, exposições inadequadas a estrógenos durante o período de desenvolvimento e crescimento prostático, pode pré-dispor a glândula a um risco aumentado de desenvolver câncer (PRINS, 2008; PRINS et al., 2006).

Em modelos roedores, as lesões prostáticas são pouco frequentes, para isso são necessárias alterações genéticas ou insultos químicos para iniciar, promover e progredir o desenvolvimento de lesões (ABATE-SHEN; SHEN, 2000; CHEN et al., 2005; PYLKKÄNEN et al., 1993; WANG et al., 2003). Dentre as alterações prostáticas mais importantes podemos descrever a atrofia epitelial, hipertrofia epitelial, neoplasia intraepitelial prostática (NIP) e adenocarcinoma *in situ* (BOSLAND, 1998; SHAPPELL et al., 2004).

A atrofia é uma resposta adaptativa a um ambiente não propício, como baixos níveis de andrógenos. Se caracteriza por diminuição da altura do epitélio secretor, devido à perda de conteúdo celular e consequente perda de volume glandular (SHAPPELL et al., 2004). Existem três tipos de hiperplasia epitelial, a hiperplasia reativa e mais dois tipos de hiperplasia não reativa (funcional e atípica). A hiperplasia reativa ocorre em associação com infiltrado inflamatório, com espessamento do epitélio dos ácinos prostáticos, passando a ter de duas a três camadas de células, as células hiperplásicas se mantêm uniformes e a estrutura glandular é mantida (SHAPPELL et al., 2004).

A hiperplasia fisiológica ou funcional pode ser focal, multifocal ou difusa e acomete a periferia da glândula prostática. Tem como característica o acúmulo de células epiteliais colunares altas, formando projeções em direção ao lúmen da glândula, contém células com características morfológicas normais, e diferente da hiperplasia reativa, não apresenta estratificação do epitélio (SHAPPELL et al., 2004). A hiperplasia atípica ou patológica pode ser focal ou multifocal, que acomete até três alvéolos prostáticos, a lesão consiste de aumento na celularidade no epitélio secretor, formando duas ou mais camadas celulares, mas sem obliterar a luz do alvéolo, podem ser observadas projeções papilares (SHAPPELL et al., 2004).

As espessas camadas de células podem ter padrão cribriforme (que possui sua forma semelhante à do crivo, utensílio perfurado), mas a arquitetura alveolar da glândula e a quantidade de secreção no alvéolo acometido é mantida. Em comparação com células epiteliais normais, estas células atípicas

apresentam perda da polaridade e aumento na proporção entre citoplasma/núcleo celular, se apresentando de forma dilatada. O citoplasma é levemente eosinofílico e o núcleo hipercromático, muitas vezes com o nucléolo bastante evidente. As alterações morfológicas nas células são pequenas e figuras de mitose são incomuns (SHAPPELL et al., 2004).

Adenocarcinoma *in situ*, é a lesão potencialmente precursora do adenocarcinoma invasivo (BAALBERGEN; HELMERHORST, 2014). Este tumor se desenvolve a partir de uma proliferação epitelial interalveolar, que pode preencher completamente a luz de um ou mais alvéolos prostáticos, alterações na arquitetura alveolar e compressão de tecidos adjacentes são características deste tipo de lesão, há grande variação morfológica em lesões mais severas. As células não apresentam polaridade, tem formato poligonal com seu volume aumentado, o citoplasma tem coloração mais eosinofílica que o epitélio normal. O núcleo é hipercromático com o tamanho aumentado. Figuras mitóticas são comuns e não estão associadas a processo inflamatório (BOSLAND, 1998; SHAPPELL et al., 2004).

2. Justificativa e relevância do tema proposto

A próstata é o órgão mais frequentemente acometido por neoplasia no homem. Além disso, a fundamental participação da próstata no processo reprodutivo tem motivado estudos sobre a biologia celular, molecular e endocrinologia desse órgão. Devido às conhecidas alterações metabólicas causadas pela PF, e a influência do ambiente intrauterino sobre a origem de doenças na idade adulta, acreditamos ser extremamente relevante avaliar os efeitos da PF por restrição proteica gestacional e lactacional, sobre o crescimento prostático e suas repercussões no envelhecimento da prole submetida a esta programação. Dando especial enfoque na investigação das vias de sinalização da insulina/IGF, e dos níveis hormonais da prole.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Este estudo tem por objetivo, investigar os efeitos da PF por restrição proteica gestacional e lactacional sobre a histofisiologia do lobo prostático ventral no crescimento e envelhecimento da prole masculina de ratos da linhagem *Sprague Dawley*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da PF por restrição proteica na gestação/lactação sobre os parâmetros biométricos da prole no dia pós-natal (DPN) 21 e 540;

- Avaliar se os efeitos da PF por restrição proteica na gestação/lactação alteram os níveis séricos de testosterona, estrógeno, IGF-I, IGF-II e insulina na prole de machos;
- Avaliar os efeitos da PF por restrição proteica sobre os parâmetros morfológicos e morfométricos do lobo prostático ventral da prole;
- Investigar se os ratos, filhos de mães restritas, apresentam alteração na expressão gênica e proteica de moléculas da via de sinalização da insulina/IGF;
- Avaliar a incidência e severidade de lesões prostáticas nos animais no DPN 540.
- Avaliar a expressão global de proteínas por análise proteômica.
- Utilizar ferramentas de enriquecimento para comparar dados já depositados com as nossas análises.

4. Resultados

Os resultados obtidos encontram-se descritos nos próximos 2 capítulos (capítulos 2 e 3). O manuscrito referente ao capítulo 2 encontra-se em análise pelo Periódico *Journal of Gerontology* e o capítulo 3 será submetido ao Periódico *Journal of Proteomic Research*.

5. Referências

- AARON, L.; FRANCO, O. E.; HAYWARD, S. W. Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. **The Urologic clinics of North America**, v. 43, n. 3, p. 279–88, ago. 2016.
- ABATE-SHEN, C.; SHEN, M. M. Molecular genetics of prostate cancer. **Genes & development**, v. 14, n. 19, p. 2410–34, 1 out. 2000.
- AUMÜLLER, G.; SEITZ, J. Protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands. **International review of cytology**, v. 121, p. 127–231, 1990.
- BAALBERGEN, A.; HELMERHORST, T. J. M. Adenocarcinoma in Situ of the Uterine Cervix—A Systematic Review. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 24, n. 9, p. 1543–1548, nov. 2014.
- BANERJEE, S.; BANERJEE, P. P.; BROWN, T. R. Castration-Induced Apoptotic Cell Death in the Brown Norway Rat Prostate Decreases as a Function of Age. **Endocrinology**, v. 141, n. 2, p. 821–832, fev. 2000.
- BARKER, D. J. et al. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life,

and mortality from cardiovascular disease. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 298, n. 6673, p. 564–7, 4 mar. 1989.

BARKER, D. J. P. The developmental origins of adult disease. **European journal of epidemiology**, v. 18, n. 8, p. 733–6, 2003.

BENNIS-TALEB, N. et al. A low-protein isocaloric diet during gestation affects brain development and alters permanently cerebral cortex blood vessels in rat offspring. **The Journal of nutrition**, v. 129, n. 8, p. 1613–9, ago. 1999.

BERENDS, L. M. et al. Catch-up growth following intra-uterine growth-restriction programmes an insulin-resistant phenotype in adipose tissue. **International journal of obesity (2005)**, v. 37, n. 8, p. 1051–7, ago. 2013.

BOSLAND, M. C. **Proliferative Lesions of the Prostate and Other Accessory Sex Glands in Male Rats**. [s.l.] Society of Toxicologic Pathologists, 1998.

BRAZ, G. R. F. et al. Maternal low-protein diet in female rat heart: possible protective effect of estradiol. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 8, n. 3, p. 322–330, 7 jun. 2017.

BURNS, S. P. et al. Gluconeogenesis, glucose handling, and structural changes in livers of the adult offspring of rats partially deprived of protein during pregnancy and lactation. **The Journal of clinical investigation**, v. 100, n. 7, p. 1768–74, 1 out. 1997.

CAMPOS, S. G. P. et al. Tissue changes in senescent gerbil prostate after hormone deprivation leads to acquisition of androgen insensitivity. **International journal of experimental pathology**, v. 91, n. 5, p. 394–407, out. 2010.

CHEN, J.-H. et al. Maternal protein restriction affects postnatal growth and the expression of key proteins involved in lifespan regulation in mice. **PloS one**, v. 4, n. 3, p. e4950, 2009.

CHEN, Z. et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. **Nature**, v. 436, n. 7051, p. 725–730, 4 ago. 2005.

COLOMBELLI, K. T. et al. Impairment of microvascular angiogenesis is associated with delay in prostatic development in rat offspring of maternal protein malnutrition. **General and Comparative Endocrinology**, v. 246, p. 258–269, 15 maio 2017.

CULIG, Z. et al. Regulation of prostatic growth and function by peptide growth factors. **The Prostate**, v. 28, n. 6, p. 392–405, jun. 1996.

CUNHA, G. R. et al. Stromal-epithelial interactions in adult organs. **Cell differentiation**, v. 17, n. 3, p. 137–48, set. 1985.

CUNHA, G. R. et al. The Endocrinology and Developmental Biology of the Prostate*. **Endocrine Reviews**, v. 8, n. 3, p. 338–362, ago. 1987.

DAHRI, S. et al. Islet function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation. **Diabetes**, v. 40 Suppl 2, p. 115–20, dez. 1991.

DASGUPTA, S.; SRINIDHI, S.; VISHWANATHA, J. K. Oncogenic activation in prostate cancer progression and metastasis: Molecular insights and future challenges. **Journal of carcinogenesis**, v. 11, p. 4, jan. 2012.

DUPONT, J.; HOLZENBERGER, M. Biology of insulin-like growth factors in development. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 69, n. 4, p. 257–271, dez. 2003.

ER, V. et al. Post-diagnosis serum insulin-like growth factors in relation to dietary and lifestyle changes in the Prostate testing for cancer and Treatment (ProtecT) trial. **Cancer Causes & Control**, v. 28, n. 8, p. 877–888, 23 ago. 2017.

FERNANDEZ-TWINN, D. S. et al. Maternal protein restriction leads to hyperinsulinemia and reduced insulin-signaling protein expression in 21-mo-old female rat offspring. **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, n. 2, p. R368–R373, 30 set. 2004.

FIDALGO, M. et al. Programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during gestation and lactation are attenuated by maternal moderate–low physical training. **British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 3, p. 449–456, 1 fev. 2013.

HABIB, S.; ZHANG, Q.; BAUM, M. Prenatal Programming of Hypertension in the Rat: Effect of Postnatal Rearing. **Nephron Extra**, v. 1, n. 1, p. 157–165, jan. 2011.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**, v. 35, n. 7, p. 595–601, jul. 1992.

HAYASHI, N. et al. Morphological and functional heterogeneity in the rat prostatic gland. **Biology of reproduction**, v. 45, n. 2, p. 308–21, ago. 1991.

KLEINBERG, D. L. et al. Insulin-Like Growth Factor (IGF)-I Controls Prostate Fibromuscular Development: IGF-I Inhibition Prevents Both Fibromuscular and Glandular Development in Eugonadal Mice. **Endocrinology**, v. 148, n. 3, p. 1080–1088, mar. 2007.

KOJIMA, S. et al. Implications of insulin-like growth factor-I for prostate cancer therapies. **International Journal of Urology**, v. 16, n. 2, p. 161–167, fev. 2009.

LEE, C. H.; AKIN-OLUGBADE, O.; KIRSCHENBAUM, A. Overview of Prostate

Anatomy, Histology, and Pathology. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 40, n. 3, p. 565–575, set. 2011.

LONG, E.; HUYNH, H. T.; ZHAO, X. Involvement of Insulin-Like Growth Factor-1 and Its Binding Proteins in Proliferation and Differentiation of Murine Bone Marrow-Derived Macrophage Precursors. **Endocrine**, v. 9, n. 2, p. 185–192, out. 1998.

MALINS, D. C. et al. Age-related radical-induced DNA damage is linked to prostate cancer. **Cancer research**, v. 61, n. 16, p. 6025–8, 15 ago. 2001.

MCNEAL, J. E. Normal histology of the prostate. **The American journal of surgical pathology**, v. 12, n. 8, p. 619–33, ago. 1988.

MEINBACH, D. S.; LOKESHWAR, B. L. Insulin-like growth factors and their binding proteins in prostate cancer: Cause or consequence? ☆. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 24, n. 4, p. 294–306, jul. 2006.

MERICQ, V. et al. Long-term metabolic risk among children born premature or small for gestational age. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 50–62, 19 ago. 2016.

MURPHY, V. E. et al. Endocrine Regulation of Human Fetal Growth: The Role of the Mother, Placenta, and Fetus. **Endocrine Reviews**, v. 27, n. 2, p. 141–169, abr. 2006.

NELLES, J. L.; HU, W.-Y.; PRINS, G. S. Estrogen action and prostate cancer. **Expert review of endocrinology & metabolism**, v. 6, n. 3, p. 437–451, 10 maio 2011.

NEMETH, J. A.; LEE, C. Prostatic ductal system in rats: Regional variation in stromal organization. **The Prostate**, v. 28, n. 2, p. 124–128, fev. 1996.

NICHOLAS, L. M. et al. Differential effects of exposure to maternal obesity or maternal weight loss during the periconceptional period in the sheep on insulin signalling molecules in skeletal muscle of the offspring at 4 months of age. **PloS one**, v. 8, n. 12, p. e84594, 2013.

NIETO, C. M.; RIDER, L. C.; CRAMER, S. D. Influence of stromal-epithelial interactions on androgen action. **Endocrine Related Cancer**, v. 21, n. 4, p. T147–T160, 22 jul. 2014.

OHLSON, N. et al. Castration-induced epithelial cell death in human prostate tissue is related to locally reduced IGF-1 levels. **The Prostate**, v. 67, n. 1, p. 32–40, 1 jan. 2007.

OLIVEIRA, D. S. M. et al. The mouse prostate: a basic anatomical and histological guideline. **Bosnian journal of basic medical sciences**, v. 16, n. 1, p. 8–13, 10 fev. 2016.

OZANNE, S. E. Programming of hepatic and peripheral tissue insulin sensitivity by maternal protein restriction. **Biochemical Society transactions**, v. 27, n. 2, p. 94–7, fev. 1999.

OZANNE, S. E. Metabolic programming in animals. **British medical bulletin**, v. 60, p. 143–52, 2001a.

OZANNE, S. E. **Metabolic programming in animals** *British Medical Bulletin*, 2001b.

PAULINO-SILVA, K. M.; COSTA-SILVA, J. H. Hypertension in rat offspring subjected to perinatal protein malnutrition is not related to the baroreflex dysfunction. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 43, n. 11, p. 1046–1053, nov. 2016.

PINHO, C. F. et al. Gestational protein restriction delays prostate morphogenesis in male rats. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 7, ago. 2014.

PLAGEMANN, A. et al. Hypothalamic nuclei are malformed in weanling offspring of low protein malnourished rat dams. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 10, p. 2582–9, out. 2000.

PRINS, G. S. et al. The role of estrogens in normal and abnormal development of the prostate gland. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1089, p. 1–13, nov. 2006.

PRINS, G. S. Endocrine disruptors and prostate cancer risk. **Endocrine-related cancer**, v. 15, n. 3, p. 649–56, set. 2008.

PYLKKÄNEN, L. et al. Prostatic dysplasia associated with increased expression of c-myc in neonatally estrogenized mice. **The Journal of urology**, v. 149, n. 6, p. 1593–601, jun. 1993.

QASEM, R. J. et al. Elucidation of thrifty features in adult rats exposed to protein restriction during gestation and lactation. **Physiology & Behavior**, v. 105, n. 5, p. 1182–1193, 20 mar. 2012.

QU, X. et al. Update of IGF-1 receptor inhibitor (ganitumab, dalotuzumab, cixutumumab, teprotumumab and figitumumab) effects on cancer therapy. **Oncotarget**, v. 8, n. 17, p. 29501–29518, 24 abr. 2017.

RINALDI, J. C. et al. Implications of intrauterine protein malnutrition on prostate

growth, maturation and aging. **Life Sciences**, v. 92, n. 13, p. 763–774, 19 abr. 2013.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, G. L. et al. Maternal protein restriction in pregnancy and/or lactation affects seminiferous tubule organization in male rat offspring. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 3, n. 5, p. 321–326, 8 out. 2012.

ROY-BURMAN, P. et al. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. **Endocrine-related cancer**, v. 11, n. 2, p. 225–54, jun. 2004.

RUAN, W. et al. Evidence That Insulin-Like Growth Factor I and Growth Hormone Are Required for Prostate Gland Development ¹. **Endocrinology**, v. 140, n. 5, p. 1984–1989, maio 1999.

RUFFION, A. et al. The survival effect of prolactin on PC3 prostate cancer cells. **European urology**, v. 43, n. 3, p. 301–8, mar. 2003.

SANTOS, S. A. A. et al. Impact of gestational diabetes and lactational insulin replacement on structure and secretory function of offspring rat ventral prostate. **General and Comparative Endocrinology**, v. 206, p. 60–71, 15 set. 2014.

SENE, A. et al. Impaired Cholesterol Efflux in Senescent Macrophages Promotes Age-Related Macular Degeneration. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 4, p. 549–561, 2 abr. 2013.

SHAPPELL, S. B. et al. Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. **Cancer research**, v. 64, n. 6, p. 2270–305, 15 mar. 2004.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2016. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 66, n. 1, p. 7–30, jan. 2016.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2013. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 63, n. 1, p. 11–30, jan. 2013.

SINGH, P.; ALEX, J. M.; BAST, F. Insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor receptor 1 (IGF-1R) signaling systems: novel treatment strategies for cancer. **Medical Oncology**, v. 31, n. 1, p. 805, 14 jan. 2014.

TAKEDA, H. et al. Immunohistochemical localization of androgen receptors with mono- and polyclonal antibodies to androgen receptor. **The Journal of endocrinology**, v. 126, n. 1, p. 17–25, jul. 1990.

VALKENBURG, K. C.; WILLIAMS, B. O. Mouse models of prostate cancer.

Prostate cancer, v. 2011, p. 895238, 2011.

VEGA, C. C. et al. Resveratrol partially prevents oxidative stress and metabolic dysfunction in pregnant rats fed a low protein diet and their offspring. **The Journal of Physiology**, v. 594, n. 5, p. 1483–1499, 2016.

VIKRAM, A.; JENA, G. Role of insulin and testosterone in prostatic growth: who is doing what? **Medical hypotheses**, v. 76, n. 4, p. 474–8, abr. 2011.

WANG, M. C. et al. Purification of a Human Prostate Specific Antigen1. **The Journal of Urology**, v. 197, n. 2, p. S148–S152, fev. 2017.

WANG, S. et al. Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer. **Cancer cell**, v. 4, n. 3, p. 209–21, set. 2003.

WU, J. D. et al. Interaction of IGF signaling and the androgen receptor in prostate cancer progression. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 99, n. 2, p. 392–401, 1 out. 2006.

WU, J.; YU, E. Insulin-like growth factor receptor-1 (IGF-IR) as a target for prostate cancer therapy. **Cancer metastasis reviews**, v. 33, n. 2–3, p. 607–17, 12 set. 2014.

ZAMBRANO, E. et al. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. **The Journal of Physiology**, v. 563, n. 1, p. 275–284, 15 fev. 2005.

ZANA-TAIEB, E. et al. Effect of two models of intrauterine growth restriction on alveolarization in rat lungs: morphometric and gene expression analysis. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e78326, 2013.

Capítulo 2.

Maternal low protein diet impairs prostate growth and induces prostate carcinogenesis in aged offspring rats

Sergio A. A. Santos¹, Ana C. Camargo¹, Flávia B. Constantino¹, Ketlin T. Colombelli¹,
Fernanda Mani², Jaqueline C. Rinaldi¹, Suelen Franco¹, Luiz M. F. Portela¹, Bruno O. S.
Duran¹, Wellerson R Scarano¹, Barry T Hinton³; Sergio L. Felisbino¹, Luis A Justulin¹

1. Department of Morphology, Institute of Biosciences, UNESP, Botucatu, SP,
Brazil

2. Department of Chemistry and Biochemistry, Institute of Biosciences, UNESP,
Botucatu, SP, Brazil

3. Department of Cell Biology, University of Virginia Health System,
Charlottesville, Virginia, EUA

Corresponding author: Luis A Justulin

Sao Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences of Botucatu, SP, Brazil.

Zip Code: 18618-689

Phone number: +551438800481

email: justulin@ibb.unesp.br

Abstract

Although the carcinogenesis is frequently linked to genetic background, exposure to environmental risk factors has gained attention as the etiologic agent for several types of cancer. The intrauterine microenvironment has been described as preponderant factor for offspring health; and maternal exposure to insults have been linked to chronic disease in aged offspring. Using a model of maternal exposure to low protein diet (LPD; 6% protein), we demonstrated that impairment of offspring rat prostatic growth at post-natal day (PND) 21 was associated with prostate carcinogenesis in aged offspring. One possible explanation is that high maternal estrogenic level exposes the offspring to an altered intrauterine microenvironment, which potentially imprinted prostate cells early during glandular morphogenesis, increasing cellular sensitivity to estrogen in aged rats. The accelerated prostate growth, observed at PND 21, associated with imbalance of estrogen/testosterone ratio and increased circulating IGF-1 in aged rats appears to contribute with the development of prostatic disorders, especially carcinoma in situ, which presented focally increase in cell proliferation, blood vessels and androgen receptor expression. Since less than 1% of Sprague-Dawley rats spontaneously developed prostate cancer, our study strongly pointed maternal LPD as a potential risk factor for induction of slow-growing prostate carcinogenesis in aged rat offspring.

1. Introduction

In last decades, the interest in maternal nutrition during pregnancy, and how it can impact offspring health has grown (1–4). Clinical and experimental studies have described the maternal exposure to environmental insults acts as risk factor, predisposing offspring to develop metabolic diseases throughout life. The initially controversial “Thrifty phenotype” or “Barker” hypothesis, described by Hales and Barker in 1992 (5) states that poor fetal and early post-natal nutrition produces permanent changes in glucose-insulin metabolism. This scenario reflects the impairment of endocrine pancreas development and accelerated β -cells failure in adult life (5), leading to cardiovascular diseases (6), insulin resistance and type 2 diabetes (7).

Although the majority of studies on the Barker hypothesis focused on metabolic and cardiovascular diseases (6), it has been demonstrated maternal LPD promoted impairment of prostate morphogenesis, growth and secretory activity in young rat offspring (8–11), with repercussions on the incidence of epithelial dysplasia in these animals with aging (9).

In view of this, Gardner proposed that *“Prostatic diseases, including carcinoma, are to be found in the in utero influences upon the developing prostate”* (12). Although this hypothesis has attracted enthusiasts, it was not fully explored, perhaps because the majority of studies on prostate cancer is conducted in sexually mature individuals (13). Barker et al., (14) also proposed such association between intrauterine environment and prostate cancer by correlated intercrystal diameters (ICD; maximum distance between the pelvic iliac crests) and incidence of prostate cancer in man born during 1934-1944 in Helsinki, Finland. As ICD determination during puberty occurs under estrogenic control (15), girls with higher ICD possibly presented elevated levels of estrogen. Moreover,

these authors suggested that estrogenic profile established at puberty may persist throughout the woman's reproductive life. High estrogenic levels could initiate prostate carcinogenesis in utero, as previously proposed for breast and ovarian cancers (16). While many questions need to be answered, this hypothesis highlighted the fundamental role of intrauterine period for prostate development and homeostasis throughout life (13,14).

Considering our previous results that demonstrated impairment of prostatic development associated with hormonal imbalance in offspring born from prenatally dams fed LPD (9,11), here, we hypothesized that impairment of prostate growth induced by maternal exposure to LPD is associated with origin of prostatic disorders in older offspring rats. Our results demonstrated that accelerated prostate growth at approximately PND 21, associated with an increased estrogen/testosterone ratio observed in aged LPD offspring can contribute to the slow-growing prostate carcinogenesis in aged rat offspring. Moreover, exposure to LPD during both gestational and lactational period increases the incidence and severity of prostatic disorders.

2. Material and Methods

2.1 Animals and experimental design

Adult female (90 days of age, n=36) and male (90 days of age, n=15) Sprague Dawley rats were obtained from the Central Stock breeder at the State University of Campinas (Campinas, SP, Brazil). The animals were maintained under controlled temperature conditions (22 to 25°C), relative humidity (55%), and a 12 hours photoperiod, with free access to water and chow. All procedures are in accordance with the ethical principles in Animal Research and the Brazilian legislation established by the Brazilian Council of Control in Animal Experimentation and approved by the Biosciences Institute/UNESP Ethics Committee for Animal Experimentation (Protocol #573).

Virgin female rats were mated overnight with established male breeders and after confirmation of pregnancy, the rats were fed with isocaloric and normosodic control diet (17% protein) or low protein diet (6% protein) during gestation or during gestation and lactation. Thus, pregnant females were distributed into three experimental groups (n=12/group): Control (CTR): Dams fed normal protein diet; Gestational low protein (GLP): Dams fed low protein diet during gestation; and Gestational and Lactational low protein (GLLP): Dams fed low protein diet during gestation and lactation (Figure S 1). Normal and low protein diets were provided by PragSoluções (PragSoluções, SP, Brazil, Table S 4). These diets were used as previously described (9,11).

Maternal and offspring biometric parameters were measured throughout the study. At PND 21 and 540, male offspring were weighed and euthanized. Blood samples were collected for biochemical and hormonal analysis and urogenital complex and ventral prostate (VPs) lobes were collected, weighed, and processed as described below.

2.2 Blood serum analysis

Blood samples (n=12/group) were centrifuged (2400 g for 20 min) and serum stored at -20°C until use. The serum concentrations of albumin (19-1/250 Labtest, MG, Brazil), total proteins (99-250 Labtest, MG, Brazil), glucose (177013 Laborlab, MG, Brazil) and triglycerides (1770290 Laborlab, MG, Brazil) were determined in dams and offspring on PND 21 and 540 by colorimetric methods using manufacturers' protocols.

The serum estradiol (dams and offspring) (Monobind®, 4925-300 CA, USA sensitivity: 6.5 pg/mL) and offspring testosterone (Monobind®, 3725-300A, CA, USA. sensitivity: 0.038 ng/mL), progesterone (Monobind®, 4825-300, CA, USA, sensitivity: 0.105 ng/mL), IGF-1 (R&D, MG100, MA, USA, sensitivity: 8.4 pg/mL), IGF-2 (Abnova, KA3322, CA, USA, sensitivity: 5 pg/mL) and insulin (Millipore, EZRMI-13k, MA, USA,

sensitivity: 0.2 ng/mL) were determined by colorimetric methods using manufacturers' protocol.

2.3 Histological and morphometric-stereological procedure

The VP lobes from PND 21 and 540 (n = 12/group) were fixed in Methacarn and processed for morphometric-stereological analysis. The relative proportion of the VP components (epithelium, stroma and lumen) was determined by stereological analysis (11,17). The results were expressed as a percentage of each component and a proportion of the total area analyzed.

2.4 Immunohistochemistry (IH) and Immunofluorescence (IF)

Histological sections of 5 μ m (n= 06/group) were deparaffinized, rehydrated, quenched in H₂O₂/methanol solution (for IH) and boiled for 30' in 10 mM sodium citrate solution for antigen retrieval. Prostatic sections were blocked in 5% nonfat milk in PBS and incubated with specific primary antibodies overnight at 4°C. Slides were washed in PBS and incubated for 01 hour at room temperature in either horseradish peroxidase HRP-conjugated secondary antibody (IH) or Alexa Fluor 488/568-conjugated (IF) (see Table S 2 for antibody specifications and dilutions used). The slides were washed, and the IH reaction was developed using 3,3'-Diaminobenzidine (DAB, Sigma), counterstained for 30 seconds in Hematoxylin or mounted with Vectashield for IF. IH reactions were analyzed using a Leica DMLB 80 microscope, while imaging from IF were acquired by scanning confocal microscope TCS SP5 (Leica Microsystems, UK).

2.5 Western blotting

Western blotting was performed as described by Colombelli et al., (11). Briefly, 70 μ g of total protein from each experimental group (n=6/group) was resolved on 8% denaturing polyacrylamide gel (SDS-PAGE). Protein was trans-blotted onto a nitrocellulose membrane (Millipore, USA), blocked in 5% non-fat milk and incubated with the specific

primary antibodies (see Table S 5 for antibody specifications and dilutions used). After several washes in TBS-T, the blots were incubated with a horseradish peroxidase HRP-conjugated secondary antibody at room temperature for 1 h. Membranes were developed using the Chemiluminescent HRP antibody detection ECL reagent (Amersham, USA). The ECL signals were captured using a CCD camera (ImageQuant LAS 4000 mini®; GE Healthcare™). The integrated optical densities (IODs) of the targeted protein bands were measured using ImageJ software (National Institutes of Health, USA). The expression levels were normalized to β -actin and the normalized results were expressed in fold change as the mean $\pm$ SD.

2.6 RT-qPCR

Total RNA was extracted from prostate samples (n=6/group) using TRIzol® Reagent (ThermoFisher Scientific, USA), according to the manufacturer's recommendations. RNA integrity was evaluated through capillary electrophoresis in a 2100 Bioanalyzer (Agilent, USA), which provided a RNA integrity number (RIN) based on 28S and 18S ribosomal RNAs. Only samples with a RIN $\geq$ 7.0 were used. The extracted RNA was treated with DNase I (Amplification Grade; ThermoFisher Scientific, USA) to eliminate any possible contaminating genomic DNA from the samples. RNA reverse transcription was performed using a High Capacity cDNA Archive Kit (ThermoFisher Scientific, USA) according to the manufacturer's guidelines.

mRNA expression levels were measured by RT-qPCR using QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA). All qPCRs performed were compliant with the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR experiments (MIQE) guidelines (18). The cDNA samples from PND 21 animals were amplified using SYBR® Green Master Mix (ThermoFisher Scientific, USA) and specific primers were synthesized by Invitrogen (USA) (Supplementary Table S 6). Due to high

variability using SYBR® Green methods, the samples from PND 540 were amplified using TaqMan® Universal PCR Master Mix and TaqMan® Gene Expression Assays (ThermoFisher Scientific, USA) (Supplementary Table S 7). The relative quantification of expression was performed by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (19) using the DataAssist™ v3.01 software (Thermo Fisher Scientific, USA). According to the expression stability among all samples, the reference gene *Gusb* (*glucoronidase beta*) was used to normalize mRNA expression of PND 21 samples, and reference genes *Purb* (*purine rich element binding protein B*) and *Actb* (*actin beta*) were used to normalize mRNA expression of PND 540 samples.

2.7 Histopathological analysis

Four histological sections (n=12/group) were collected in the range of 200 µm and stained with HE. The histopathological analysis followed the criteria described by Shapell (20), Bernoulli et al., (21) and Bosland et al., (22). The parameters analyzed were epithelial atrophy (predominant with more than 5 acini in the gland presenting atrophy), epithelial atrophy (moderate/discrete, with less than 5 acini in the gland presenting atrophy), physiological hypertrophy Peripheral hyperplasia, dysplasia, focal hyperplasia, Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and carcinoma in situ. An investigator (WRS), blinded to the experimental groups, analyzed the histological sections.

2.8 Statistical analysis

The statistical analyses (excepted histopathology) were performed using GraphPad Prism® software (version 5.00, Graph Pad, Inc., San Diego, CA). The results were submitted to analysis of variance (ANOVA), followed by the "Tukey-Kramer" test. For histopathological analysis, we used a contingency table followed by Fisher's test, in which all groups were compared two by two for VP lobes. The results were expressed as mean±SD and differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Maternal LPD induced biometrical and biochemical response in dams

At the end of gestation (gestational day 21, GD 21), dams fed low protein diet presented low body weight gain, although there are no changes in chow consumption and number of litter pups. At the end of weaning (post-natal day 21, PND 21), dams from gestational and lactacional low protein (GLLP) group showed reduced body weight associated with loss of total body fat mass compared to control (CTR) and gestational low protein (GLP). Serum concentration of triglycerides, total protein and albumin were also lower in dams from GLLP group, while glucose was unchanged in LPD groups compared to CTR. The serum estrogen concentration was higher GLLP group, compared with CTR and GLP groups (Table S 1).

3.2 Offspring`s body weight and biochemical parameters follows maternal response to LPD

At PND 0, 21 and 40, pups from LPD groups were smaller than those from CTR dams. However, between 180 and 360 days old, the body weight reach the values observed in CTR offspring. At 540 days, the GLLP offspring showed weight loss (Table 1 and Table S 3). At PND 21, triglycerides, total protein, albumin and glucose were reduced in LPD groups, with more expressive results observed in GLLP offspring. These parameters were completely recovered in LPD offspring at PDN 540, although body weight was reduced in GLLP group (Table S 2).

3.3 Maternal LPD causes hormonal imbalance in both weaned and aged offspring

The serum insulin, IGF-1 and progesterone were decreased in both LPD groups at PND 21 compared to CTR group. Conversely, the testosterone (17 β -hdroxy-4-androsten-3-

one) in GLP and GLLP and estrogen (17β -estradiol) only in GLLP was increased. At PND 540, both IGF-1 and estrogen were increased in both LPD groups, while testosterone was decreased. The insulin and progesterone at PND 540 and IGF-2 and in both age, did not change (Table 1).

3.4 The androgenic-dependent structures are impaired by maternal LPD

The urogenital complex (UGC) weight, ventral prostate (VP) weight and anogenital distance (AGD) were reduced at PND 21 in both LPD groups compared to CTR. These parameters were completely recovered at 540 days (Table 1).

3.5 Maternal LPD delays VP growth and impairs secretory function in male offspring

In both LPD groups at PND 21, there was a delay in glandular growth showing a reduction in the frequency of glandular components (luminal and epithelial compartments) (Figure 1 A and B). There is no change in proliferation (Figure 1 A and C) or apoptotic (Figure 1 D) indexes of epithelial cells. In spite of glandular impairment, the slightly non-significant reduction in prostatein expression (an androgen-stimulated secretory protein) in LPD groups (Figure 1 E) was observed.

At PND 540, the epithelial and luminal compartments were reduced (Figures 1 F and G), as well as prostatein secretion in LPD groups compared to CTR (Figure 1 J). There is no change in cell proliferation (Figure 1 F and H) or apoptosis (Figure 1 I).

3.6 Potential molecular pathways involved in maternal LPD-induced impairment of VP growth and secretory function

The androgen receptor (AR) was localized, by immunohistochemistry, mainly in the nuclei of epithelial cells at PND 21 (Figure 2 A). Interestingly, the AR expression was

higher in GLLP group, as determined by qualitative immunohistochemistry, RT-qPCR, and western blotting (Figures 2 A-C).

There was no change in *IR*, *Pi3K* and *AKT* mRNA expression (Figures 2 D, F and H, respectively). At protein levels, in GLLP, the total IR was reduced in spite of no change in p-IR (Tyr 1662/1663) (Figure 2 E). The total or p-Pi3K (Tyr 467) was unchanged (Figure 2 G), while total AKT was decreased in both LPD groups, the activation of p-AKT (Ser 473) was increased (Figure 2 I).

At PND 540, AR expression was decreased in both LPD groups (Figures 2 J-L). *IR*, *Pi3K* and *AKT* mRNA were reduced (Figures 2 M, O and Q, respectively), although total proteins expression was unchanged (Figures 2 N, P and R, respectively). The p-IR (Tyr-1662/1663) in GLLP and p-AKT (Ser-473) in both LPD groups was reduced, while there is no change in p-Pi3K (Tyr-467).

3.7 Maternal-LPD increases the incidence prostatic disorders and promotes carcinogenesis in aged offspring

Histopathological analysis showed an increase in prostatic disorders in LPD aged offspring. Although some prostatic disorders (frequently found during normal aging process) have been found in all experimental groups, the incidence and severity were increased in LPD groups. It was observed: epithelial atrophy, physiological and focal hyperplasia, epithelial dysplasia, intraepithelial neoplasia (PIN) and carcinoma in situ (Table 2 and Figure S 2).

Importantly, the carcinoma in situ, the most severe prostatic disorder detected in our experimental model, was diagnosed only in LPD groups (33% in GLP and 50% in GLLP group, Table 2, Figure S 3-4 and Figure 3 E). Histologically, it was characterized by the presence of dysplastic and high proliferative epithelial cells, microacinar structures and

AR and IGF-1R immunostaining. In the most voluminous carcinoma in situ, an intense microangiogenesis was observed (Figure 3A-F). The estrogen/androgen ratio is higher in both aged LPD groups compared to CTR (Figure 3 G).

4. Discussion

Our hypothesis is that the perinatal offspring exposure to high levels of estrogen, associated with the imbalance of estrogen/testosterone ratio in aged LPD offspring could explain, at least in part, the high incidence of prostatic lesions in these animals.

Zambrano et al. (23) demonstrated that pregnant rats exposed to LPD presented increased serum estrogen at gestational day 19. Here, we demonstrated that pregnant rats fed LPD until the end of lactation presented high levels of estrogen. However, when exposure to LPD occurs only during gestation, the estrogenic levels were similar to those from the CTR group. We hypothesize that the normal diet consumption from delivery to weaning can restore the maternal estrogenic levels, as observed for serum albumin, total protein and triglycerides. Although we did not quantify maternal hormone at delivery, the results from Zambrano et al. (23) highlighted the influence of gestational LPD in disrupting estrogenic homeostasis, which potentially affects prostatic morphogenesis. These results became more relevant because dams exposed to gestational and lactational LPD presented persistent augment in maternal estrogen levels, which in turn, lead to higher offspring's estrogen levels at PND 21. Consistent with this data, we observed a reduction of prostate growth in offspring from GLLP group at PND 21, as well as higher incidence of prostatic disorders in older rats.

In the last decade, several studies demonstrated impairment of rat prostate growth in offspring submitted to lactational LPD (9–11). In our study, although prostate growth

remained impaired, we observed an increase in serum testosterone at PND 21, as proposed by Ramos et al., (2010) and Teixeira et al., (2007) (10,24). On the other hand, Zambrano et al. (23) showed a reduction in serum testosterone in offspring born to dams fed LPD during gestation and lactation at the same age. Interestingly, these authors did not show changes in testosterone levels when dams were fed LPD only during gestation. Thus, maternal LPD during lactational period appears to affect the establishment of androgenic status in male offspring. In addition to impairment of prostate growth at PND 21, we demonstrated high expression of intraprostatic AR mRNA and protein. Moreover, the epithelial cell proliferation, which was reduced in LPD offspring at PND 10 (11), reached the values of control groups at PND 21 and was increased at PND 30 (9). The similar expression of prostatein also reinforces the recovery of prostate secretory function at this age. Although the accelerated growth restored organ weight, cellular differentiation, response to stimulatory factors and secretory activity remained impaired.

In our study, serum testosterone and prostatic AR expression were reduced in offspring at PND 540. Although serum IGF-1 was increased in these animals, the prostate downstream signaling pathway was decreased. Feres et al., (25) demonstrated previously that rat offspring submitted to gestational LPD presented decreased liver expression of both total and p-insulin receptor (IR) and its substrate (IRS-1). In another study, perinatal exposure to LPD decreased the downstream activation of insulin/IGF-1 signaling (IGF-1R, AKT and its phosphorylated forms) in the adrenal gland of sheep (26). Considering the importance of androgen and insulin/IGF-1 for prostatic homeostasis, the decrease in these hormones and growth-factor can reduce prostate secretion and negatively impact reproductive performance in offspring born to maternal LPD with aging, as observed by Zambrano's group (23,27).

The most surprising result of our study was the histopathological detection of prostate carcinoma in situ in aged LPD offspring. We suggest that increased estrogen/testosterone ratio in LPD offspring could be related to the prostatic disorders. Although the estrogenic levels normally increase during perinatal period, it declines during post-natal life (28). The abnormal maintenance of high levels of estrogen throughout life has been associated with increased risk of prostate cancer in offspring born from pregnant rats exposed to estrogenic compounds (EC) (13,29–33). One possible explanation is that EC *imprinted* prostate cells early during glandular morphogenesis, resulting in a programming memory that increased cellular sensitivity to estrogen in aged rats. Thus, we considered the imbalance of estrogen/testosterone ratio associated with aging process as the “second insult” (the first was maternal exposure to LPD) that potentially triggered the onset of prostatic lesions (34–37).

Moreover, in addition to the involvement of steroids hormones in prostatic disorders, other hormones and growth-factors were also involved in these processes. IGF-1 has been considered a key protein related to increase of cell proliferation and reduction of apoptosis in prostate cancer (38). High levels of circulating IGF-1 has been associated to activation of the PI3K/AKT pathway, that contributes to maintain prostate cancer growth (39,40). Although we demonstrated reduction in IGF-1 circulating levels in LPD offspring at PND 21, the values were higher in both LPD group on PND 540. We observed high levels of IGF-1R in blood vessels located in areas of prostate carcinoma in situ, demonstrating that IGF-1 signaling may contribute to carcinogenesis by stimulating angiogenesis and consequently, increasing the blood flow in the areas of prostate carcinoma in situ.

There are few studies correlating maternal diet and incidence of prostatic lesions in aged rats. Rinaldi et al. (9) demonstrated an increase in the incidence of epithelial dysplasia in the LPD offspring rat (360 days old). Benesh et al., (41) demonstrate that

hyperproliferation in mice prostate offspring born to dams exposed to high fat diet (HFD) was associated with activation of AKT and down regulation of PTEN signaling pathways. Pytlowanciv et al. (42) also observed high epithelial proliferation in the rat VP offspring (19 weeks old) born to dams exposed to gestational and lactational HFD and correlated this result with downregulation of AR and upregulation of estrogen receptor alpha (ER α) and PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma), and concluded that maternal HFD can be considered a risk factor for prostate disorders.

Although some prostatic disorders were detected in the prostate from the CTR group, the incidence and severity were higher in those from LPD groups. Curiously, histopathological analysis detected carcinoma in situ only in LPD offspring, with 33% incidence in GLP and 50% incidence in GLLP groups. This finding is important because less than 1% of Sprague Dawley rats spontaneously develop prostate cancer (43). Moreover, all carcinoma in situ was observed in the intermediate/distal regions of VP, which comprise the majority of hormonal responsive acini in the VP (44). These results support our hypothesis that estrogen/testosterone imbalance could be associated with prostate carcinogenesis in aged LPD offspring.

The progressive epithelial cells instability, such as observed in epithelial dysplasia, PIN and carcinoma in situ demonstrated that prostatic carcinogenesis in aged LPD offspring resembles the classic model of human prostate tumor progression. Thus, we hypothesize that, hormonal imbalance, in association with the advanced age of these animals, promoted a permissive microenvironment to slow-growing prostatic tumorigenesis, as observed for prostate cancer progression during aging in human (45).

5. Conclusion

In summary, we demonstrated strong association between impairment of prostate morphogenesis and incidence of prostatic disorders in aged rat offspring. The altered intrauterine microenvironment appears to program offspring prostate cells, which respond to the imbalance of hormones in older rats, leading to a slow-growing prostatic carcinogenesis. While this result needs to be confirmed in humans, we showed that maternal dietary patterns acts as an important risk factor for rat offspring prostate cancer outcomes.

6. Reference

1. Flodmark CE, Lissau I, Moreno LA, Pietrobelli A, Widhalm K. New insights into the field of children and adolescents' obesity: The European perspective. *Int J Obes.* 2004;28(10):1189-1196. doi:10.1038/sj.ijo.0802787.
2. Seidell JC, Halberstadt J. Obesity: The obesity epidemic in the USA — no end in sight? *Nat Rev Endocrinol.* 2016;12(9):499-500. doi:10.1038/nrendo.2016.121.
3. Spracklen CN, Ryckman KK, Robinson JG, et al. Low Birth Weight and Risk of Later-Life Physical Disability in Women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2017;72(4):543-547. doi:10.1093/gerona/glw134.
4. Bleker LS, de Rooij SR, Painter RC, van der Velde N, Roseboom TJ. Prenatal Undernutrition and Physical Function and Frailty at the Age of 68 Years: The Dutch Famine Birth Cohort Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2016;71(10):1306-1314. doi:10.1093/gerona/glw081.
5. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia.* 1992;35(7):595-601.
6. Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ.* 1989;298(6673):564-567.
7. Tarry-Adkins JL, Ozanne SE. The impact of early nutrition on the ageing trajectory. *Proc Nutr Soc.* 2014;73(2):289-301. doi:10.1017/S002966511300387X.
8. Pinho CF, Ribeiro M a., Rinaldi JC, et al. Gestational protein restriction delays prostate morphogenesis in male rats. *Reprod Fertil Dev.* 2014;26(7). doi:10.1071/RD13132.
9. Rinaldi JC, Justulin LA, Lacorte LM, et al. Implications of intrauterine protein malnutrition on prostate growth, maturation and aging. *Life Sci.* 2013;92(13):763-774. doi:10.1016/j.lfs.2013.02.007.
10. Ramos C da F, Babinski MA, Costa WS, Sampaio FJB. The prostate of weaned pups is altered by maternal malnutrition during lactation in rats. *Asian J Androl.* 2010;12(2):180-185. doi:10.1038/aja.2009.69.
11. Colombelli KT, Santos SAA, Camargo ACL, et al. Impairment of microvascular angiogenesis is associated with delay in prostatic development in rat offspring of maternal protein malnutrition. *Gen Comp Endocrinol.* 2017;246:258-269. doi:10.1016/j.ygcen.2016.12.016.

12. Gardner WA. Hypothesis: The prenatal origins of prostate cancer. *Hum Pathol.* 1995;26(12):1291-1292. doi:10.1016/0046-8177(95)90291-0.
13. Ekblom A. Growing evidence that several human cancers may originate in utero. *Semin Cancer Biol.* 1998;8(4):237-244. doi:10.1006/scbi.1998.0073.
14. Barker DJP, Osmond C, Thornburg KL, Kajantie E, Eriksson JG. A possible link between the pubertal growth of girls and prostate cancer in their sons. *Am J Hum Biol.* 2012;24(4):406-410. doi:10.1002/ajhb.22222.
15. Jantz LM. The Cambridge encyclopedia of human growth and development. *Am J Phys Anthropol.* 1999;110(4):473-474. doi:10.1002/(SICI)1096-8644(199912)110:4<473::AID-AJPA8>3.0.CO;2-P.
16. Barker DJP, Osmond C, Thornburg KL, Kajantie E, Eriksson JG. A possible link between the pubertal growth of girls and ovarian cancer in their daughters. *Am J Hum Biol.* 2008;20(6):659-662. doi:10.1002/ajhb.20789.
17. Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol.* 1966;30(1):23-38. doi:10.1083/jcb.30.1.23.
18. Sinton LW, Finlay RK, Lynch PA. Sunlight inactivation of fecal bacteriophages and bacteria in sewage- polluted seawater. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(8):3605-3613. doi:10.1373/clinchem.2008.112797.
19. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
20. Shappell SB, Thomas G V, Roberts RL, et al. Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer Res.* 2004;64(6):2270-2305.
21. Bernoulli J, Yatkin E, Laakso A, et al. Histopathological evidence for an association of inflammation with ductal pin-like lesions but not with ductal adenocarcinoma in the prostate of the noble rat. *Prostate.* 2008;68(7):728-739. doi:10.1002/pros.20719.
22. Bosland MC. *Proliferative Lesions of the Prostate and Other Accessory Sex Glands in Male Rats.* Society of Toxicologic Pathologists; 1998.
23. Zambrano E, Rodríguez-González GL, Guzmán C, et al. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J Physiol.* 2005;563(1):275-284. doi:10.1113/jphysiol.2004.078543.
24. Teixeira C V., Silandre D, de Souza Santos AM, et al. Effects of maternal undernutrition during lactation on aromatase, estrogen, and androgen receptors expression in rat testis at weaning. *J Endocrinol.* 2007;192(2):301-311. doi:10.1677/joe.1.06712.
25. Feres NH, Reis SR de L, Veloso R V, et al. Soybean diet alters the insulin-

- signaling pathway in the liver of rats recovering from early-life malnutrition. *Nutrition*. 2010;26(4):441-448. doi:10.1016/j.nut.2009.06.016.
26. Zhang S, Morrison JL, Gill A, et al. Maternal Dietary Restriction During the Periconceptional Period in Normal-Weight or Obese Ewes Results in Adrenocortical Hypertrophy, an Up-Regulation of the JAK/STAT and Down-Regulation of the IGF1R Signaling Pathways in the Adrenal of the Postnatal Lamb. *Endocrinology*. 2013;154(12):4650-4662. doi:10.1210/en.2013-1414.
 27. Rodríguez-González GL, Reyes-Castro LA, Vega CC, et al. Accelerated aging of reproductive capacity in male rat offspring of protein-restricted mothers is associated with increased testicular and sperm oxidative stress. *Age (Dordr)*. 2014;36(6):9721. doi:10.1007/s11357-014-9721-5.
 28. Cohn BA, Cirillo PM, Hopper BR, Siiteri PK. Third Trimester Estrogens and Maternal Breast Cancer: Prospective Evidence. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(10):3739-3748. doi:10.1210/jc.2016-3476.
 29. Prins GS, Birch L, Habermann H, et al. Influence of neonatal estrogens on rat prostate development. *Reprod Fertil Dev*. 2001;13(4):241-252. doi:10.1071/RD00107.
 30. Prins GS. Endocrine disruptors and prostate cancer risk. *Endocr Relat Cancer*. 2008;15(3):649-656. doi:10.1677/ERC-08-0043.
 31. Prins GS, Ho SM. Early-life estrogens and prostate cancer in an animal model. *J Dev Orig Health Dis*. 2010;1(6):365-370. doi:10.1017/S2040174410000577.
 32. Cheong A, Zhang X, Cheung Y-Y, et al. DNA methylome changes by estradiol benzoate and bisphenol A links early-life environmental exposures to prostate cancer risk. *Epigenetics*. 2016;11(9):674-689. doi:10.1080/15592294.2016.1208891.
 33. Prins GS, Ye S-H, Birch L, et al. Prostate Cancer Risk and DNA Methylation Signatures in Aging Rats following Developmental BPA Exposure: A Dose–Response Analysis. *Environ Health Perspect*. 2017;125(7):77007. doi:10.1289/EHP1050.
 34. Vermeulen A, Kaufman JM, Goemaere S, Van Pottelberg I. Estradiol in elderly men. *Aging Male*. 2002;5(2):98-102. doi:10.1080/tam.5.2.98.102.
 35. Setlur SR, Mertz KD, Hoshida Y, et al. Estrogen-dependent signaling in a molecularly distinct subclass of aggressive prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(11):815-825. doi:10.1093/jnci/djn150.
 36. Chakravarty D, Sboner A, Nair SS, et al. The oestrogen receptor alpha-regulated lncRNA NEAT1 is a critical modulator of prostate cancer. *Nat Commun*. 2014;5:5383. doi:10.1038/ncomms6383.
 37. Takizawa I, Lawrence MG, Balanathan P, et al. Estrogen receptor alpha drives proliferation in PTEN-deficient prostate carcinoma by stimulating survival signaling, MYC expression and altering glucose sensitivity. *Oncotarget*. 2015;6(2):604-616. doi:10.18632/oncotarget.2820.

38. Yu H, Rohan T. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(18):1472-1489. doi:10.1093/jnci/92.18.1472.
39. Geissinger JD, Bucy PC. Astrocytomas of the Cerebellum in Children: Long-Term Study. *Arch Neurol.* 1971;24(2):125-135. doi:10.1001/archneur.1971.00480320053005.
40. Dai B, Kong YY, Ye DW, Ma CG, Zhou X, Yao XD. Activation of the mammalian target of rapamycin signalling pathway in prostate cancer and its association with patient clinicopathological characteristics. *BJU Int.* 2009;104(7):1009-1016. doi:10.1111/j.1464-410X.2009.08538.x.
41. Benesh EC, Humphrey PA, Wang Q, Moley KH. Maternal high-fat diet induces hyperproliferation and alters Pten/Akt signaling in prostates of offspring. *Sci Rep.* 2013;3:3466. doi:10.1038/srep03466.
42. Pytlowanciv EZ, Pinto-Fochi ME, Reame V, et al. Differential ontogenetic exposure to obesogenic environment induces hyperproliferative status and nuclear receptors imbalance in the rat prostate at adulthood. *Prostate.* 2016;76(7):662-678. doi:10.1002/pros.23158.
43. Nakazawa M, Tawaratani T, Uchimoto H, et al. Spontaneous neoplastic lesions in aged Sprague-Dawley rats. *Exp Anim.* 2001;50(2):99-103. doi:10.1538/expanim.50.99.
44. Tsujimura A, Koikawa Y, Salm S, et al. Proximal location of mouse prostate epithelial stem cells: A model of prostatic homeostasis. *J Cell Biol.* 2002;157(7):1257-1265. doi:10.1083/jcb.200202067.
45. Shen MM, Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev.* 2010;24(18):1967-2000. doi:10.1101/gad.1965810.

Tables and Figures

Table 1: Biometric and hormonal parameters of male offspring at PND 21 and 540.

Parameters	PND 21			PND 540		
	CTR	GLP	GLLP	CTR	GLP	GLLP
Body weight (g)	39.30±6.99 ^A	32.73±9.73 ^B	22.13±3.94 ^C	428.25±49.61 ^A	418.60±37.26 ^A	376.81±30.45 ^B
AGD (mm)	10.68±2.54 ^A	8.84±1.68 ^B	7.63±1.62 ^B	25.41±3.99	26.54±4.08	25.01±4.50
Absolute VP weight (mg)	3.20±0.79 ^A	2.65±0.56 ^B	1.44±0.38 ^C	0.62±0.20	0.69±0.19	0.65±0.22
Relative VP weight	1.15±0.29 ^A	0.96±0.18 ^B	0.78±0.15 ^C	1.44±0.37	1.66±0.47	1.73±0.60
Absolute UGC weight (mg)	11.11±1.48 ^A	8.46±2.07 ^B	5.6±0.47 ^C	-	-	-
Relative UGC Weight	2.98±0.52	3.08±0.51	3.12±0.45	-	-	-
Insulin (ng/ml)	1.73±0.43 ^A	0.55±0.14 ^B	0.26±0.05 ^B	0.35±0.13	0.39±0.06	0.35±0.09
IGF-1 (pg/ml)	512.30±65.5 ^A	373.70±57.31 ^B	175.30±23.81 ^C	459.40±54.80 ^A	759.40±65.48 ^B	709.10±85.72 ^B
Progesterone (ng/ml)	19.98±2.93 ^A	12.50±1.90 ^B	11.69±1.50 ^B	8.24±2.10	8.96±1.78	10.22±1.77
Testosterone (ng/ml)	0.72±0.11 ^A	2.28±0.23 ^B	1.84±0.29 ^B	5.08±1.64 ^A	0.72±0.20 ^B	0.87±0.22 ^B
Estrogen (pg/ml)	15.69±1.06 ^A	14.07±3.74 ^A	20.32±3.18 ^B	14.64±1.68 ^A	31.51±2.66 ^B	35.27±2.09 ^B
IGF-2 (pg/ml)	344.80±84.72	327.20±72.54	292.70±30.57	170.90±58.86	178.80±39.58	139.70±34.29

The urogenital complex comprehends part of the urethra, the empty urinary bladder, the pairs of prostatic lobes (ventral, lateral, dorsal and anterior) and the seminal vesicles. Data expressed as mean±SD. Different letters represent statistical difference among groups when $p < 0.05$.

Table 2: Histopathological analysis and incidence of prostatic disorders in VP offspring at PND 540.

Parameters	CTR	Groups GLP	GLLP
Epithelial atrophy (predominant)	83.33 ^A	16.67 ^B	8.33 ^B
Epithelial atrophy (moderate/discrete)	25.00 ^A	75.00 ^B	91.67 ^B
Moderate peripheral physiologic hypertrophy	75.00	75.00	83.33
Atypical hyperplasia (dysplasia)	16.67	41.67	41.67
Focal hyperplasia	25.00	41.67	50.00
Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN)	8.33	25.00	33.33
Carcinoma in situ	0.00 ^A	33.33 ^B	50.00 ^B

PIN = Prostatic intraepithelial neoplasia. Data expressed as mean and standard deviation. Different letters represent statistical difference between groups when $p < 0.05$.

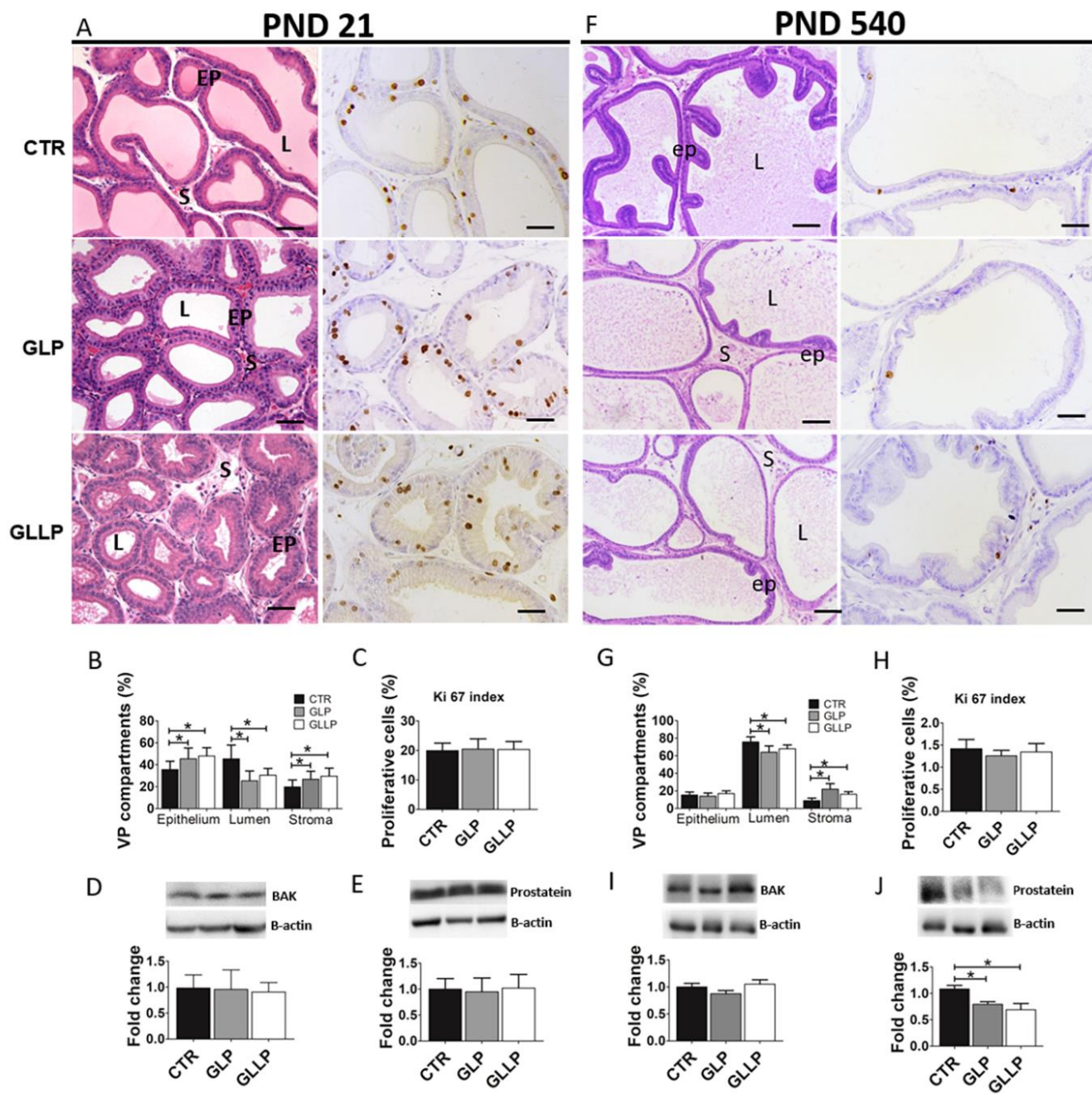


Figure 1. Representative histological sections VP lobes from the CTR, GLP and GLLP groups at PND 21 and 540, stained with hematoxylin–eosin or Ki 67 immunohistochemistry (**A and F**); **B and G**: Stereological quantification of VP compartments, demonstrating reduction in glandular lumen associated with increased stromal compartment in GLP and GLLP groups. Western blotting analysis of BAK (**D and I**) and prostatein (**E and J**). Data are expressed as mean±SD. * means statistically difference among experimental groups with $P < 0.05$. Ep: epithelium; S: stroma; L: lumen. Scale bar: 200µm.

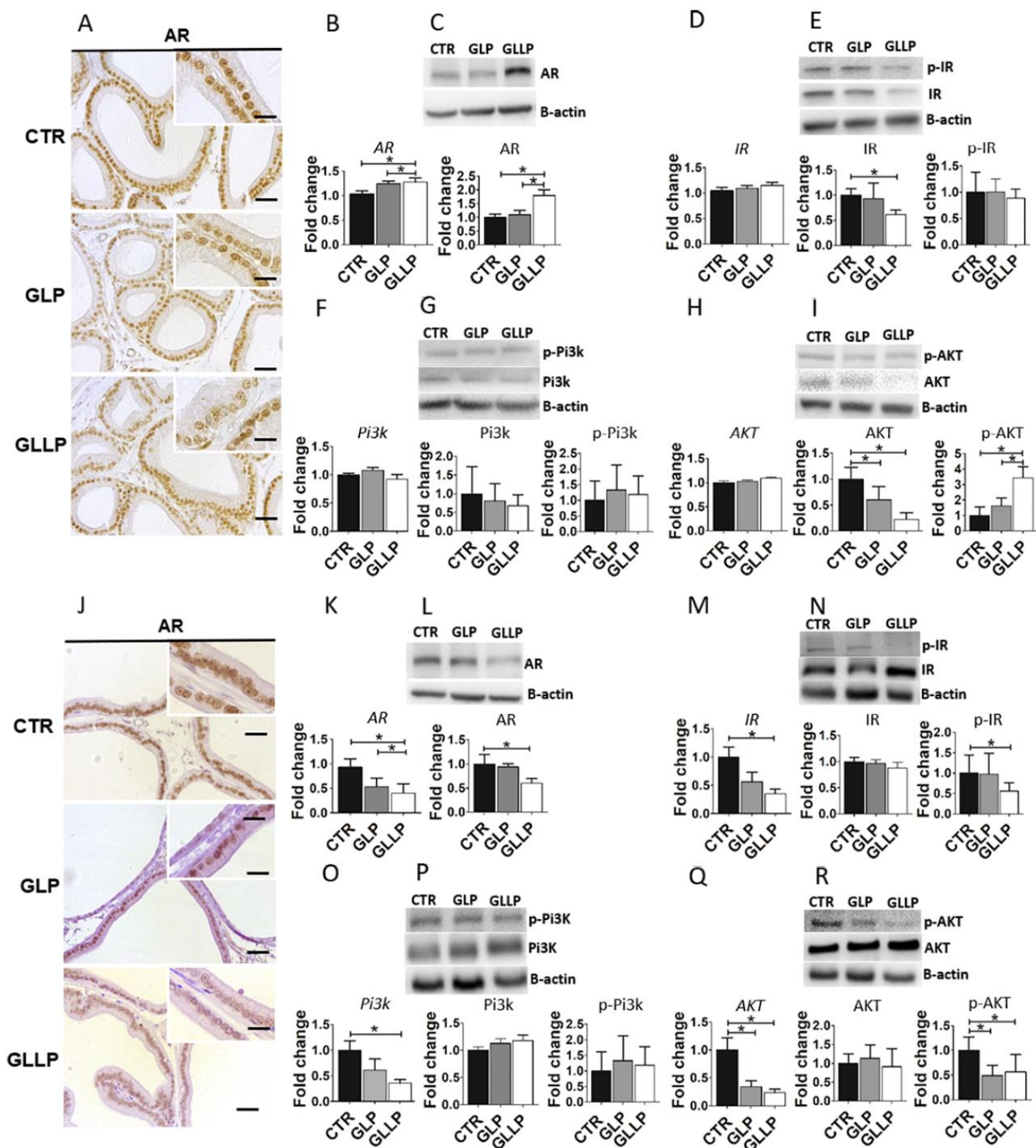


Figure 2. Immunohistochemistry, RT-qPCR and western blotting analysis of VP from all experimental groups at PND 21 and 540. **A** and **J**: immunohistochemistry for AR. Note the positive reaction in epithelial nuclei; **B** and **K**: RT-qPCR quantification of *AR*; **C** and **L**: Representative western blotting quantification of AR expression; **D** and **M**: RT-qPCR quantification of *IR*; **E** and **N**: Representative western blotting quantification of IR and p-IR expression; **F** and **O**: RT-qPCR quantification of *Pi3K*; **G** and **P**: Representative western blotting quantification of Pi3K and p-Pi3K expression; **H** and **Q**: RT-qPCR quantification of *AKT*; **N** and **R**: Representative western blotting quantification of AKT and p-AKT expression. Data are expressed as mean±SD. * means statistically difference among experimental groups with $P < 0.05$.

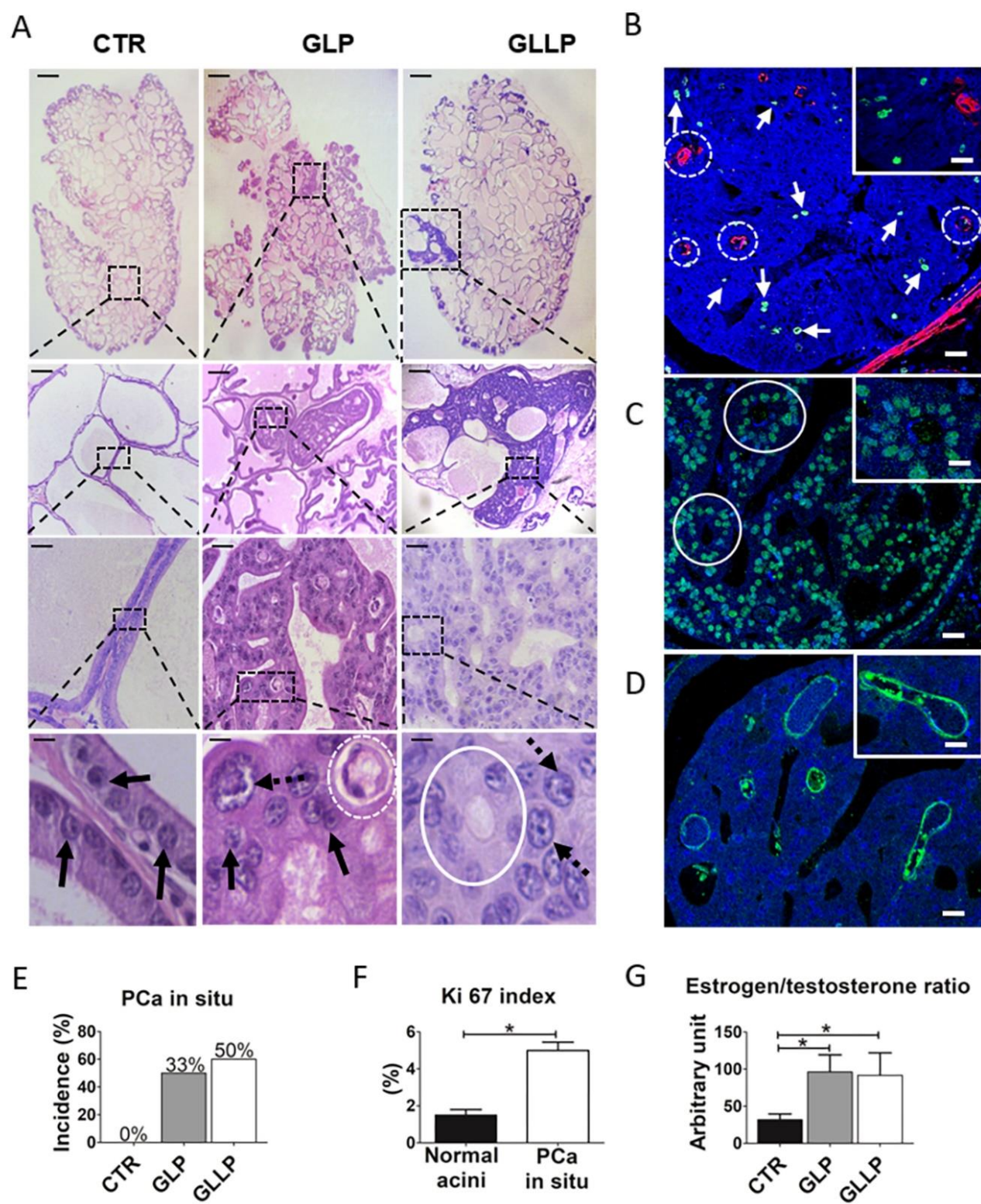


Figure 3. **A:** Representative histological section of PND 540 VP from CTR, GLP and GLLP groups stained with Hematoxylin-eosin demonstrating progressive magnification of normal acini in CTR and carcinoma in situ in GLP and GLLP groups; **B:** Confocal microscopy showing smooth muscle α -actin in blood vessel (red), Ki 67 proliferating cells (green) and epithelial nuclei (blue) in an area of carcinoma in situ; **C:** Carcinoma in situ showing epithelial nuclei stained with AR (green); **D:** IGF-1R detection (green) in blood vessels associated to the areas of carcinoma in situ; **E:** Quantification of carcinoma in situ incidence among experimental groups; **F:** Quantification of Ki67 proliferating cells in areas of normal acini and in areas of carcinoma in situ; **G:** Determination of estrogen/testosterone ratio among experimental groups. In **A**, filled arrows points normal epithelial cells nuclei and dashed arrows identifies dysplastic nuclei of epithelial cells; white circle demonstrates microacinar organization of epithelial cells. In **B**, white circles points cell proliferation and dashed circles means blood vessels. In **C**, white filled circles microacinar organization or epithelial cells. Data are expressed as mean $\pm$ SD. * means statistically difference among experimental groups with $P < 0.05$. Scale bar: In **A**, 1mm, 300 μ m and 5 μ m, respectively. In **B**, 20 μ m and 10 μ m in the insert.

Supplementary information for:

**Maternal low protein diet impairs prostate growth and induces prostate
carcinogenesis in aged offspring rats**

Sergio A. A. Santos¹, Ana C. Camargo¹, Flávia B. Constantino¹, Ketlin T. Colombelli¹,
Fernanda Mani², Jaqueline C. Rinaldi¹, Suelen Franco¹, Luiz M. F. Portella¹, Bruno O.
Duran¹, Wellerson R Scarano¹, Barry T Hinton³; Sergio L. Felisbino¹, Luis A. Justulin¹

1. Department of Morphology, Institute of Biosciences, UNESP, Botucatu, SP, Brazil

2. Department of Chemistry and Biochemistry, Institute of Biosciences, UNESP, Botucatu,
SP, Brazil

3. Department of Cell Biology, University of Virginia Health System, Charlottesville,
Virginia, EUA

Corresponding author: Luis A Justulin

Sao Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences of Botucatu, SP, Brazil. **Zip**

Code: 18618-689

Phone number: +551438800481

email: justulin@ibb.unesp.br

Supplementary Figure and Tables:

Table S 1: Biochemical parameters of Dams throughout experimental period.

Parameters	Gestation (n= 36)		Lactation (n= 36)		
	CTR	GLP	CTR	GLP	GLLP
Body weight Day 1 (g)	232.53±25.28	234.92±14.11	238.75±26.50	235.78±20.67	231.50±24.56
Body weight Day 21 (g)	368.04±16.49 ^A	342.18±15.68 ^B	236.76±17.93 ^A	224.03±18.83 ^A	193.73±13.00 ^B
Body weight variation (g)	135.50±18.28 ^A	106.65±20.62 ^B	-1.99±15.40 ^A	-11.74±12.37 ^A	-36.14±14.85 ^B
Chow consumption (g)	393.68±27.92	429.01±36.93	677.80±84.05 ^A	550.26±93.91 ^B	372.54±85.35 ^C
Relative chow intake	1.24±0.40	1.40±0.25	2.78±0.54 ^A	2.55±0.31 ^A	1.94±0.50 ^B
Water intake (l)	0.66±0.08	0.61±0.27	1.31±0.16 ^A	1.25±0.14 ^A	1.01±0.09 ^B
Body weight fat (g)	-	-	8.53±0.46 ^A	8.13±0.30 ^A	7.17±0.95 ^B
Albumin	-	-	2.82±0.25 ^A	2.75±0.24 ^A	1.81±0.41 ^B
Total proteins	-	-	7.18±1.12 ^A	6.48±0.36 ^A	5.37±0.67 ^B
Triglycerides	-	-	109.0±35.57 ^A	79.53±19.47 ^{AB}	59.26±35.19 ^B
Glucose	-	-	133.9±48.59	106.4±5.98	103.4±3.75
Estrogen	-	-	9.07±4.07	8.78±3.93	20.58±5.32

Data expressed as mean±SD. Different letters represent statistical difference among groups when p <0.05.

Table S 2: Biochemical parameters.

	Groups	Albumin	Total proteins	Triglycerides	Glucose
PND 21	CTR	2.15±0.64 ^A	4.45±0.74 ^A	173.3±83.57 ^A	152.6±24.74 ^A
	GLP	1.59±0.47 ^B	3.43±0.56 ^B	150.0±24.3 ^{AB}	135.3±23.29 ^{AB}
	GLLP	1.611±0.37 ^B	3.42±0.64 ^B	100.6±26.16 ^B	93.2±47.55 ^B
PND 540	CTR	2.09± 0.32	6.75± 1.41	144.9±105.6	183.0± 54.29
	GLP	1.92± 0.38	6.51± 0.63	157.1±92.49	185.3± 61.68
	GLLP	2.25± 0.41	6.25± 0.51	96.24±57.46	168.1±42.00

Data expressed as mean and standard deviation, different letters represent statistical difference between groups when $p < 0.05$.

Table S 3: Body weight variation.

	Postnatal day					
Groups	0	21	40	180	360	540
CTR	6.62±0.41 ^A	39.30±6.99 ^A	87.29±5.40 ^A	387.51±18.84	486.58±24.51	428.25±49.61 ^A
GLP	6.03±0.54 ^B	32.73±9.73 ^B	72.73±5.57 ^B	361.44±34.13	461.26±42.71	418.60±37.26 ^A
GLLP	5.83±0.55 ^B	22.13±3.94 ^C	68.12±4.14 ^B	359.10±31.68	451.88±37.18	376.81±30.45 ^B

Data expressed as mean and standard deviation, different letters represent statistical difference between groups when $p < 0.05$.

Table S 4. Composition of the standard or Normoprotein (AIN-76A) and Low protein diet (AIN-93)

Ingredients	Control diet	Low protein diet **
	(17% of protein) g/Kg	(6% of protein) g/Kg
Casein (84% protein)	202	71.5
Starch	397	480
Dextrin	130.5	159
Sucrose	100	121
L-cystine	3	1
Fiber of pH 101 or pH 102 (microcellulose)	50	50
Soy oil	70	70
Mixture of salts AIN93G**	35	35***
Mixture of vitamins AIN93G**	10	10
Choline hydrochloride or Choline bitartrate	2.5	2.5

*To know the detailed composition of the salt and vitamin mix, see REEVES et al., 1993. The diet is elaborated by the company PragSoluções (PragSoluções, Jaú, SP, Brazil).

**Diets were supplemented with L-Cystine as sulfur amino acid.* Vitamin and mineral mixtures were formulated to meet the American Institute of Nutrition AIN-93G recommendation for rodent diets (Reeves et al., 1993).

***Potassium phosphate, monobasic, was added to the salt mix of this diet to maintain phosphorus at the levels found in the control casein diet (3 g/kg of diet) and the calcium: phosphorus ratio has been kept at 1.3 in both diets.

Table S 5. Specification for antibodies used in western-blot and immunohistochemistry (IHC) experiments.

Name	Company	Cat. number	Dilution IHC/WB
AR (N-20)	Santa cruz	sc-816 R	1:100/1:1000
Insulin R α (N-20)	Santa cruz	sc-710 R	1:1000
p-Insulin R β (Tyr 1162/1163)	Santa cruz	sc-25103 G	1:500
IGF-IR α (N-20)	Santa cruz	sc-712 R	1:200
PI 3-kinase C2 β (H-300)	Santa cruz	sc-134766 R	1:1000
p-PI 3kinase p85 α (Tyr 467)	Santa cruz	sc-293115 R	1:500
Akt123 (H-136)	Santa cruz	sc-8312 R	1:1000
p-Akt123 (Ser 473)	Santa cruz	sc-7985 R	1:500
PCNA (PC10)	Santa cruz	sc-56 M	1:1000
Bak (G-23)	Santa cruz	sc-832 R	1:1000
Prostateína	AbDsorotec	7821-1009	1:1000
Actin (C-11)	Santa cruz	sc-1615 G	1:800
α -Actin	Santa cruz	sc-32251	1:200
KI 67	Abcam	ab16667	1:100
goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa cruz	sc-2030	1:100/1:2000
bovine anti-goat IgG-HRP	Santa cruz	sc-2378	1:100/1:2000
Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP)	Abcam	ab6789	1:200/1:5000
Goat Anti-Rabbit Alexa Fluor 488	Abcam	ab150077	1:300
Goat Anti-Mouse Alexa Fluor 568	Abcam	ab175473	1:300

Table S 6: Specification for Primers used for qRT-PCR.

Gene symbol	Access number	Primer	Amplicon (pb)
<i>IGF-I</i>	NM_001082477	AAGCCTACAAAGTCAGCTCG GGTCTTGTTTCCTGCACTTC	166
<i>IGF-II</i>	NM_001190162.1	AACCTTCCAGCCTTTTCCTGT GCACCAACATCGACTTCCCC	105
<i>IR</i>	NM_017071.2	AGGGCTCTCTCCAGGAAACT TGGCAATATTTGATGGGACATC	125
<i>PI3K</i>	NM_053923.1	TCTCTCCCTCTGGTCTTGGG CCACCTTCTCAAGACGGCAT	81
<i>AKT</i>	NM_033230.2	GCCTCTTCGAGCTCATCCTC TTCTTGAGCAGTCCAGCCAG	91
<i>GUSB</i>	NM_017015.2	AGGATCCACCTCGCATGTTC CTCAGTGGTGACTGGTTTCGT	148

Table S 7. Specification for Taqman assays used for RT-qPCR.

Gene symbol	Assay ID
<i>IGF-1</i>	(Rn00710306_m1)
<i>IGF-2</i>	(Rn01454518_m1)
<i>IR</i>	(Rn00690703_m1)
<i>AKT</i>	(Rn00583646_m1)
<i>PI3K</i>	(Rn01644964_m1)
<i>AR</i>	(Rn00560747_m1)
<i>GUSB</i>	(Rn00566655_m1)
<i>ACTB</i>	(Rn00667869_m1)
<i>PURB</i>	(Rn01443265_s1)

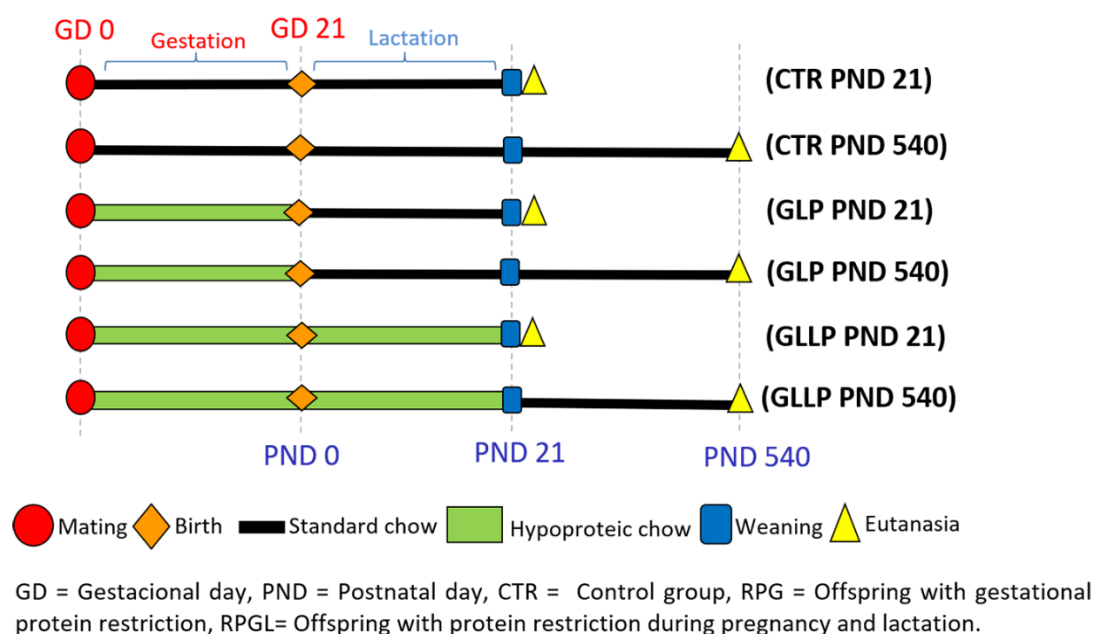


Figure S1: Schematic view of experimental design.

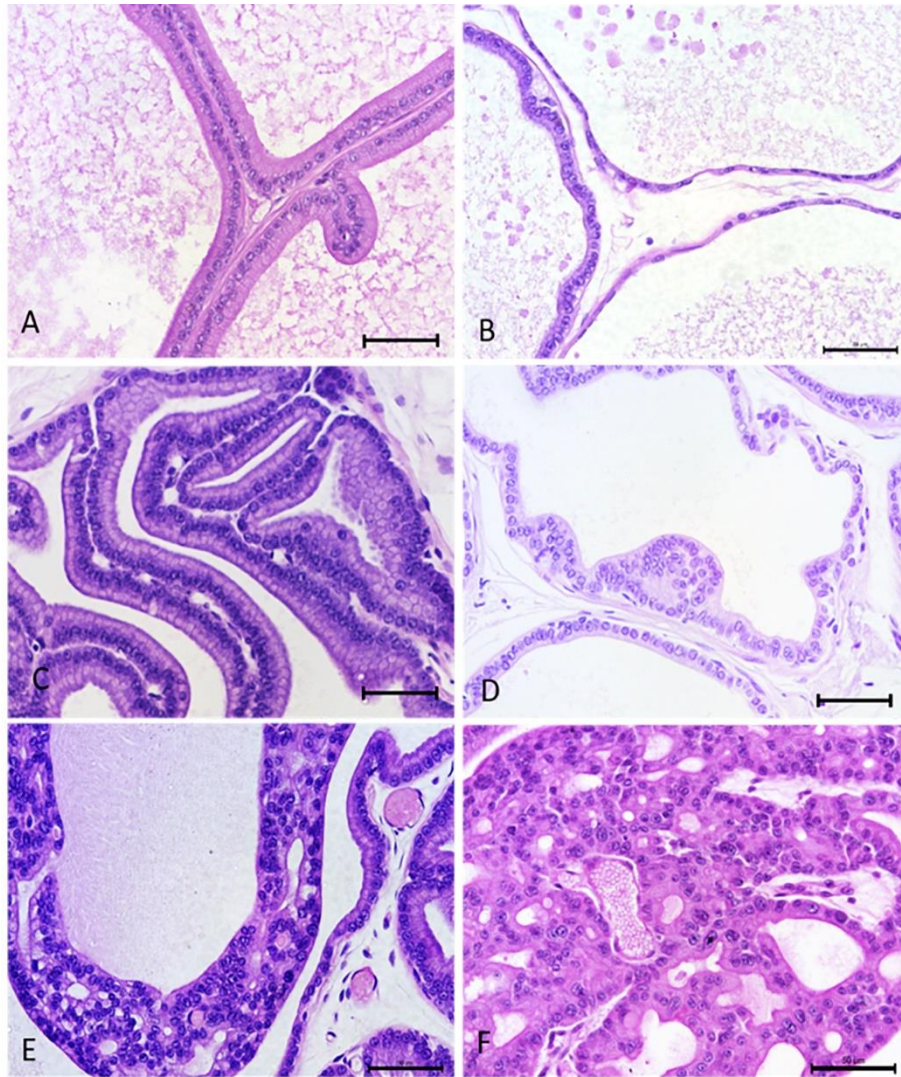


Figure S 2: Representative histopathological disorders of the VP. **A:** Normal prostate; **B:** Epithelial atrophy; **C:** Physiologic hyperplasia; **D:** Epithelial dysplasia; **E:** intraepithelial neoplasia (PIN); **F:** Carcinoma in situ. Scale bar: 100µm.

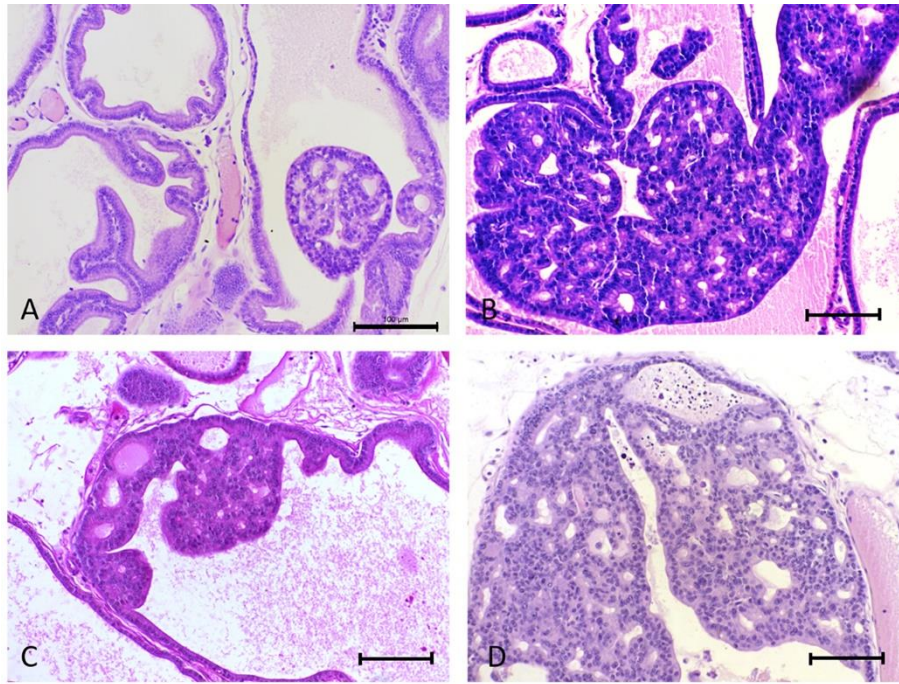


Figure S 3: Representative histopathological analysis of the VP lesions in GLP offspring. The incidence of carcinoma in situ was 33% (04 from 12 animals, A-D). Scale bar: 100µm.

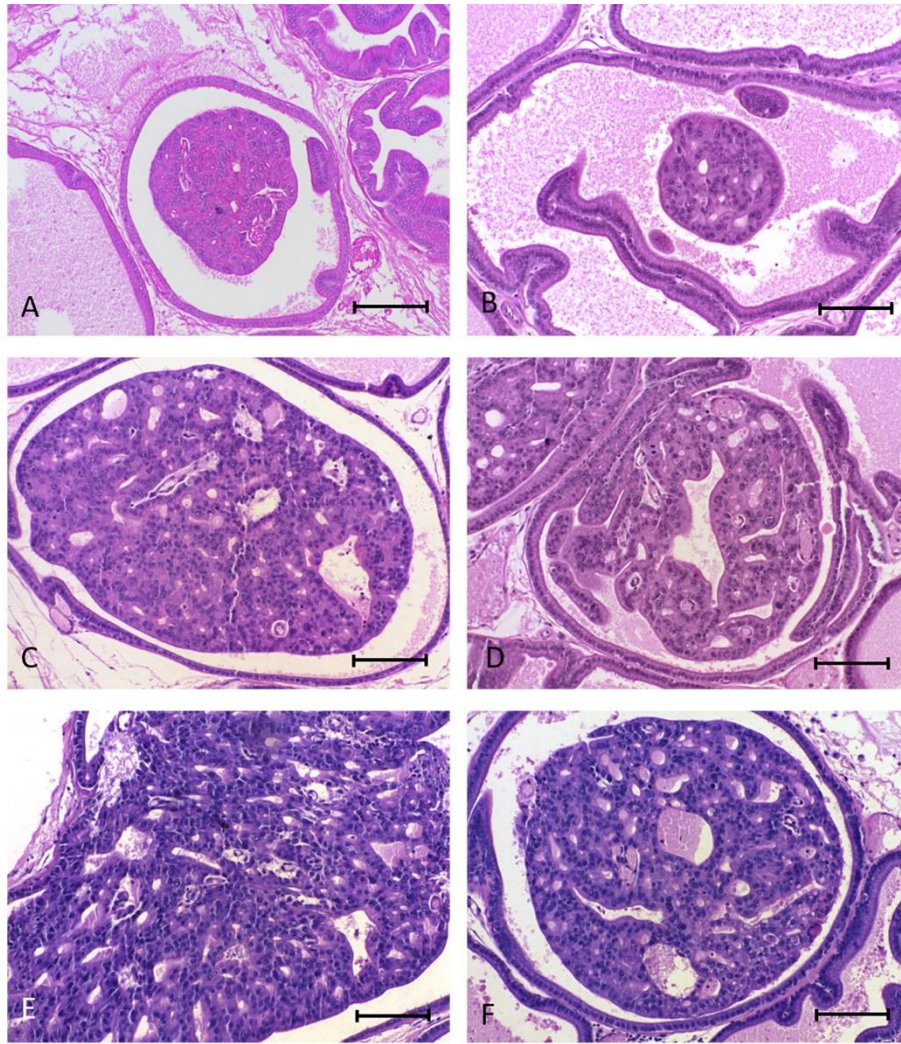


Figure S 4: Representative histopathological analysis of the VP lesions in GLLP offspring. The incidence of carcinoma in situ was 50% (06 from 12 animals, A-F). Scale bar: 100 μ m.

Capítulo 3.

Perfil global de expressão proteica na próstata ventral de ratos submetidos a restrição proteica materna: Redes moleculares associadas à carcinogênese

Sergio AA Santos¹, Ana CL Camargo¹, Flávia B Constantino¹, Ketlin T Colombelli¹, Luiz MF Portela¹, José CS Vieira², Pedro M Padilha², Robson F Carvalho¹, Luis A Justulin¹

1. Department of Morphology, Institute of Biosciences, UNESP, Botucatu, SP,
Brazil

2. Department of Chemistry and Biochemistry, Institute of Biosciences, UNESP,
Botucatu, SP, Brazil

Corresponding author: Luis A Justulin

Sao Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences of Botucatu, SP, Brazil.

Zip Code: 18618-689

Phone number: +551438800481

email: justulin@ibb.unesp.br

Resumo

Evidências epidemiológicas demonstram que doenças crônicas podem ter origem a partir de insultos sofridos durante o desenvolvimento intrauterino, condição conhecida como Programação Fetal (PF). Apesar disso, os mecanismos moleculares envolvidos neste processo são pouco conhecidos. O avanço de tecnologias de sequenciamento em larga escala baseadas na combinação de “omas” (transcriptoma, MicroRNoma e proteoma) utilizando ferramentas de enriquecimento de dados, tem possibilitado uma visão integrativa global de mecanismos moleculares relacionados ao desenvolvimento e envelhecimento. Considerando o papel da restrição proteica materna (RPM) em alterar o crescimento e aumentar a incidência de lesões prostáticas na prole de ratos, o objetivo deste trabalho foi analisar a expressão global de proteínas da próstata de ratos que sofreram RPM visando identificar as vias moleculares envolvidas no desenvolvimento das lesões prostáticas. Para isso, foram utilizados ratos machos da linhagem *Sprague Dawley* nascidos de mães alimentadas com ração padrão (17% de proteína) ou com ração hipoproteica (6% proteína) durante a gestação ou durante a gestação e lactação. Os animais foram eutanasiados no dia pós-natal (DPN) 540 e a próstata ventral (PV) coletada e imediatamente congelada. Foi analisado o perfil global de expressão de proteínas (proteoma) por espectrometria de massas (LC-Ms/Ms). Foram identificadas 378 proteínas após análises dos digestos trípticos no espectrometro de massas. Os resultados de expressão global de proteínas foram utilizados em análises de enriquecimento em bancos de dados. O perfil das proteínas mais expressas (*up*) apresentaram características que remetem a atividade celular aumentada, como sinalização celular e síntese proteica, já as análises com as proteínas menos expressas (*down*) mostraram diminuição de adesão celular, e mecanismos de invasão celular, mecanismos esses que podem ser relacionadas com atividade tumoral. Além disso, as proteínas *up* do grupo GLLP ao serem confrontadas com outro banco de dados, mostram perfil de proteínas presentes em tecidos tratados com estrógeno. Assim as análises proteômicas nos possibilitaram uma visão mais ampla dos processos biológicos que ocorreram nos animais submetidos a RPM.

1. Introdução

Evidências epidemiológicas e experimentais demonstram que doenças historicamente consideradas crônicas, podem ter origem a partir de insultos sofridos durante o período gestacional. A manutenção de condições adequadas durante o desenvolvimento intrauterino, período de alta vulnerabilidade, é de fundamental importância tanto para a gestante como para o embrião/feto em desenvolvimento (MERICQ et al., 2016). A associação entre alterações no período gestacional e doenças na vida adulta foi descrita há várias décadas atrás. David Barker, epidemiologista inglês em seu primeiro estudo coletou dados de recém-nascidos (entre os anos de 1911 e 1930) em um hospital na região de *Hertfordshire*, Inglaterra, deste estudo Barker conseguiu identificar que crianças abaixo do peso necessário para a idade, tinham 2,7 mais chances de desenvolverem doenças cardíacas, quando comparadas a crianças com peso considerado adequado para a idade (BARKER et al., 1989).

Grande parte do conhecimento sobre os efeitos da programação fetal deriva de estudos utilizando-se modelos animais, especialmente roedores. Diversos modelos de programação fetal têm sido desenvolvidos nos últimos anos para se investigar os impactos de alterações no ambiente intrauterino sobre a prole. Neste contexto, um dos modelos mais utilizados é o consumo de dieta hipoproteica oferecida às ratas durante a gestação e/ou lactação (CAMARGO et al., 2017; CEZAR DE OLIVEIRA et al., 2016; OZANNE; HALES; HALES, 1999; PETRY et al., 2001; PINHO et al., 2014; SENE et al., 2013). Vários autores demonstraram que o consumo de ração hipoproteica está associado ao baixo peso ao nascimento, redução de crescimento de diferentes órgãos, elevação da pressão sistólica, dislipidemia e resistência à insulina em modelos de roedores (DE BRITO ALVES et al., 2016; FALCÃO-TEBAS et al., 2012; FIDALGO et al., 2013; LEANDRO et al., 2012; LIMA et al., 2015; OZANNE; HALES, 2004; PAULINO-SILVA; COSTA-SILVA, 2016).

A maioria dos estudos sobre programação fetal tem focado os efeitos sobre metabolismo, sendo escassos os estudos sobre as funções reprodutivas em animais submetidos à restrição proteica materna. Entretanto, já foi demonstrado que a prole de ratos machos submetidos à RPM apresentam redução da distância ano-genital ao nascimento (marcador de diferenciação sexual determinado pela exposição intrauterina a testosterona) (COLOMBELLI et al., 2017; RINALDI et al., 2013a); redução no tempo de instalação da puberdade (NORIEGA et al., 2009; VAN WEISSENBRUCH et al., 2005); menor taxa de fertilidade (SANTOS et al., 2004; ZAMBRANO et al., 2005); alteração na concentração sérica de testosterona nos períodos pós-natal (COLOMBELLI et al., 2017; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2012), puberdade (ZAMBRANO et al., 2005) ou adulto (RODRÍGUEZ-

GONZÁLEZ et al., 2012, 2015), além de redução de di-hidrotestosterona nos dias pós natais (DPN) 30, 120 e 360 (RINALDI et al., 2013), alterações hormonais como estas podem desencadear alterações morfofuncionais em órgão hormônio responsivos, como a próstata.

A glândula prostática compõem o sistema genital masculino e tem seu desenvolvimento e fisiologia, controlados por andrógenos (CUNHA, 1985). Sua secreção é composta por um complexo proteolítico, com fosfatase ácida, ácido cítrico, fibrinolisin, enzimas específicas, agentes imunossupressores e outros fatores componentes do fluido seminal (MARKER et al., 2003). A secreção é importante para o sucesso reprodutivo pois está envolvida na motilidade espermática, liquefação do ejaculado e proteção imunológica dos espermatozoides contra o sistema imunológico do sistema genital feminino (AUMÜLLER; SEITZ, 1990; MACCIONI; CABEZAS; RIVERO, 2003).

A morfogênese da glândula prostática se inicia por volta do 18º dia de gestação em ratos e entre a 9-10ª semana em humanos, desta maneira o período intrauterino e perinatal é de fundamental importância para o seu desenvolvimento (WELSH et al., 2008). Nos roedores a próstata não está totalmente desenvolvida ao nascimento, a maior parte do desenvolvimento ocorre durante os primeiros 15 dias de vida pós-natal (TIMMS; MOHS; DIDIO, 1994). Desta maneira transtornos ocorridos neste período, altamente vulnerável do desenvolvimento prostático, podem levar a maior susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças prostáticas com o envelhecimento.

Nos últimos anos, a próstata tem despertado grande interesse médico-científico pela alta incidência de doenças, principalmente a hiperplasia prostática benigna (HPB) e o câncer de próstata (CaP) (DASGUPTA; SRINIDHI; VISHWANATHA, 2012; SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2013). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou um número de 61.200 novos casos de CaP para 2016, com aproximadamente 13 mil mortes. Apesar da etiologia complexa do CaP, estudos em modelos animais apontam que exposição a insultos durante o desenvolvimento intrauterino predispõem a glândula a maior incidência de lesões na idade adulta. Dentre estes, destacam-se aumento de prostatites e displasias epiteliais seguido de exposição gestacional a dieta hipoproteica (RINALDI et al., 2013a), aumento de hipertrofia glandular após exposição gestacional e lactacional a dieta hiperlipídica (PYTLOWANCIV et al., 2016) e desenvolvimento de lesões prostáticas em animais adultos expostos a bisfenol A ou estradiol no período perinatal (CHEONG et al., 2016b; LIMA et al., 2015; NELLES; HU; PRINS, 2011).

Considerando resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa os quais demonstraram que a RPM atrasa o desenvolvimento prostático em animais jovens, e aumenta a incidência

de lesões prostáticas no envelhecimento (COLOMBELLI et al., 2017; RINALDI et al., 2013). Assim, consideramos importante investigar de forma global as vias de sinalização que estão alteradas nos animais restritos e que podem estar relacionadas com o processo de carcinogênese.

2. Material e métodos

Foram utilizados ratos *Sprague Dawley*, machos adultos fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Morfologia, em caixas de polietileno, dois animais por caixa, com substrato de maravalha autoclavada, em condições controladas de luminosidade e temperatura média de 25° C, sendo fornecida água filtrada e ração ad libitum. Os procedimentos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biociências de Botucatu (CEEA-573).

Após acasalamento e constatação da prenhez, 12 ratas foram colocadas em gaiolas individuais e foram alimentadas com ração padrão para ratos (grupo controle CTR, n=3, 17% de proteína) ou com ração hipoproteica durante toda a gestação (grupo restrição proteica na gestação GLP, n=3, 6% de proteína) ou durante toda a gestação e lactação (grupo restrição proteica na gestação e lactação GLLP, n=3, 6% de proteína). As dietas eram isocalóricas e normossódicas (0,20%) a ração utilizada foi a AIN-93 modificada, de acordo com (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). Os animais foram eutanasiados por perda de consciência utilizando anestésico (ketamina e xilasina) seguido por decapitação, no DPN 540. O lobo prostático ventral foi coletado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80 até o momento do uso.

2.1 Shotgun

Após serem dissecadas e imediatamente congeladas três PVs de cada grupo experimental no DPN 540 foram submetidas a extração proteica utilizando tampão de extração (Tris 0,01 M, PMSF 5 mM, inibidor de protease 1%, DTT 65 mM, uréia 8 M) e quantificadas utilizando método de Bradford (BRADFORD, 1976), foram subdivididas em alíquotas de 50 µg/50 µL (concentração 1 µg/µl), posteriormente foi adicionado 10 µl de bicarbonato de amônio (NH₄HCO₃) 50 mM. Na sequência foi adicionado 25 µl de solução

surfactante 0,2% e a amostra incubada por 60 minutos à 37°C, em seguida da redução das pontes de sulfeto com 2,5 µl ditioneitol (DTT) a 100mM incubados durante 40 minutos a 37°C. A carbamidometilação foi realizada com 2,5 µl de iodoacetamida (IAA) a 300mM, incubados durante 30 minutos à temperatura ambiente e protegido da luz. Em seguida, as amostras foram submetidas à digestão proteolítica na presença da enzima tripsina 0,05 µg/µL, solubilizada em bicarbonato de amônio 50 mM, as amostras foram incubadas overnight a 37°C, posteriormente as amostras foram incubadas com 10 µL TFA 5% por 90 minutos à 37°C. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm a 6°C, por 30 minutos. Após esta etapa, as amostras foram dessalinizadas utilizando-se colunas Sep-Pak Vac C18 (Waters Manchester, UK), reduzidas em concentrador e mantidas a 20°C até o momento da análise por espectrometria de massas.

A análise dos peptídeos tripticos foi realizada no sistema nanoACQUITY UPLC (Waters, Milliford, USA) acoplado ao espectrômetro de massas Xevo Q-TOF G2 (Waters, Milliford, USA). Para tanto, o sistema UPLC nanoACQUITY foi equipado com uma coluna do tipo HSS T3 (Acquity UPLC HSS T3 column 75 mm x 150 mm; 1,8 µm, Waters), previamente equilibrada com 7% da fase móvel B (100% ACN + 0,1 % ácido fórmico). Os peptídeos foram separados através de um gradiente linear de 7-85 % de fase móvel B durante 70 min com fluxo de 0,35 µL/min e a temperatura da coluna mantida a 45°C. O MS foi operado em modo íon positivo, com o tempo de aquisição de dados de 75 min. Os dados obtidos foram processados através do software ProteinLynx GlobalServer (PLGS) versão 3.03 (Waters, Milliford, USA). A identificação das proteínas foi obtida através do algoritmo de contagem de íons incorporado ao software. Os dados obtidos foram buscados no banco de dados da espécie *Rattus norvegicus* baixado do catálogo do UniProt (Universal Protein Resource) em dezembro de 2017.

A identificação dos componentes celulares, funções e processos biológicos foi realizada através dos bancos de dados Gene Ontology (<http://geneontology.org/>) e Protein Annotation Through Evolutionary Relationship (PANTHER) (<http://pantherdb.org>). Além do “gene expression omnibus (GEO)” utilizando a ferramenta “Ligand Perturbations from GEO up” do Enrichr (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>) e as redes de integrações entre proteínas foram obtida pelo software STRING (<http://string-db.org/>).

Para a identificação das proteínas diferencialmente expressas entre os grupos experimentais serão utilizadas réplicas biológicas. Os resultados foram comparados utilizando o teste de t de Student's. Foram considerados diferentes valores com $P < 0,05$.

3. Resultados

Foram identificadas 378 proteínas e os resultados das análises dos digestos trípticos são observados na figura 1A. Dentre as proteínas identificadas, a maioria são comuns aos 3 grupos experimentais (203 proteínas ou 53,7%). Foram observadas alterações na abundância das proteínas nos grupos submetidos a restrição proteica, sendo 8 (2,1%) proteínas somente identificadas no grupo GLP e 52 (13,75%) somente identificadas ao grupo GLLP, além de outras 62 serem identificadas somente no grupo CTR.

Além da alteração do número de proteínas identificadas em cada grupo experimental, os grupos GLP e GLLP apresentaram alterações na abundância entre as proteínas. Entre elas tem-se 65 proteínas menos expressas (*down*) e 72 proteínas mais expressas (*up*) no grupo GLP e 59 menos expressas e 72 mais expressas no grupo GLLP (Figura 1B).

Proteínas agrupadas por processos biológicos

A ferramenta “Gene ontology (PANTHER) foi utilizada para identificar os processos biológicos mais enriquecidos relacionadas as proteínas aqui identificadas. As proteínas *up* nos grupos restritos apresentaram enriquecimento para os processos biológicos ligados a resposta das células a estímulos, sinalização celular, transdução de sinal, migração celular e silenciamento gênico.

Nas proteínas *down*, os processos biológicos enriquecidos tiveram relação com regulação negativa de atividade catalítica, expressão gênica, funções moleculares, regulação no do tamanho e diâmetro de vasos e morte celular (figura 2).

Proteínas agrupadas por funções moleculares

As proteínas *up* tiveram enriquecidas funções moleculares ligadas a atividade de enzimas antioxidantes, ligação de GDP e ligação à angiotatina, a qual está relacionada ao desenvolvimento e manutenção de vasos sanguíneos (figura 3).

Dentre as proteínas *down*, as funções enriquecidas foram, constituição estrutural do citoesqueleto, ligação á moléculas de adesão celular e inibição da atividade enzimática.

Proteínas agrupadas por componentes celulares.

Os componentes enriquecidos para as proteínas *up* nos grupos restritos tem relação à maquinaria de síntese e direcionamento de proteínas, como retículo endoplasmático, complexo de golgi, compartimento intermediário retículo-golgi, transporte e secreção de vesículas.

Além disso foram enriquecidos componentes relacionados a motilidade celular e em processos de invasão tumoral. Interessantemente, os componentes celulares relacionados as proteínas menos reguladas são adesão celular e citoesqueleto além de complexo de empacotamento de DNA (figura 4).

Proteínas agrupadas por via de sinalização

Na análise de enriquecimento para as vias de sinalização foi possível observar que as vias mais enriquecidas de proteínas *up*, foram relacionadas ao ciclo e controle do ciclo celular, além de vias relacionadas a apoptose, principalmente no grupo GLP. Além disso vias de estresse oxidativo também tiveram destaque nos dois grupos restritos.

Dentre as vias de sinalização relacionadas as proteínas *down* destacam-se as envolvidas em processos de junção celular, biogênese e manutenção de organelas, além de apresentar clara alteração da via de sinalização “Hedgehog”, pois os processos de sinalização, ativação e desativação da via estão enriquecidos (Figura 5).

Restrição proteica materna gestacional e lactacional estimula via de sinalização oncogênica.

Dentre as alterações identificadas no perfil proteômico causadas pela RPM, as que mais chamam a atenção são as proteínas exclusivas encontradas no grupo GLLP (Tabela 1). Dentre elas pode-se identificar 32 proteínas relacionadas a família de proteínas Ras (**R****a****t****S****a****r****c****o****m****a**), como RAB1A (RAB1A member Ras oncogene family), Rab-3D (GTP-binding protein Rab-3D) e Rab-35 (Ras-related protein Rab-35). Estas proteínas têm papel crucial na regulação do crescimento, migração e sobrevivência. Além disso, em análises utilizando a ferramenta *string*, os dados de enriquecimento indicam que estas proteínas têm interação direta entre elas e desempenham processos biológicos, funções moleculares e estão presentes em componentes celulares comuns (figuras 6, 7 e 8).

Restrição proteica materna, gera perfil proteico semelhante à de tecido submetido ao tratamento com estrógeno.

Ao utilizar as proteínas up do grupo GLLP, na ferramenta *Ligand Perturbations from GEO up*, do Enrichr, obtivemos enriquecimento com estudos utilizando tratamento hormonal. Dos 9 estudos mais relevantes na análise, 8 utilizaram estrógenos como tratamento, ou seja, o perfil das proteínas up do grupo GLLP se assemelha ao perfil proteico de tecidos submetidos ao tratamento estrogênico.

4. Discussão

Modelos experimentais com carcinogênese prostática induzida tem sido extensamente estudado nos últimos anos (GRABOWSKA et al., 2014; IHNATOVYCH; SIELSKI; HOFMANN, 2014; WANG et al., 2015). Mapear as vias de sinalização que orquestram o desenvolvimento dessa doença se faz necessário para melhor entender os seus mecanismos. Nesse sentido, análises de larga escala como a análise proteômica, tem sido utilizada para elucidar estas questões (BILEN et al., 2017; FUJIMOTO et al., 2009; ZHANG et al., 2011).

Em recente trabalho de nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado que a RPM foi capaz de induzir a carcinogênese prostática em animais no DPN 540 (SANTOS et al., dados ainda não publicados) e o desenvolvimento destas lesões foi relacionado ao desequilíbrio hormonal tanto nas mães como na prole. Sabendo que menos de 1% dos animais experimentais da linhagem *Sprague dawley* desenvolvem câncer de próstata espontaneamente (NAKAZAWA et al., 2001), foi realizada a análise proteômica, afim de elucidar os mecanismos que levaram ao processo de carcinogênese prostática.

O resultado mais surpreendente desta análise, foi a identificação de proteínas da família Ras no grupo GLLP. Esta família de proteínas tem funções reguladoras importantes no crescimento, migração e sobrevivência celular, desta maneira a expressão elevada de algumas dessas proteínas, tem sido relatada em vários tipos de câncer, incluindo câncer colorretal (THOMAS et al., 2014), glioma (BAO et al., 2014), hepatocarcinoma (XU et al., 2015) e câncer de próstata (ABD ELMAGEED et al., 2014).

As mutações somáticas que promovem ganho de função em genes *Ras* foram as primeiras alterações genéticas específicas identificadas em câncer humano há cerca de 3 décadas atrás. As proteínas Ras-GTP funcionam como ferramentas moleculares binárias que

controlam as redes de sinalização intracelular. As vias de sinalização reguladas por Ras controlam processos como a integridade do citoesqueleto de actina, proliferação, diferenciação, adesão, migração celular e apoptose (FERNÁNDEZ-MEDARDE; SANTOS, 2011). Ras ativa várias vias de sinalização, entre elas estão a via da proteína MAPK, esta propaga sinais que resultam na transcrição de genes envolvidos no crescimento e divisão celular (NAN et al., 2015) e a via PI3K/AKT/mTOR, que estimula a síntese proteica e o crescimento celular, e inibe a apoptose (CASTELLANO; DOWNWARD, 2011). Nesse sentido, o enriquecimento de processos biológicos como “*rab protein signal transduction*”, “*signaling*”, “*signal transduction*” e de funções moleculares “GTPase activity” e “GTP-binding” nas proteínas mais expressas do grupo GLLP, vão de encontro as informações contidas na literatura, sendo essa uma das possíveis vias de sinalização alteradas no desenvolvimento de carcinoma in situ nos animais submetidos a RPM.

Outro dado bastante importante foi o enriquecimento utilizando a ferramenta *Ligand Perturbations from GEO up* que compara os dados com experimentos desenvolvidos com diferentes tipos de tratamento, após a análise a ferramenta apontou que o perfil de proteínas mais diferencialmente expressas no grupo GLLP se assemelha com estudos de tratamento hormonal, entre os nove estudos mais enriquecidos oito são tratamentos com o hormônio estrógeno.

A regulação do estrogênio tem sido considerado como um dos fatores de risco associados ao desenvolvimento da hiperplasia prostática benigna (HPB) e do câncer de próstata (BOSLAND, 2000; HÄRKÖNEN; MÄKELÄ, 2004). Os estrógenos séricos são conhecidos por aumentar durante o envelhecimento, ao passo que os andrógenos têm sua concentração diminuída (DOMONKOS et al., 2017). SANTOS e colaboradores (dados ainda não publicados), observaram que animais submetidos a RPM apresentam proporções aumentadas de estrógeno/testosterona séricas, e ao envelhecimento desenvolvem câncer prostático. Desta maneira, a via de sinalização estrogênica é também uma das possíveis responsáveis pelo desenvolvimento de câncer de próstata nos animais submetidos a restrição proteica.

Conclusão

A análise proteômica gerou grande quantidade de dados, que junto com as análises de enriquecimento auxiliaram a entender os mecanismos que levaram a carcinogênese prostática nos animais restritos. A detecção de proteínas da família Ras, uma clássica família oncogênica norteará novas investigações, a fim de compreender por completo os mecanismos da carcinogênese prostática induzida por restrição proteica materna.

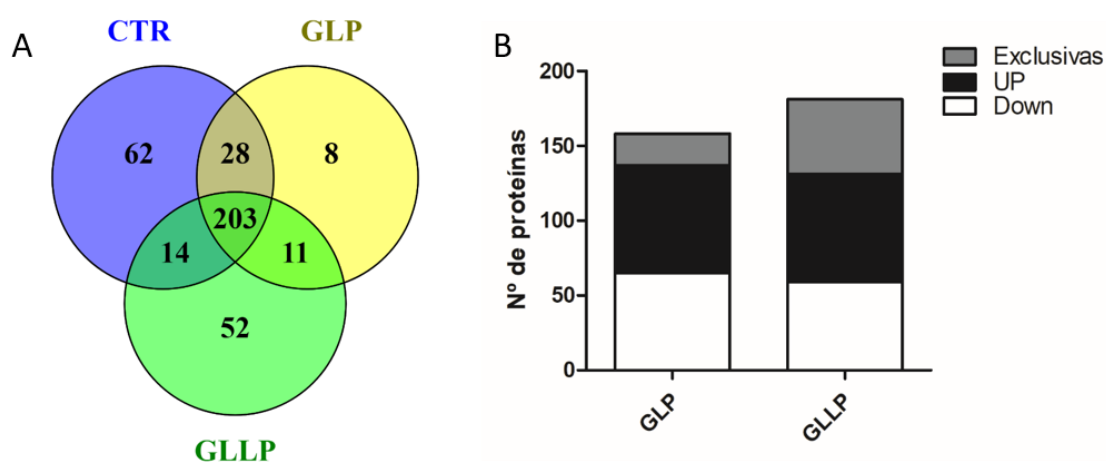
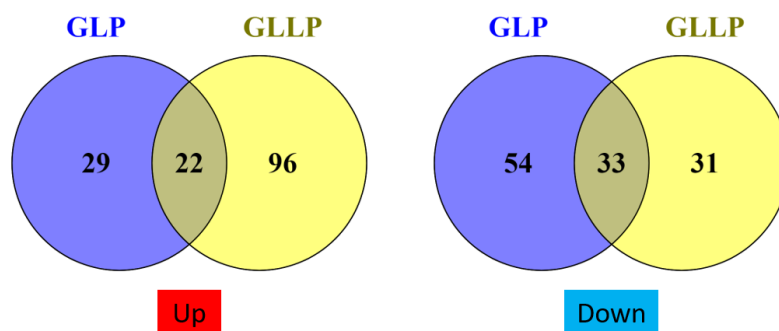
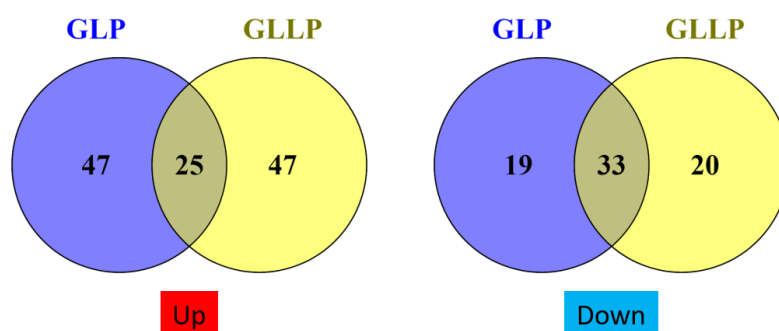


Figura 1 A. Proteínas identificadas após as amostras serem submetidas ao espectrômetro de massas. **B.** Proteínas exclusivas, mais reguladas (up) e menos reguladas (down) nos grupos GLP e GLLP.



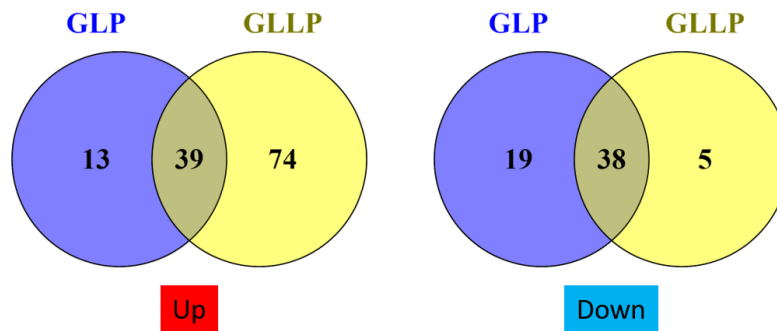
GO Term	p-value	p-value
Biological Process	GLP	GLLP
Up regulated		
cellular response to chemical stimulus (go:0070887)	1.25E-04	4.44E-05
chromatin silencing (go:0006342)	6.03E-10	1.30E-14
gene silencing (go:0016458)	5.31E-11	1.73E-07
glutathione metabolic process (go:0006749)	1.37E-08	3.49E-05
negative regulation of gene expression, epigenetic (go:0045814)	1.27E-09	3.85E-14
positive regulation of nuclease activity (go:0032075)		1.35E-04
rab protein signal transduction (go:0032482)		5.13E-07
regulation of gene expression, epigenetic (go:0040029)	8.66E-07	5.81E-10
signal transduction (go:0007165)		2.92E-04
signaling (go:0023052)		1.79E-04
tissue migration (go:0090130)		2.70E-04
Down regulated		
cell-cell adhesion (GO:0098609)		4.79E-05
cellular component organization (GO:0016043)		1.59E-08
hemostasis (GO:0007599)	1.30E-06	
negative regulation of catalytic activity (go:0043086)		8.59E-06
negative regulation of endopeptidase activity (go:0010951)	4.02E-05	
negative regulation of molecular function (go:0044092)		2.74E-05
protein refolding (GO:0042026)	1.16E-10	
regulation of blood vessel diameter (go:0097746)	1.89E-04	
regulation of blood vessel size (go:0050880)		2.59E-04
regulation of cell death (go:0010941)	1.98E-04	
tissue homeostasis (GO:0001894)		1.16E-04

Figura 2. Processos biológicos alterados nos grupos GLP e GLLP. Diagrama de Venn indica componentes exclusivos e comuns entre os grupos experimentais.



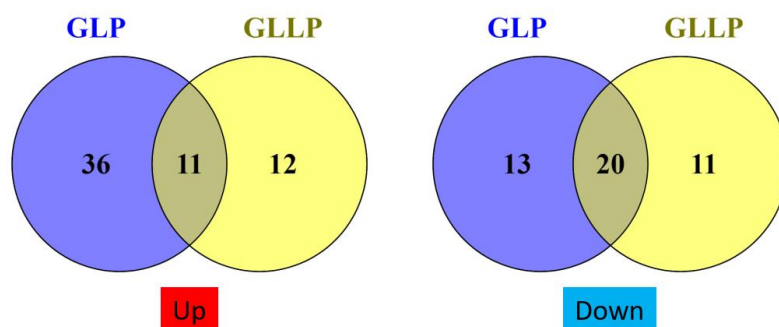
GO Term	GLP	GLLP
Molecular function	p-value	p-value
up regulated		
angiostatin binding (GO:0043532)		1.64E-04
disulfide oxidoreductase activity (GO:0015036)		1.95E-08
GDP binding (GO:0019003)	3.18E-08	5.79E-06
glutathione binding (GO:0043295)	1.95E-04	
glutathione peroxidase activity (GO:0004602)	1.70E-08	2.79E-06
glutathione transferase activity (GO:0004364)	5.40E-04	
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD(P)+) (phosphorylating) activity (GO:0043891)	2.05E-06	
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (phosphorylating) activity (GO:0004365)		3.38E-05
GTP-dependent protein binding (GO:0030742)	1.96E-06	
oxidoreductase activity (GO:0016491)	1.44E-10	2.73E-04
oxidoreductase activity, acting on peroxide as acceptor (GO:0016684)	3.63E-05	2.08E-06
peptide disulfide oxidoreductase activity (GO:0015037)	3.69E-09	2.32E-04
down regulated		
structural constituent of cytoskeleton (GO:0005200)	4.41E-14	3.81E-13
peptidase regulator activity (GO:0061134)		2.64E-04
heme binding (GO:0020037)		5.77E-04
enzyme inhibitor activity (GO:0004857)	2.56E-04	5.59E-06
cell adhesion molecule binding (GO:0050839)	1.70E-04	

Figura 3. Funções moleculares alteradas nos grupos GLP e GLLP. Diagrama de Venn indica funções exclusivas e comuns entre os grupos experimentais.



GO Term	p-value	p-value
Cellular component	GLP	GLLP
up regulated		
cell projection (GO:0042995)		2.17E-03
cell tip (GO:0051286)		2.58E-03
endoplasmic reticulum chaperone complex (GO:0034663)	4.52E-05	2.76E-06
endoplasmic reticulum lumen (GO:0005788)		9.36E-06
endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment (GO:0005793)		1.21E-04
Golgi apparatus (GO:0005794)		2.14E-03
insulin-responsive compartment (GO:0032593)		1.10E-06
podosome (GO:0002102)		1.45E-03
secretory vesicle (GO:0099503)		2.71E-10
transport vesicle (GO:0030133)		1.99E-07
down regulated		
cell-substrate adherents junction (GO:0005924)	1.36E-07	4.67E-04
cell-substrate junction (GO:0030055)	1.56E-07	4.99E-04
DNA packaging complex (GO:0044815)	1.38E-12	3.38E-13
focal adhesion (GO:0005925)	1.19E-07	4.36E-04
intermediate filament (GO:0005882)	2.54E-04	
intermediate filament cytoskeleton (GO:0045111)	7.55E-04	
microtubule (GO:0005874)	1.63E-05	2.22E-06
microtubule cytoskeleton (GO:0015630)		3.30E-04

Figura 4. Componentes celulares alteradas nos grupos GLP e GLLP. Diagrama de Venn indica componentes exclusivas e comuns entre os grupos experimentais.



Pathway	GLP	GLLP
GO Term	p-value	p-value
up regulated		
Activation of BAD and translocation to mitochondria (R-RNO-111447)	2.10E-12	
Apoptosis (R-RNO-109581)	4.55E-07	
Cell Cycle (R-RNO-1640170)	5.39E-04	
Cell Cycle Checkpoints (R-RNO-69620)	1.55E-05	
Cellular responses to stress (R-RNO-2262752)	4.29E-04	1.02E-04
Chk1/Chk2(Cds1) mediated inactivation of Cyclin B:Cdk1 complex (R-RNO-75035)	1.33E-12	
Detoxification of Reactive Oxygen Species (R-RNO-3299685)	3.45E-05	
G2/M Checkpoints (R-RNO-69481)	3.87E-06	
G2/M DNA damage checkpoint (R-RNO-69473)	4.53E-08	
Glutathione conjugation (R-RNO-156590)	1.19E-05	3.88E-05
HSF1-dependent transactivation (R-RNO-3371571)		6.72E-04
Intrinsic Pathway for Apoptosis (R-RNO-109606)	2.35E-09	
Metabolism (R-RNO-1430728)	1.24E-03	
Programmed Cell Death (R-RNO-5357801)	6.37E-07	
Translocation of GLUT4 to the plasma membrane (R-RNO-1445148)	1.44E-07	7.03E-12
down regulated		
Gap junction degradation (R-RNO-190873)		4.18E-04
Gap junction trafficking (R-RNO-190828)		6.62E-04
Hedgehog 'off' state (R-RNO-5610787)	6.70E-06	7.28E-06
Hedgehog 'on' state (R-RNO-5632684)	6.00E-06	6.63E-06
Hemostasis (R-RNO-109582)	1.08E-06	3.25E-07
Organelle biogenesis and maintenance (R-RNO-1852241)	2.57E-05	6.88E-05
Signaling by Hedgehog (R-RNO-5358351)	3.14E-05	2.74E-05

Figura 5. Vias de sinalização alteradas nos grupos GLP e GLLP. Diagrama de Venn indica vias de sinalização alteradas exclusivas e comuns entre os grupos experimentais.

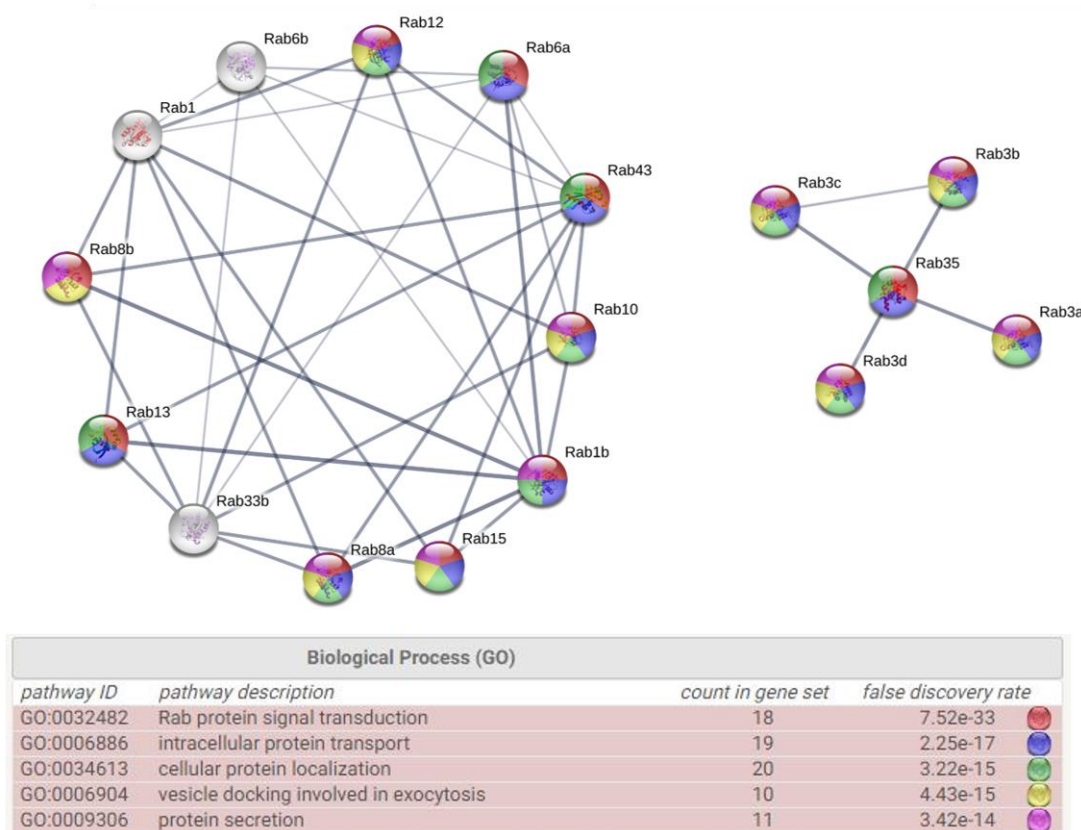


Figura 6. Interação entre as proteínas Ras no grupo GLLP e processos biológicos comuns aos quais elas participam.

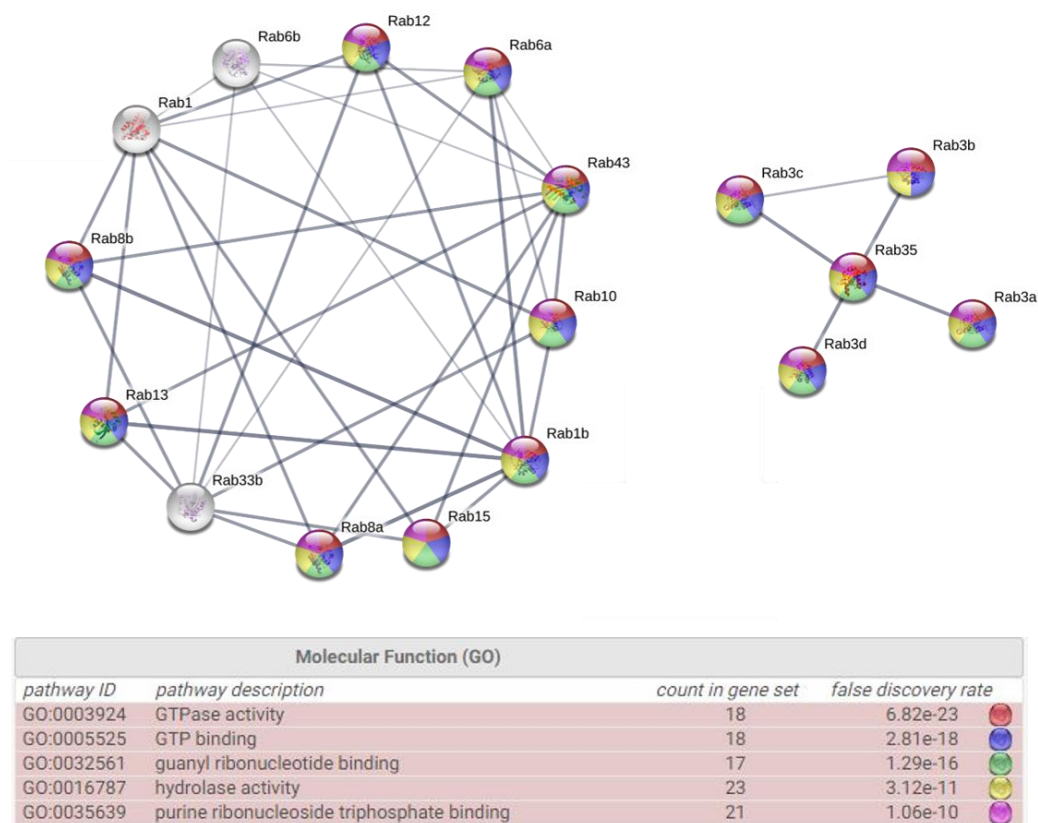


Figura 7. Interação entre as proteínas Ras no grupo GLLP e funções moleculares que elas desempenham em comum.

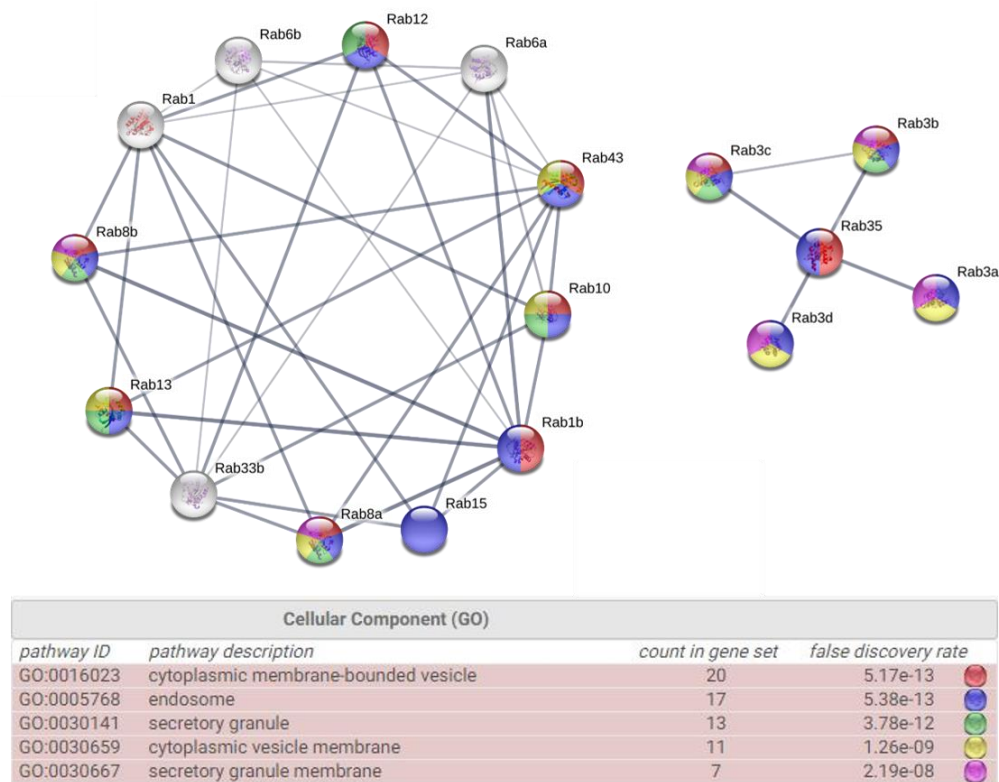


Figura 8. Interação entre as proteínas Ras no grupo GLLP e componentes celulares onde elas se concentram.

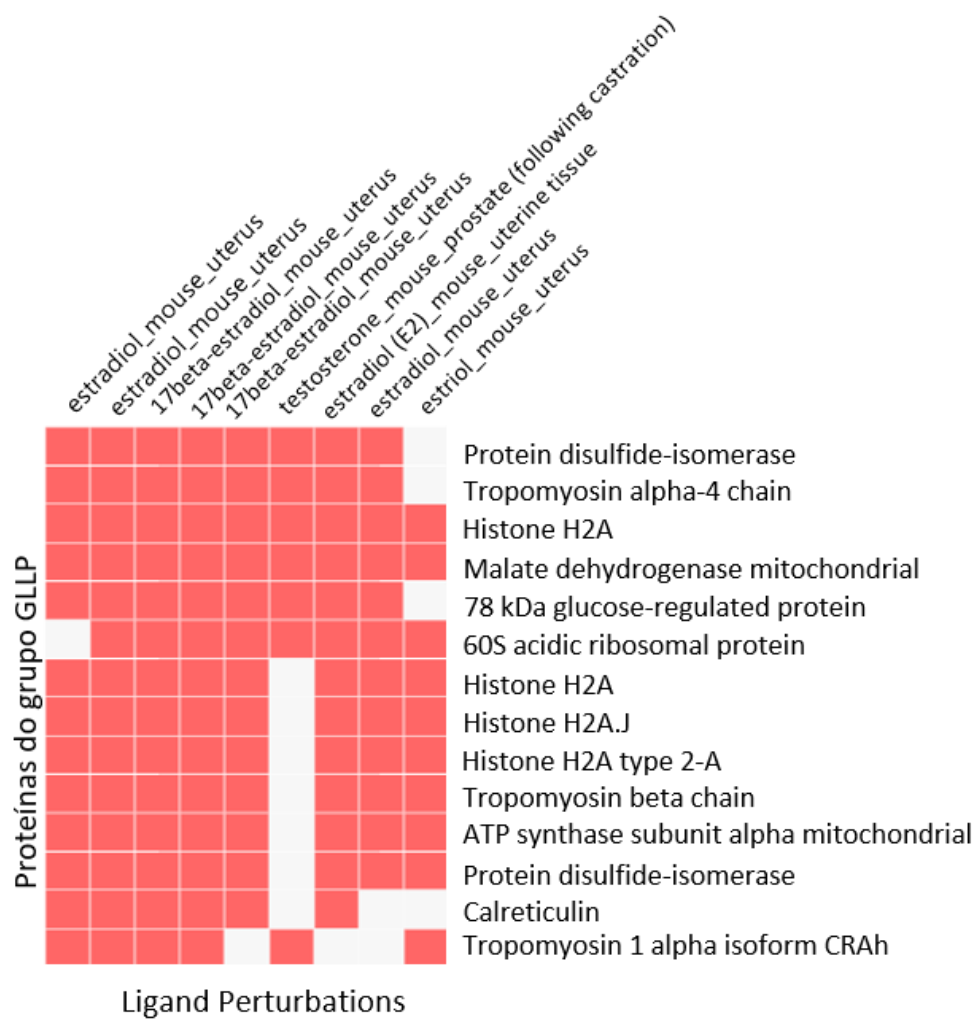


Figura 9. Análise do Enrichr, apresentando os estudos identificados com as proteínas diferencialmente expressas do grupo GLLP.

Tabela 1. Proteínas da Família RAS, exclusivas do grupo GLLP.

Accession	Gene name	Description	GLLP: CTR_P
Q5U316	Rab35	Ras-related protein Rab-35 OS=Rattus norvegicus GN=Rab35 PE=1 SV=1	GLLP
P70550	Rab8b	Ras-related protein Rab-8B OS=Rattus norvegicus GN=Rab8b PE=1 SV=1	GLLP
Q6NYB7	Rab1A	Ras-related protein Rab-1A OS=Rattus norvegicus GN=Rab1A PE=1 SV=3	GLLP
P10536	Rab1b	Ras-related protein Rab-1B OS=Rattus norvegicus GN=Rab1b PE=1 SV=1	GLLP
P35281	Rab10	Ras-related protein Rab-10 OS=Rattus norvegicus GN=Rab10 PE=1 SV=1	GLLP
P35280	Rab8a	Ras-related protein Rab-8A OS=Rattus norvegicus GN=Rab8a PE=1 SV=2	GLLP
P35289	Rab15	Ras-related protein Rab-15 OS=Rattus norvegicus GN=Rab15 PE=2 SV=1	GLLP
A0A1B0GWR3	Rab14	Ras-related protein Rab-14 OS=Rattus norvegicus GN=Rab14 PE=1 SV=1	GLLP
P05714	Rab4a	Ras-related protein Rab-4A OS=Rattus norvegicus GN=Rab4a PE=1 SV=3	GLLP
P63012	Rab3a	Ras-related protein Rab-3A OS=Rattus norvegicus GN=Rab3a PE=1 SV=1	GLLP
Q53B90	Rab43	Ras-related protein Rab-43 OS=Rattus norvegicus GN=Rab43 PE=2 SV=1	GLLP
P51156	Rab26	Ras-related protein Rab-26 OS=Rattus norvegicus GN=Rab26 PE=2 SV=2	GLLP
P51146	Rab4b	Ras-related protein Rab-4B OS=Rattus norvegicus GN=Rab4b PE=2 SV=1	GLLP
Q63942	Rab3d	GTP-binding protein Rab-3D OS=Rattus norvegicus GN=Rab3d PE=1 SV=2	GLLP
Q63941	Rab3b	Ras-related protein Rab-3B OS=Rattus norvegicus GN=Rab3b PE=1 SV=2	GLLP
P61107	Rab14	Ras-related protein Rab-14 OS=Rattus norvegicus GN=Rab14 PE=1 SV=3	GLLP
P35284	Rab12	Ras-related protein Rab-12 OS=Rattus norvegicus GN=Rab12 PE=1 SV=2	GLLP
D4A376	Rab12	Ras-related protein Rab-12 OS=Rattus norvegicus GN=Rab12 PE=1 SV=3	GLLP
P62824	Rab3c	Ras-related protein Rab-3C OS=Rattus norvegicus GN=Rab3c PE=1 SV=1	GLLP
Q9WVB1	Rab6a	Ras-related protein Rab-6A OS=Rattus norvegicus GN=Rab6a PE=1 SV=2	GLLP
P35286	Rab13	Ras-related protein Rab-13 OS=Rattus norvegicus GN=Rab13 PE=1 SV=2	GLLP
A0A0G2K235	Rab1a	RAB1A_ member RAS oncogene family OS=Rattus norvegicus GN=Rab1a PE=1 SV=1	GLLP
E9PU16	Rab1a	RAB1A_ member RAS oncogene family OS=Rattus norvegicus GN=Rab1a PE=1 SV=2	GLLP
G3V6H0	LOC100363782	RAB1B_ member RAS oncogene family-like OS=Rattus norvegicus	GLLP
A0A0G2JTT4	Rab30	RAB30_ member RAS oncogene family OS=Rattus norvegicus GN=Rab30 PE=1 SV=1	GLLP
B0BMW0	Rab14	RAB14_ member RAS oncogene family OS=Rattus norvegicus GN=Rab14 PE=1 SV=1	GLLP
Q5RKJ9	Rab10	RAB10_ member RAS oncogene family OS=Rattus norvegicus GN=Rab10 PE=1 SV=1	GLLP
D4A0G7	Rab37	RAB37_ member RAS oncogene family OS=Rattus norvegicus GN=Rab37 PE=4 SV=1	GLLP
D3ZZP2	Rab39a	RAB39_ member RAS oncogene family OS=Rattus norvegicus GN=Rab39a PE=4 SV=1	GLLP
F1LVC3	Rab6b	RAB6B_ member RAS oncogene family OS=Rattus norvegicus GN=Rab6b PE=4 SV=2	GLLP
A0A0G2JT78	Rab6b	RAB6B_ member RAS oncogene family OS=Rattus norvegicus GN=Rab6b PE=4 SV=1	GLLP

A0A0G2K201	Rab42	RAB42_ member RAS oncogene family OS=Rattus norvegicus GN=Rab42 PE=4 SV=1	GLLP
F1LW77	Rab33b	RAB33B_ member RAS oncogene family OS=Rattus norvegicus GN=Rab33b PE=1 SV	GLLP

Tabela 2. Proteínas identificadas CTR x GLP.

Accession	Description	GLP: CTR_ Ratio	GLP :CTR _P	Unique
P70623	Fatty acid-binding protein_ adipocyte OS=Rattus norvegicus GN=Fabp4 PE=1 SV=3	CTR	CTR	CTR
A0A0G2K896	Similar to RIKEN cDNA 1300017J02 OS=Rattus norvegicus GN=RGD1310507 PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
M0RBQ5	Histone H2B OS=Rattus norvegicus GN=Hist3h2bb PE=3 SV=1	CTR	CTR	CTR
Q4QQV0	Tubulin beta chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubb6 PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
A0A0G2JXK5	Serine protease inhibitor OS=Rattus norvegicus GN=LOC299282 PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
P11030	Acyl-CoA-binding protein OS=Rattus norvegicus GN=Dbi PE=1 SV=3	CTR	CTR	CTR
P85108	Tubulin beta-2A chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubb2a PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
A0A0G2K4Q4	ADP-ribosylation factor 3 OS=Rattus norvegicus GN=Arf3 PE=3 SV=1	CTR	CTR	CTR
P01048	T-kininogen 1 OS=Rattus norvegicus GN=Map1 PE=1 SV=2	CTR	CTR	CTR
P01836	Ig kappa chain C region_ A allele OS=Rattus norvegicus PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
P01835	Ig kappa chain C region_ B allele OS=Rattus norvegicus PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
A0A0G2JXI9	Histone H2B OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h2bo PE=3 SV=1	CTR	CTR	CTR
Q00715	Histone H2B type 1 OS=Rattus norvegicus PE=1 SV=2	CTR	CTR	CTR
G3V8B3	Histone H2B OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h2bq PE=3 SV=1	CTR	CTR	CTR
F1LPQ6	Immunoglobulin heavy constant mu OS=Rattus norvegicus GN=Ighm PE=4 SV=2	CTR	CTR	CTR
P01026	Complement C3 OS=Rattus norvegicus GN=C3 PE=1 SV=3	CTR	CTR	CTR
A0A0G2K9H8	ADP-ribosylation factor 3 OS=Rattus norvegicus GN=Arf3 PE=3 SV=1	CTR	CTR	CTR
Q5RKI1	Eukaryotic initiation factor 4A-II OS=Rattus norvegicus GN=Eif4a2 PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
D3ZLY9	Histone H2B OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h2bh PE=3 SV=2	CTR	CTR	CTR
P09117	Fructose-bisphosphate aldolase C OS=Rattus norvegicus GN=Aldoc PE=1 SV=3	CTR	CTR	CTR
Q6IFZ5	Keratin 76 OS=Rattus norvegicus GN=Krt76 PE=2 SV=1	CTR	CTR	CTR
P14141	Carbonic anhydrase 3 OS=Rattus norvegicus GN=Ca3 PE=1 SV=3	CTR	CTR	CTR
Q3B8Q2	Eukaryotic initiation factor 4A-III OS=Rattus norvegicus GN=Eif4a3 PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
Q6TXF3	Acyl-CoA-binding protein OS=Rattus norvegicus GN=Dbi PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
F1LM05	Serine protease inhibitor OS=Rattus norvegicus GN=LOC299282 PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
Q562C9	1_2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase OS=Rattus norvegicus GN=Adi1 PE=2 SV=1	CTR	CTR	CTR
Q9R0T3	DnaJ homolog subfamily C member 3 OS=Rattus norvegicus GN=Dnajc3 PE=1 SV=3	CTR	CTR	CTR
A0A0G2JXE0	Histone H2B OS=Rattus norvegicus GN=LOC102549061 PE=3 SV=1	CTR	CTR	CTR
A0A0G2JVQ5	Kininogen 1 OS=Rattus norvegicus GN=Kng1 PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
M0RBJ7	Complement C3 OS=Rattus norvegicus GN=C3 PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
Q6P3V8	Eukaryotic translation initiation factor 4A1 OS=Rattus norvegicus GN=Eif4a1 PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
P61206	ADP-ribosylation factor 3 OS=Rattus norvegicus GN=Arf3 PE=2 SV=2	CTR	CTR	CTR
P14480	Fibrinogen beta chain OS=Rattus norvegicus GN=Fgb PE=1 SV=4	CTR	CTR	CTR

A0A0G2K3Q6	Fructose-bisphosphate aldolase OS=Rattus norvegicus GN=Aldoc PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
A0A0G2JV81	ADP-ribosylation factor 3 OS=Rattus norvegicus GN=Arf3 PE=3 SV=1	CTR	CTR	CTR
G3V7C6	Tubulin beta chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubb4b PE=1 SV=2	CTR	CTR	CTR
A0A0G2JV65	14-3-3 protein zeta/delta OS=Rattus norvegicus GN=Ywhaz PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
D3ZNH4	Histone H2B OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h2bo PE=3 SV=1	CTR	CTR	CTR
P05544	Serine protease inhibitor A3L OS=Rattus norvegicus GN=Serpina3l PE=1 SV=3	CTR	CTR	CTR
B4F7C2	Tubulin beta chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubb4a PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
A0A0G2KAY3	Kininogen 1 OS=Rattus norvegicus GN=Kng1 PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
P62963	Profilin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Pfn1 PE=1 SV=2	CTR	CTR	CTR
M0RBF1	Complement C3 OS=Rattus norvegicus GN=C3 PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
A0A0G2K9Y0	Immunoglobulin heavy constant mu OS=Rattus norvegicus GN=Ighm PE=4 SV=1	CTR	CTR	CTR
G3V8R1	Nucleobindin 2_ isoform CRA_b OS=Rattus norvegicus GN=Nucb2 PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
E9PST1	Similar to RIKEN cDNA 1300017J02 OS=Rattus norvegicus GN=RGD1310507 PE=1 SV=3	CTR	CTR	CTR
P02680	Fibrinogen gamma chain OS=Rattus norvegicus GN=Fgg PE=1 SV=3	CTR	CTR	CTR
Q3KRE8	Tubulin beta-2B chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubb2b PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
Q4QRB4	Tubulin beta-3 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubb3 PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
F7EUK4	Kininogen 1 OS=Rattus norvegicus GN=Kng1 PE=1 SV=2	CTR	CTR	CTR
A0A0G2K8B7	Eukaryotic initiation factor 4A-II OS=Rattus norvegicus GN=Eif4a2 PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
D3ZNZ9	Histone H2B OS=Rattus norvegicus GN=Hist3h2ba PE=3 SV=1	CTR	CTR	CTR
Q6IG05	Keratin_ type II cytoskeletal 75 OS=Rattus norvegicus GN=Krt75 PE=3 SV=2	CTR	CTR	CTR
A0A0G2K1T8	Serine protease inhibitor OS=Rattus norvegicus GN=LOC299282 PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
P69897	Tubulin beta-5 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubb5 PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
A0A096MJL6	Phosphoglycerate kinase 1 (Fragment) OS=Rattus norvegicus GN=Pgk1 PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
M0R6Y8	Phosphoglycerate kinase OS=Rattus norvegicus PE=3 SV=1	CTR	CTR	CTR
F1LN61	Immunoglobulin heavy constant mu OS=Rattus norvegicus GN=Ighm PE=4 SV=3	CTR	CTR	CTR
M0R4L7	Histone H2B OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h2bl PE=3 SV=1	CTR	CTR	CTR
A0A0G2JYK0	Serine protease inhibitor OS=Rattus norvegicus GN=LOC299282 PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
Q9JI85	Nucleobindin-2 OS=Rattus norvegicus GN=Nucb2 PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
A0A0H2UHH5	Keratin_ type II cytoskeletal 75 OS=Rattus norvegicus GN=Krt75 PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
A0A0G2K586	Fatty acid-binding protein_ adipocyte OS=Rattus norvegicus GN=Fabp4 PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
P84083	ADP-ribosylation factor 5 OS=Rattus norvegicus GN=Arf5 PE=1 SV=2	CTR	CTR	CTR
P84082	ADP-ribosylation factor 2 OS=Rattus norvegicus GN=Arf2 PE=2 SV=1	CTR	CTR	CTR
D4A817	Histone H2B OS=Rattus norvegicus GN=Hist2h2be PE=3 SV=3	CTR	CTR	CTR
G3V9C7	Histone H2B OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h2bk PE=3 SV=1	CTR	CTR	CTR
Q5XFV4	Fabp4 protein OS=Rattus norvegicus GN=Fabp4 PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
P61751	ADP-ribosylation factor 4 OS=Rattus norvegicus GN=Arf4 PE=2 SV=2	CTR	CTR	CTR
A0A1W2Q6P6	DnaJ homolog subfamily C member 3 (Fragment) OS=Rattus norvegicus GN=Dnajc3 PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
P84079	ADP-ribosylation factor 1 OS=Rattus norvegicus GN=Arf1 PE=1 SV=2	CTR	CTR	CTR
Q6P9T8	Tubulin beta-4B chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubb4b PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
Q498M9	Similar to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=LOC303448 PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
P63102	14-3-3 protein zeta/delta OS=Rattus norvegicus GN=Ywhaz PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
G3V8H3	Glutathione S-transferase OS=Rattus norvegicus GN=Gstm3 PE=3 SV=1	CTR	CTR	CTR
A0A0G2KA54	Kininogen 1 OS=Rattus norvegicus GN=Kng1 PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
D3ZWM5	Histone H2B OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h2bd PE=3 SV=2	CTR	CTR	CTR

A0A0G2JVA8	Type II keratin Kb15 OS=Rattus norvegicus GN=Kb15 PE=3 SV=1	CTR	CTR	CTR
P08932	T-kininogen 2 OS=Rattus norvegicus PE=1 SV=2	CTR	CTR	CTR
P20759	Ig gamma-1 chain C region OS=Rattus norvegicus PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
P19945	60S acidic ribosomal protein P0 OS=Rattus norvegicus GN=Rplp0 PE=1 SV=2	GLP	GLP	GLP
M0RC20	Cystatin OS=Rattus norvegicus PE=3 SV=2	GLP	GLP	GLP
P47727	Carbonyl reductase [NADPH] 1 OS=Rattus norvegicus GN=Cbr1 PE=1 SV=2	GLP	GLP	GLP
D4A4D5	Similar to 60S acidic ribosomal protein P2 OS=Rattus norvegicus GN=LOC498555 PE=3 SV=1	GLP	GLP	GLP
P19527	Neurofilament light polypeptide OS=Rattus norvegicus GN=Nefl PE=1 SV=3	GLP	GLP	GLP
P00759	Tonin OS=Rattus norvegicus GN=Klk2 PE=1 SV=1	GLP	GLP	GLP
Q80VT8	S100 calcium-binding protein OS=Rattus norvegicus GN=S100vp PE=2 SV=1	GLP	GLP	GLP
A0A1W2Q6E9	Moesin OS=Rattus norvegicus GN=Msn PE=1 SV=1	GLP	GLP	GLP
D3ZN03	Ribosomal protein P2-like OS=Rattus norvegicus GN=LOC100362751 PE=1 SV=1	GLP	GLP	GLP
P02401	60S acidic ribosomal protein P2 OS=Rattus norvegicus GN=Rplp2 PE=1 SV=2	GLP	GLP	GLP
A0A0G2K0I1	Spermatogenesis-associated 5 OS=Rattus norvegicus GN=Spata5 PE=1 SV=1	GLP	GLP	GLP
A0A096MK30	Moesin OS=Rattus norvegicus GN=Msn PE=1 SV=1	GLP	GLP	GLP
M0R3X6	Carbonyl reductase [NADPH] 1 OS=Rattus norvegicus GN=Cbr1 PE=1 SV=1	GLP	GLP	GLP
P51886	Lumican OS=Rattus norvegicus GN=Lum PE=1 SV=1	GLP	GLP	GLP
A0A0G2K658	Carbonyl reductase [NADPH] 1 OS=Rattus norvegicus GN=LOC102556347 PE=1 SV=1	GLP	GLP	GLP
A0A096MJ24	Carbonyl reductase [NADPH] 1 OS=Rattus norvegicus GN=Cbr1 PE=1 SV=1	GLP	GLP	GLP
F1M5A4	Katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 2 OS=Rattus norvegicus GN=Katnal2 PE=3 SV=3	GLP	GLP	GLP
O35763	Moesin OS=Rattus norvegicus GN=Msn PE=1 SV=3	GLP	GLP	GLP
A0A0G2JSV2	Carbonyl reductase [NADPH] 1 OS=Rattus norvegicus GN=Cbr1 PE=1 SV=1	GLP	GLP	GLP
D3ZJT4	60S acidic ribosomal protein P0 OS=Rattus norvegicus GN=RGD1564469 PE=3 SV=3	GLP	GLP	GLP
D4A6T1	Spermatogenesis associated 5 (Predicted)_ isoform CRA_a OS=Rattus norvegicus GN=Spata5 PE=1 SV=1	GLP	GLP	GLP
A0A0G2K7Y9	Spermine-binding protein-like OS=Rattus norvegicus GN=Sbpl PE=4 SV=1	2,435	1	Up
F1LNH4	Kallikrein 1-related peptidase C12 OS=Rattus norvegicus GN=Klk1c12 PE=3 SV=1	1,954	1	Up
P02091	Hemoglobin subunit beta-1 OS=Rattus norvegicus GN=Hbb PE=1 SV=3	1,209	1	Up
A0A0G2JSQ4	Tropomyosin 1_ alpha_ isoform CRA_p OS=Rattus norvegicus GN=Tpm1 PE=1 SV=1	1,632	1	Up
Q62669	Globin a1 OS=Rattus norvegicus GN=LOC103694855 PE=1 SV=1	12,06	1	Up
Q4FZT6	Histone H2A type 3 OS=Rattus norvegicus PE=2 SV=3	1,197	1	Up
Q00728	Histone H2A type 4 OS=Rattus norvegicus PE=2 SV=2	1,221	1	Up
Q6I8Q6	Histone H2A OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h2af PE=3 SV=1	1,209	1	Up
A0A0G2JX00	Kallikrein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Klk1c9 PE=3 SV=1	1,935	1	Up
M0RDZ8	Prostatic glandular kallikrein-6-like OS=Rattus norvegicus GN=LOC103690048 PE=3 SV=1	1,954	1	Up
D3Z9U8	Similar to S100 calcium-binding protein_ ventral prostate OS=Rattus norvegicus GN=RGD1562234 PE=4 SV=1	1,174	1	Up
Q923Z2	Tropomyosin 1_ alpha_ isoform CRA_a OS=Rattus norvegicus GN=Tpm1 PE=1 SV=1	1,649	1	Up
D3ZVK7	Histone H2A OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h2ak PE=3 SV=1	1,197	1	Up
A0A0G2JZ90	Spermine-binding protein-like OS=Rattus norvegicus GN=Sbpl PE=4 SV=1	2,435	1	Up
A0A0G2K797	Kallikrein 1-related peptidase C6 OS=Rattus norvegicus GN=Klk1c6 PE=3 SV=1	1,954	1	Up
P0CC09	Histone H2A type 2-A OS=Rattus norvegicus GN=Hist2h2aa3 PE=1 SV=1	1,221	1	Up
G3V983	Glutathione S-transferase OS=Rattus norvegicus GN=Gstm1 PE=1 SV=2	1,786	1	Up
P02780	Secretoglobulin family 2A member 2 OS=Rattus norvegicus GN=Scgb2a2 PE=1 SV=1	1,649	1	Up
P08010	Glutathione S-transferase Mu 2 OS=Rattus norvegicus GN=Gstm2 PE=1 SV=2	1,391	1	Up

P08009	Glutathione S-transferase Yb-3 OS=Rattus norvegicus GN=Gstm3 PE=1 SV=2	1,391	1	Up
Q5BK56	Glutathione S-transferase OS=Rattus norvegicus GN=Gstm4 PE=1 SV=1	1,377	1	Up
P22283	Cystatin-related protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Crp2 PE=2 SV=1	1,185	1	Up
P22282	Cystatin-related protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Andpro PE=1 SV=1	3,819	1	Up
P04905	Glutathione S-transferase Mu 1 OS=Rattus norvegicus GN=Gstm1 PE=1 SV=2	1,682	1	Up
F1M6C2	Elongation factor 1-alpha 1 pseudogene OS=Rattus norvegicus GN=LOC103691939 PE=1 SV=1	3,19	1	Up
P08723	Prostatic spermine-binding protein OS=Rattus norvegicus GN=Sbp PE=1 SV=1	2,293	1	Up
P07647	Submandibular glandular kallikrein-9 OS=Rattus norvegicus GN=Klk9 PE=1 SV=1	1,935	1	Up
Q64598	Histone H2A type 1-F OS=Rattus norvegicus PE=3 SV=3	1,234	1	Up
P11232	Thioredoxin OS=Rattus norvegicus GN=Txn PE=1 SV=2	2,293	1	Up
A0A0G2JTW9	Hemoglobin_ beta adult major chain OS=Rattus norvegicus GN=Hbb-b1 PE=1 SV=1	12,06	1	Up
D4ACV3	Histone H2A OS=Rattus norvegicus GN=Hist2h2ac PE=3 SV=2	1,209	1	Up
P0C170	Histone H2A type 1-E OS=Rattus norvegicus PE=1 SV=2	1,209	1	Up
P0C169	Histone H2A type 1-C OS=Rattus norvegicus PE=1 SV=2	1,221	1	Up
P04785	Protein disulfide-isomerase OS=Rattus norvegicus GN=P4hb PE=1 SV=2	1,174	1	Up
W4VSR8	Kallikrein 1-related peptidase C6 OS=Rattus norvegicus GN=Klk1c6 PE=3 SV=2	1,954	1	Up
A0A0G2JTU6	Prostatic spermine-binding protein OS=Rattus norvegicus GN=Sbp PE=4 SV=1	2,316	1	Up
P02262	Histone H2A type 1 OS=Rattus norvegicus PE=1 SV=2	1,197	1	Up
M0RDM4	Histone H2A OS=Rattus norvegicus GN=LOC680322 PE=3 SV=1	1,221	1	Up
F1LUV3	Similar to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=LOC291543 PE=1 SV=3	1,768	1	Up
A0A0G2JSZ5	Protein disulfide-isomerase A6 OS=Rattus norvegicus GN=Pdia6 PE=1 SV=1	1,139	1	Up
P36376	Glandular kallikrein-12_ submandibular/renal OS=Rattus norvegicus GN=Klk12 PE=2 SV=1	1,974	1	Up
P36375	Glandular kallikrein-10 OS=Rattus norvegicus GN=Klk10 PE=1 SV=2	1,954	1	Up
P36374	Prostatic glandular kallikrein-6 OS=Rattus norvegicus GN=Klk6 PE=3 SV=1	1,974	1	Up
P36373	Glandular kallikrein-7_ submandibular/renal OS=Rattus norvegicus GN=Klk7 PE=1 SV=1	1,974	1	Up
P01946	Hemoglobin subunit alpha-1/2 OS=Rattus norvegicus GN=Hba1 PE=1 SV=3	1,221	1	Up
A0A0G2JSW3	Globin a4 OS=Rattus norvegicus GN=Hbb PE=1 SV=1	1,209	1	Up
G3V9C0	Histone H2A OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h2ac PE=3 SV=1	1,209	1	Up
P11517	Hemoglobin subunit beta-2 OS=Rattus norvegicus PE=1 SV=2	1,162	1	Up
A0A0G2JSV6	Globin c2 OS=Rattus norvegicus GN=Hba-a2 PE=1 SV=1	1,234	1	Up
A0A0G2JSU6	Cystatin OS=Rattus norvegicus GN=Andpro PE=3 SV=1	3,857	1	Up
G3V8H1	Kallikrein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Klk1 PE=3 SV=1	1,954	1	Up
A0A0G2K4U2	Glutathione S-transferase Mu 2 OS=Rattus norvegicus GN=Gstm7 PE=1 SV=1	1,462	1	Up
G3V8G8	Kallikrein 1-related peptidase C8 OS=Rattus norvegicus GN=Klk1c8 PE=3 SV=1	1,954	1	Up
A0A0G2K6G1	Kallikrein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Klk1c9 PE=3 SV=1	1,974	1	Up
O88752	Epsilon 1 globin OS=Rattus norvegicus GN=Hbe1 PE=1 SV=1	1,174	1	Up
M0RCL5	Histone H2A OS=Rattus norvegicus GN=LOC100910554 PE=1 SV=1	1,209	1	Up
A0A140TAF0	RCG62531_ isoform CRA_g OS=Rattus norvegicus GN=Tpm3 PE=1 SV=1	1,665	0,99	Up
E9PTV9	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=RGD1562758 PE=1 SV=2	1,507	0,99	Up
A9UMV8	Histone H2A.J OS=Rattus norvegicus GN=H2afj PE=2 SV=1	1,209	0,99	Up
Q63610	Tropomyosin alpha-3 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tpm3 PE=1 SV=2	1,665	0,99	Up
Q63607	Alpha-tropomyosin 3 OS=Rattus norvegicus GN=Tpm1 PE=1 SV=1	1,632	0,99	Up
P04692	Tropomyosin alpha-1 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tpm1 PE=1 SV=3	1,616	0,99	Up

A0A0G2JX64	Tropomyosin 1_ alpha_ isoform CRA_i OS=Rattus norvegicus GN=Tpm1 PE=1 SV=1	1,632	0,99	Up
A0A0G2JXJ9	Keratin_ type I cytoskeletal 14 OS=Rattus norvegicus GN=Krt14 PE=1 SV=1	1,916	0,98	Up
P09495	Tropomyosin alpha-4 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tpm4 PE=1 SV=3	1,553	0,98	Up
Q91XN6	Tropomyosin 1_ alpha_ isoform CRA_h OS=Rattus norvegicus GN=Tpm1 PE=1 SV=1	1,568	0,98	Up
A0A0G2K7F7	Tropomyosin alpha-1 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tpm1 PE=1 SV=1	1,649	0,98	Up
A0A0A0MY09	Endoplasmin OS=Rattus norvegicus GN=Hsp90b1 PE=1 SV=1	1,507	0,97	Up
A0A0G2K4I4	Endoplasmin OS=Rattus norvegicus GN=Hsp90b1 PE=1 SV=1	1,492	0,97	Up
Q9R063	Peroxiredoxin-5_ mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Prdx5 PE=1 SV=1	1,139	0,97	Up
Q63081	Protein disulfide-isomerase A6 OS=Rattus norvegicus GN=Pdia6 PE=1 SV=2	1,105	0,96	Up
A0A0G2JSS8	Peroxiredoxin 5_ isoform CRA_c OS=Rattus norvegicus GN=Prdx5 PE=1 SV=1	1,116	0,91	
D3ZXP3	Histone H2A OS=Rattus norvegicus GN=H2afx PE=1 SV=1	1,083	0,88	
A0A0A0MXW3	Histone H2A OS=Rattus norvegicus GN=H2afz PE=3 SV=1	1,094	0,87	
Q08290	Calponin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Cnn1 PE=1 SV=1	1,477	0,86	
P53534	Glycogen phosphorylase_ brain form (Fragment) OS=Rattus norvegicus GN=Pygb PE=1 SV=3	1,03	0,85	
G3V8R3	Globin e1 OS=Rattus norvegicus GN=Hbz PE=3 SV=1	1,15	0,8	
P0C0S7	Histone H2A.Z OS=Rattus norvegicus GN=H2afz PE=1 SV=2	1,073	0,8	
D4AEC0	Histone H2A OS=Rattus norvegicus GN=H2afv PE=3 SV=1	1,073	0,8	
Q63910	Alpha globin OS=Rattus norvegicus GN=Hba-a3 PE=1 SV=2	1,15	0,79	
D3ZWE0	Histone H2A OS=Rattus norvegicus GN=Hist2h2ab PE=3 SV=1	1,062	0,78	
Q66HD0	Endoplasmin OS=Rattus norvegicus GN=Hsp90b1 PE=1 SV=2	1,116	0,78	
M0R6X5	Histone H2A OS=Rattus norvegicus PE=3 SV=2	1,363	0,78	
P04636	Malate dehydrogenase_ mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Mdh2 PE=1 SV=2	1,094	0,76	
G3V6Y6	Alpha-1_4 glucan phosphorylase OS=Rattus norvegicus GN=Pygb PE=1 SV=2	1,02	0,75	
P19944	60S acidic ribosomal protein P1 OS=Rattus norvegicus GN=Rplp1 PE=3 SV=1	1,094	0,74	
F1M927	Ribosomal protein S27a_ pseudogene 5 OS=Rattus norvegicus GN=Rps27a-ps5 PE=4 SV=2	1,094	0,74	
P58775	Tropomyosin beta chain OS=Rattus norvegicus GN=Tpm2 PE=1 SV=1	1,051	0,71	
F1LP05	ATP synthase subunit alpha OS=Rattus norvegicus GN=Atp5a1 PE=1 SV=1	1,094	0,66	
P82995	Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Rattus norvegicus GN=Hsp90aa1 PE=1 SV=3	1,041	0,63	
P34058	Heat shock protein HSP 90-beta OS=Rattus norvegicus GN=Hsp90ab1 PE=1 SV=4	1,062	0,63	
Q63279	Keratin_ type I cytoskeletal 19 OS=Rattus norvegicus GN=Krt19 PE=1 SV=2	1,051	0,61	
P18418	Calreticulin OS=Rattus norvegicus GN=Calr PE=1 SV=1	1,01	0,61	
Q6P725	Desmin OS=Rattus norvegicus GN=Des PE=1 SV=1	1,041	0,58	
P04797	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3	1,01	0,57	
P15999	ATP synthase subunit alpha_ mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5a1 PE=1 SV=2	1,083	0,55	
F1M5A1	Calreticulin 4 OS=Rattus norvegicus GN=Calr4 PE=1 SV=2	1,051	0,51	
P31000	Vimentin OS=Rattus norvegicus GN=Vim PE=1 SV=2	0,99	0,5	
P62632	Elongation factor 1-alpha 2 OS=Rattus norvegicus GN=Eef1a2 PE=1 SV=1	1	0,5	
Q5XHZ0	Heat shock protein 75 kDa_ mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Trap1 PE=1 SV=1	0,99	0,48	
G3V8C3	Vimentin OS=Rattus norvegicus GN=Vim PE=1 SV=1	0,97	0,44	
Q5BJY9	Keratin_ type I cytoskeletal 18 OS=Rattus norvegicus GN=Krt18 PE=1 SV=3	0,99	0,44	
P48675	Desmin OS=Rattus norvegicus GN=Des PE=1 SV=2	0,98	0,44	
D3ZGY4	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh-ps2 PE=1 SV=1	0,98	0,44	
P09812	Glycogen phosphorylase_ muscle form OS=Rattus norvegicus GN=Pygm PE=1 SV=5	0,99	0,43	
D3ZYM6	Calreticulin 4 OS=Rattus norvegicus GN=Calr4 PE=1 SV=2	0,961	0,42	

F1LM19	Alpha-2-HS-glycoprotein OS=Rattus norvegicus GN=Ahsg PE=1 SV=3	0,961	0,41	
P24090	Alpha-2-HS-glycoprotein OS=Rattus norvegicus GN=Ahsg PE=1 SV=2	0,923	0,41	
M0R590	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=LOC108351137 PE=3 SV=1	0,98	0,41	
E9PTN6	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus PE=3 SV=1	0,98	0,41	
P21807	Peripherin OS=Rattus norvegicus GN=Prph PE=1 SV=1	0,787	0,39	
P47875	Cysteine and glycine-rich protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Csrp1 PE=1 SV=2	0,932	0,37	
G3V6D3	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=1 SV=1	0,942	0,35	
P06761	78 kDa glucose-regulated protein OS=Rattus norvegicus GN=Hspa5 PE=1 SV=1	0,98	0,34	
A0A0G2K793	Heat shock protein HSP 90-beta OS=Rattus norvegicus GN=Hsp90ab1 PE=1 SV=1	0,961	0,31	
D3ZVQ8	Glutathione S-transferase_ mu 6-like OS=Rattus norvegicus GN=Gstm6 PE=4 SV=3	0,896	0,3	
F1LZI1	Similar to heat shock protein 8 OS=Rattus norvegicus GN=LOC680121 PE=3 SV=2	0,861	0,29	
P10719	ATP synthase subunit beta_ mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=1 SV=2	0,878	0,27	
A0A0G2JZ73	Alpha-1-antiproteinase OS=Rattus norvegicus GN=Serpina1 PE=1 SV=1	0,869	0,27	
A0A0G2K6L4	Glutathione S-transferase_ mu 6 (Predicted)_ isoform CRA_a OS=Rattus norvegicus GN=Gstm6l PE=1 SV=1	0,869	0,27	
P07632	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Rattus norvegicus GN=Sod1 PE=1 SV=2	0,827	0,26	
F1M7P4	Peripherin OS=Rattus norvegicus GN=Prph PE=1 SV=1	0,771	0,26	
B1WBQ8	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdhs PE=1 SV=1	0,852	0,25	
A0A0G2JZ09	Glutathione S-transferase_ mu 6-like OS=Rattus norvegicus GN=Gstm6l PE=1 SV=1	0,861	0,25	
P17475	Alpha-1-antiproteinase OS=Rattus norvegicus GN=Serpina1 PE=1 SV=2	0,869	0,25	
Q5BKC3	Park7 protein OS=Rattus norvegicus GN=Park7 PE=1 SV=1	0,923	0,24	
A0A0G2K2G8	Tropomyosin alpha-4 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tpm4 PE=1 SV=1	0,595	0,24	
G3V712	Keratin complex 2_ basic_ gene 7_ isoform CRA_a OS=Rattus norvegicus GN=Krt7 PE=1 SV=1	0,698	0,22	
Q6IG12	Keratin_ type II cytoskeletal 7 OS=Rattus norvegicus GN=Krt7 PE=3 SV=1	0,67	0,22	
P15399	Probasin OS=Rattus norvegicus GN=Pbsn PE=1 SV=1	0,942	0,22	
A0A0G2JY31	Alpha-1-antiproteinase OS=Rattus norvegicus GN=Serpina1 PE=1 SV=1	0,852	0,22	
F1LXL7	Glutathione S-transferase_ mu 6-like OS=Rattus norvegicus GN=Gstm6l PE=4 SV=3	0,852	0,2	
A0A0H2UHM7	Tubulin alpha chain OS=Rattus norvegicus GN=LOC100909441 PE=3 SV=1	0,852	0,2	
Q9Z1B2	Glutathione S-transferase Mu 5 OS=Rattus norvegicus GN=Gstm5 PE=1 SV=3	0,827	0,19	
M0R660	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus PE=1 SV=1	0,896	0,19	
O88767	Protein DJ-1 OS=Rattus norvegicus GN=Park7 PE=1 SV=1	0,905	0,19	
P0CG51	Polyubiquitin-B OS=Rattus norvegicus GN=Ubb PE=1 SV=1	0,932	0,17	
F1LML2	Polyubiquitin-C OS=Rattus norvegicus GN=Ubc PE=4 SV=1	0,923	0,15	
Q9ESV6	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase_ testis-specific OS=Rattus norvegicus GN=Gapdhs PE=1 SV=1	0,811	0,15	
G3V8V3	Alpha-1_4 glucan phosphorylase OS=Rattus norvegicus GN=Pygm PE=1 SV=1	0,99	0,15	
P62986	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40 OS=Rattus norvegicus GN=Uba52 PE=1 SV=2	0,923	0,14	
P09811	Glycogen phosphorylase_ liver form OS=Rattus norvegicus GN=Pygl PE=1 SV=5	0,97	0,14	
P62982	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a OS=Rattus norvegicus GN=Rps27a PE=1 SV=2	0,932	0,13	
Q63429	Polyubiquitin-C OS=Rattus norvegicus GN=Ubc PE=1 SV=1	0,923	0,13	
P04906	Glutathione S-transferase P OS=Rattus norvegicus GN=Gstp1 PE=1 SV=2	0,684	0,1	
Q6AYZ1	Tubulin alpha-1C chain OS=Rattus norvegicus GN=Tuba1c PE=1 SV=1	0,811	0,09	
P46462	Transitional endoplasmic reticulum ATPase OS=Rattus norvegicus GN=Vcp PE=1 SV=3	0,878	0,08	
P68370	Tubulin alpha-1A chain OS=Rattus norvegicus GN=Tuba1a PE=1 SV=1	0,756	0,08	
F1LU69	Ubiquitin B pseudogene 4 OS=Rattus norvegicus GN=Ubbp4 PE=4 SV=3	0,914	0,08	

Q6P9V9	Tubulin alpha-1B chain OS=Rattus norvegicus GN=Tuba1b PE=1 SV=1	0,771	0,06	
Q68FR8	Tubulin alpha-3 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tuba3a PE=2 SV=1	0,741	0,06	
M0R5V7	Murinoglobulin-2 OS=Rattus norvegicus GN=Mug2 PE=1 SV=2	0,787	0,05	Down
P0DMW1	Heat shock 70 kDa protein 1B OS=Rattus norvegicus GN=Hspa1b PE=2 SV=1	0,787	0,05	Down
P12346	Serotransferrin OS=Rattus norvegicus GN=Tf PE=1 SV=3	0,896	0,05	Down
A0A0G2QC06	Serotransferrin OS=Rattus norvegicus GN=Tf PE=1 SV=1	0,896	0,05	Down
Q6IE52	Murinoglobulin-2 OS=Rattus norvegicus GN=Mug2 PE=1 SV=1	0,779	0,04	Down
P55063	Heat shock 70 kDa protein 1-like OS=Rattus norvegicus GN=Hspa1l PE=2 SV=2	0,779	0,04	Down
A0A0G2JWK7	Transgelin OS=Rattus norvegicus GN=Tagln PE=1 SV=1	0,852	0,04	Down
P0DMW0	Heat shock 70 kDa protein 1A OS=Rattus norvegicus GN=Hspa1a PE=2 SV=1	0,779	0,04	Down
P04764	Alpha-enolase OS=Rattus norvegicus GN=Eno1 PE=1 SV=4	0,756	0,03	Down
D3ZRN3	Actin_ beta-like 2 OS=Rattus norvegicus GN=Actbl2 PE=1 SV=1	0,905	0,02	Down
A0A0H2UHX5	Neprilysin OS=Rattus norvegicus GN=Mme PE=4 SV=1	0,625	0,02	Down
P31232	Transgelin OS=Rattus norvegicus GN=Tagln PE=1 SV=2	0,861	0,02	Down
G3V9J1	Alpha-1-inhibitor III OS=Rattus norvegicus GN=LOC297568 PE=1 SV=3	0,741	0,02	Down
P10111	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Rattus norvegicus GN=Ppia PE=1 SV=2	0,748	0,02	Down
B1WC26	N-acetylneuraminate synthase OS=Rattus norvegicus GN=Nans PE=1 SV=1	0,691	0,01	Down
P00762	Anionic trypsin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Prss1 PE=1 SV=1	0,664	0,01	Down
P05065	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Rattus norvegicus GN=Aldoa PE=1 SV=2	0,533	0,01	Down
M0R8M9	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Rattus norvegicus GN=Hspa8 PE=3 SV=2	0,795	0,01	Down
Q5XIF6	Tubulin alpha-4A chain OS=Rattus norvegicus GN=Tuba4a PE=1 SV=1	0,631	0,01	Down
Q6AY07	Fructose-bisphosphate aldolase OS=Rattus norvegicus GN=Aldoa2 PE=2 SV=1	0,517	0,01	Down
Q10758	Keratin_ type II cytoskeletal 8 OS=Rattus norvegicus GN=Krt8 PE=1 SV=3	0,852	0,01	Down
A0A0G2K926	Alpha-1-inhibitor III OS=Rattus norvegicus GN=LOC297568 PE=1 SV=1	0,638	0	Down
A0A0G2K2E4	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Rattus norvegicus GN=LOC100911252 PE=3 SV=1	0,726	0	Down
P62738	Actin_ aortic smooth muscle OS=Rattus norvegicus GN=Acta2 PE=2 SV=1	0,914	0	Down
P63018	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Rattus norvegicus GN=Hspa8 PE=1 SV=1	0,748	0	Down
A0A0G2K4M6	Actin_ aortic smooth muscle OS=Rattus norvegicus GN=Acta2 PE=3 SV=1	0,905	0	Down
B5DEI2	Amine oxidase OS=Rattus norvegicus GN=Lao1 PE=2 SV=1	0,436	0	Down
P02782	Prostatic steroid-binding protein C1 OS=Rattus norvegicus GN=Psbpc1 PE=1 SV=1	0,445	0	Down
P02781	Prostatic steroid-binding protein C2 OS=Rattus norvegicus GN=Psbpc2 PE=1 SV=1	0,914	0	Down
A0A0G2JUW7	Alpha-1-inhibitor III OS=Rattus norvegicus GN=Mug1 PE=1 SV=1	0,631	0	Down
P62630	Elongation factor 1-alpha 1 OS=Rattus norvegicus GN=Eef1a1 PE=2 SV=1	0,698	0	Down
P02770	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2	0,861	0	Down
P05964	Protein S100-A6 OS=Rattus norvegicus GN=S100a6 PE=1 SV=3	0,677	0	Down
A0A0G2QC50	CD55 molecule_ decay accelerating factor for complement OS=Rattus norvegicus GN=Cd55 PE=1 SV=1	0,625	0	Down
P02769	Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4	0,748	0	Down
P63269	Actin_ gamma-enteric smooth muscle OS=Rattus norvegicus GN=Actg2 PE=2 SV=1	0,905	0	Down
B2GV72	Carbonyl reductase 3 OS=Rattus norvegicus GN=Cbr3 PE=1 SV=1	0,763	0	Down
M0RCZ9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Ppia4g PE=1 SV=2	0,44	0	Down
A0A0H2UHR8	Prostatic steroid-binding protein C2 OS=Rattus norvegicus GN=Psbpc2 PE=4 SV=1	0,914	0	Down
D4AA52	Alpha-1-inhibitor III OS=Rattus norvegicus GN=Mug1 PE=1 SV=3	0,631	0	Down
P63259	Actin_ cytoplasmic 2 OS=Rattus norvegicus GN=Actg1 PE=1 SV=1	0,827	0	Down
A0A0G2JSH5	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=1	0,835	0	Down

A0A0G2JUT0	Heat shock-related 70 kDa protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Hspa2 PE=1 SV=1	0,756	0	Down
P14046	Alpha-1-inhibitor 3 OS=Rattus norvegicus GN=A1i3 PE=1 SV=1	0,625	0	Down
D4A4S3	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Rattus norvegicus GN=Hspa8 PE=3 SV=3	0,787	0	Down
P11598	Protein disulfide-isomerase A3 OS=Rattus norvegicus GN=Pdia3 PE=1 SV=2	0,887	0	Down
D4A6E3	Alpha-1-inhibitor III OS=Rattus norvegicus GN=Mug1 PE=1 SV=2	0,638	0	Down
P68136	Actin_ alpha skeletal muscle OS=Rattus norvegicus GN=Acta1 PE=1 SV=1	0,942	0	Down
A0A0G2K3K2	Actin_ cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1	0,827	0	Down
A0A0G2JUP5	Alpha-1-inhibitor III OS=Rattus norvegicus GN=Mug1 PE=1 SV=1	0,741	0	Down
A0A0H2UHM5	Protein disulfide-isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Pdia3 PE=1 SV=1	0,896	0	Down
A0A0G2K4C9	Prostatic spermine-binding protein OS=Rattus norvegicus GN=Sbp PE=4 SV=1	0,878	0	Down
Z4YNX7	Cystatin OS=Rattus norvegicus GN=P22k15 PE=3 SV=2	0,577	0	Down
P20059	Hemopexin OS=Rattus norvegicus GN=Hpx PE=1 SV=3	0,705	0	Down
Q03626	Murinoglobulin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Mug1 PE=2 SV=1	0,625	0	Down
P68035	Actin_ alpha cardiac muscle 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actc1 PE=2 SV=1	0,914	0	Down
Q63041	Alpha-1-macroglobulin OS=Rattus norvegicus GN=A1m PE=1 SV=1	0,756	0	Down
P60711	Actin_ cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1	0,819	0	Down
A0A0G2K1P0	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Ppia PE=1 SV=1	0,726	0	Down
A0A0G2K176	Prostatic spermine-binding protein OS=Rattus norvegicus GN=Sbp PE=4 SV=1	0,878	0	Down
P14659	Heat shock-related 70 kDa protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Hspa2 PE=1 SV=2	0,748	0	Down
P07861	Neprilysin OS=Rattus norvegicus GN=Mme PE=1 SV=2	0,6	0	Down
P20761	Ig gamma-2B chain C region OS=Rattus norvegicus GN=Igh-1a PE=1 SV=1	0,463	0	Down
P20760	Ig gamma-2A chain C region OS=Rattus norvegicus GN=Igg-2a PE=1 SV=1	0,571	0	Down
M0R757	Elongation factor 1-alpha OS=Rattus norvegicus GN=LOC100360413 PE=3 SV=1	0,691	0	Down

Tabela 3. Proteínas identificadas CTR x GLLP.

Accession	Description	GLLP: CTR_ Ratio	GLLP: CTR_ _P	Unique
A0A0G2K896	Similar to RIKEN cDNA 1300017J02 OS=Rattus norvegicus GN=RGD1310507 PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
Q4QQV0	Tubulin beta chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubb6 PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
P85108	Tubulin beta-2A chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubb2a PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
P00762	Anionic trypsin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Prss1 PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
A0A0G2K477	Immunoglobulin heavy constant mu OS=Rattus norvegicus GN=IGHM PE=4 SV=1	CTR	CTR	CTR
P09117	Fructose-bisphosphate aldolase C OS=Rattus norvegicus GN=Aldoc PE=1 SV=3	CTR	CTR	CTR
M0RBJ7	Complement C3 OS=Rattus norvegicus GN=C3 PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
A0A0G2K3Q6	Fructose-bisphosphate aldolase OS=Rattus norvegicus GN=Aldoc PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
G3V7C6	Tubulin beta chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubb4b PE=1 SV=2	CTR	CTR	CTR
A0A0G2K765	Zinc finger protein 606 OS=Rattus norvegicus GN=Zfp606 PE=4 SV=1	CTR	CTR	CTR
M0RCZ9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Ppia4g PE=1 SV=2	CTR	CTR	CTR
A0A0G2K0I1	Spermatogenesis-associated 5 OS=Rattus norvegicus GN=Spata5 PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
B4F7C2	Tubulin beta chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubb4a PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
M0RBF1	Complement C3 OS=Rattus norvegicus GN=C3 PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR

E9PST1	Similar to RIKEN cDNA 1300017J02 OS=Rattus norvegicus GN=RGD1310507 PE=1 SV=3	CTR	CTR	CTR
P07632	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Rattus norvegicus GN=Sod1 PE=1 SV=2	CTR	CTR	CTR
P02680	Fibrinogen gamma chain OS=Rattus norvegicus GN=Fgg PE=1 SV=3	CTR	CTR	CTR
Q3KRE8	Tubulin beta-2B chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubb2b PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
Q4QRB4	Tubulin beta-3 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubb3 PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
P47875	Cysteine and glycine-rich protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Csrp1 PE=1 SV=2	CTR	CTR	CTR
P69897	Tubulin beta-5 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubb5 PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
P07150	Annexin A1 OS=Rattus norvegicus GN=Anxa1 PE=1 SV=2	CTR	CTR	CTR
F1M5A4	Katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 2 OS=Rattus norvegicus GN=Katnal2 PE=3 SV=3	CTR	CTR	CTR
Q6AY07	Fructose-bisphosphate aldolase OS=Rattus norvegicus GN=Aldoat2 PE=2 SV=1	CTR	CTR	CTR
Q6P9T8	Tubulin beta-4B chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubb4b PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
G3V8H6	RCG27439 OS=Rattus norvegicus GN=Zfp606 PE=4 SV=1	CTR	CTR	CTR
D4A6T1	Spermatogenesis associated 5 (Predicted)_ isoform CRA_a OS=Rattus norvegicus GN=Spata5 PE=1 SV=1	CTR	CTR	CTR
A0A1B0GWR3	Ras-related protein Rab-14 (Fragment) OS=Rattus norvegicus GN=Rab14 PE=1 SV=1	GLLP	GLLP	GLLP
P19945	60S acidic ribosomal protein P0 OS=Rattus norvegicus GN=Rplp0 PE=1 SV=2	GLLP	GLLP	GLLP
D3ZZP2	RAB39_ member RAS oncogene family (Predicted) OS=Rattus norvegicus GN=Rab39a PE=4 SV=1	GLLP	GLLP	GLLP
P47727	Carbonyl reductase [NADPH] 1 OS=Rattus norvegicus GN=Cbr1 PE=1 SV=2	GLLP	GLLP	GLLP
P05714	Ras-related protein Rab-4A OS=Rattus norvegicus GN=Rab4a PE=1 SV=3	GLLP	GLLP	GLLP
P19527	Neurofilament light polypeptide OS=Rattus norvegicus GN=Nefl PE=1 SV=3	GLLP	GLLP	GLLP
P63012	Ras-related protein Rab-3A OS=Rattus norvegicus GN=Rab3a PE=1 SV=1	GLLP	GLLP	GLLP
Q5RKJ9	RAB10_ member RAS oncogene family OS=Rattus norvegicus GN=Rab10 PE=1 SV=1	GLLP	GLLP	GLLP
P70550	Ras-related protein Rab-8B OS=Rattus norvegicus GN=Rab8b PE=1 SV=1	GLLP	GLLP	GLLP
Q53B90	Ras-related protein Rab-43 OS=Rattus norvegicus GN=Rab43 PE=2 SV=1	GLLP	GLLP	GLLP
P15999	ATP synthase subunit alpha_ mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5a1 PE=1 SV=2	GLLP	GLLP	GLLP
Q9WVB1	Ras-related protein Rab-6A OS=Rattus norvegicus GN=Rab6a PE=1 SV=2	GLLP	GLLP	GLLP
Q6NYB7	Ras-related protein Rab-1A OS=Rattus norvegicus GN=Rab1A PE=1 SV=3	GLLP	GLLP	GLLP
F1LVC3	RAB6B_ member RAS oncogene family OS=Rattus norvegicus GN=Rab6b PE=4 SV=2	GLLP	GLLP	GLLP
P62260	14-3-3 protein epsilon OS=Rattus norvegicus GN=Ywhae PE=1 SV=1	GLLP	GLLP	GLLP
Q80VT8	S100 calcium-binding protein OS=Rattus norvegicus GN=S100vp PE=2 SV=1	GLLP	GLLP	GLLP
E9PU16	RAB1A_ member RAS oncogene family OS=Rattus norvegicus GN=Rab1a PE=1 SV=2	GLLP	GLLP	GLLP
G3V6H0	RAB1B_ member RAS oncogene family-like OS=Rattus norvegicus GN=LOC100363782 PE=4 SV=1	GLLP	GLLP	GLLP
F1LW77	RAB33B_ member RAS oncogene family OS=Rattus norvegicus GN=Rab33b PE=1 SV=2	GLLP	GLLP	GLLP
P51156	Ras-related protein Rab-26 OS=Rattus norvegicus GN=Rab26 PE=2 SV=2	GLLP	GLLP	GLLP
P51146	Ras-related protein Rab-4B OS=Rattus norvegicus GN=Rab4b PE=2 SV=1	GLLP	GLLP	GLLP
F1LP05	ATP synthase subunit alpha OS=Rattus norvegicus GN=Atp5a1 PE=1 SV=1	GLLP	GLLP	GLLP
A0A0H2UHP9	RCG39700_ isoform CRA_d OS=Rattus norvegicus GN=Rab6a PE=1 SV=1	GLLP	GLLP	GLLP
M0R3X6	Carbonyl reductase [NADPH] 1 OS=Rattus norvegicus GN=Cbr1 PE=1 SV=1	GLLP	GLLP	GLLP
Q63942	GTP-binding protein Rab-3D OS=Rattus norvegicus GN=Rab3d PE=1 SV=2	GLLP	GLLP	GLLP
Q63941	Ras-related protein Rab-3B OS=Rattus norvegicus GN=Rab3b PE=1 SV=2	GLLP	GLLP	GLLP
P61107	Ras-related protein Rab-14 OS=Rattus norvegicus GN=Rab14 PE=1 SV=3	GLLP	GLLP	GLLP
P10536	Ras-related protein Rab-1B OS=Rattus norvegicus GN=Rab1b PE=1 SV=1	GLLP	GLLP	GLLP
F1LWJ6	Myosin IIIB OS=Rattus norvegicus GN=Myo3b PE=4 SV=3	GLLP	GLLP	GLLP

P27139	Carbonic anhydrase 2 OS=Rattus norvegicus GN=Ca2 PE=1 SV=2	GLLP	GLLP	GLLP
Q5U316	Ras-related protein Rab-35 OS=Rattus norvegicus GN=Rab35 PE=1 SV=1	GLLP	GLLP	GLLP
A0A0G2K658	Carbonyl reductase [NADPH] 1 OS=Rattus norvegicus GN=LOC102556347 PE=1 SV=1	GLLP	GLLP	GLLP
A0A0G2JTT4	RAB30_ member RAS oncogene family OS=Rattus norvegicus GN=Rab30 PE=1 SV=1	GLLP	GLLP	GLLP
B0BMW0	RAB14_ member RAS oncogene family OS=Rattus norvegicus GN=Rab14 PE=1 SV=1	GLLP	GLLP	GLLP
M0R6X5	Histone H2A OS=Rattus norvegicus PE=3 SV=2	GLLP	GLLP	GLLP
A0A0G2K235	RAB1A_ member RAS oncogene family OS=Rattus norvegicus GN=Rab1a PE=1 SV=1	GLLP	GLLP	GLLP
A0A096MJ24	Carbonyl reductase [NADPH] 1 OS=Rattus norvegicus GN=Cbr1 PE=1 SV=1	GLLP	GLLP	GLLP
P35289	Ras-related protein Rab-15 OS=Rattus norvegicus GN=Rab15 PE=2 SV=1	GLLP	GLLP	GLLP
P35286	Ras-related protein Rab-13 OS=Rattus norvegicus GN=Rab13 PE=1 SV=2	GLLP	GLLP	GLLP
P35284	Ras-related protein Rab-12 OS=Rattus norvegicus GN=Rab12 PE=1 SV=2	GLLP	GLLP	GLLP
P35281	Ras-related protein Rab-10 OS=Rattus norvegicus GN=Rab10 PE=1 SV=1	GLLP	GLLP	GLLP
P35280	Ras-related protein Rab-8A OS=Rattus norvegicus GN=Rab8a PE=1 SV=2	GLLP	GLLP	GLLP
A0A0G2JT78	RAB6B_ member RAS oncogene family OS=Rattus norvegicus GN=Rab6b PE=4 SV=1	GLLP	GLLP	GLLP
D4A376	Ras-related protein Rab-12 OS=Rattus norvegicus GN=Rab12 PE=1 SV=3	GLLP	GLLP	GLLP
A0A0G2JSV2	Carbonyl reductase [NADPH] 1 OS=Rattus norvegicus GN=Cbr1 PE=1 SV=1	GLLP	GLLP	GLLP
B0BN47	Glutathione S-transferase OS=Rattus norvegicus GN=Gstm6 PE=1 SV=1	GLLP	GLLP	GLLP
P62824	Ras-related protein Rab-3C OS=Rattus norvegicus GN=Rab3c PE=1 SV=1	GLLP	GLLP	GLLP
A0A0G2K201	RAB42_ member RAS oncogene family OS=Rattus norvegicus GN=Rab42 PE=4 SV=1	GLLP	GLLP	GLLP
D3ZJT4	60S acidic ribosomal protein P0 OS=Rattus norvegicus GN=RGD1564469 PE=3 SV=3	GLLP	GLLP	GLLP
D4A0G7	RAB37_ member RAS oncogene family OS=Rattus norvegicus GN=Rab37 PE=4 SV=1	GLLP	GLLP	GLLP
A0A0G2K7Y9	Spermine-binding protein-like OS=Rattus norvegicus GN=Sbpl PE=4 SV=1	2,974274	1	Up
A0A0G2JSS8	Peroxiredoxin 5_ isoform CRA_c OS=Rattus norvegicus GN=Prdx5 PE=1 SV=1	1,29693	1	Up
P06761	78 kDa glucose-regulated protein OS=Rattus norvegicus GN=Hspa5 PE=1 SV=1	1,2586	1	Up
F1LNH4	Kallikrein 1-related peptidase C12 OS=Rattus norvegicus GN=Klk1c12 PE=3 SV=1	1,584074	1	Up
Q62669	Globin a1 OS=Rattus norvegicus GN=LOC103694855 PE=1 SV=1	6,753089	1	Up
Q4FZT6	Histone H2A type 3 OS=Rattus norvegicus PE=2 SV=3	1,197217	1	Up
Q00728	Histone H2A type 4 OS=Rattus norvegicus PE=2 SV=2	1,20925	1	Up
P09495	Tropomyosin alpha-4 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tpm4 PE=1 SV=3	1,491825	1	Up
Q6I8Q6	Histone H2A OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h2af PE=3 SV=1	1,197217	1	Up
A0A0G2JX00	Kallikrein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Klk1c9 PE=3 SV=1	1,537258	1	Up
M0RDZ8	Prostatic glandular kallikrein-6-like OS=Rattus norvegicus GN=LOC103690048 PE=3 SV=1	1,336427	1	Up
D3Z9U8	Similar to S100 calcium-binding protein_ ventral prostate OS=Rattus norvegicus GN=RGD1562234 PE=4 SV=1	1,284025	1	Up
Q923Z2	Tropomyosin 1_ alpha_ isoform CRA_a OS=Rattus norvegicus GN=Tpm1 PE=1 SV=1	1,462285	1	Up
D3ZVK7	Histone H2A OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h2ak PE=3 SV=1	1,20925	1	Up
A0A0G2JZ90	Spermine-binding protein-like OS=Rattus norvegicus GN=Sbpl PE=4 SV=1	2,94468	1	Up
A0A0G2K797	Kallikrein 1-related peptidase C6 OS=Rattus norvegicus GN=Klk1c6 PE=3 SV=1	1,584074	1	Up
P0CC09	Histone H2A type 2-A OS=Rattus norvegicus GN=Hist2h2aa3 PE=1 SV=1	1,197217	1	Up
A9UMV8	Histone H2A.J OS=Rattus norvegicus GN=H2afj PE=2 SV=1	1,20925	1	Up
P02781	Prostatic steroid-binding protein C2 OS=Rattus norvegicus GN=Psbpc2 PE=1 SV=1	1,161834	1	Up
P02780	Secretoglobulin family 2A member 2 OS=Rattus norvegicus GN=Scgb2a2 PE=1 SV=1	1,336427	1	Up
P08010	Glutathione S-transferase Mu 2 OS=Rattus norvegicus GN=Gstm2 PE=1 SV=2	1,934792	1	Up
P08009	Glutathione S-transferase Yb-3 OS=Rattus norvegicus GN=Gstm3 PE=1 SV=2	1,822119	1	Up
Q5BK56	Glutathione S-transferase OS=Rattus norvegicus GN=Gstm4 PE=1 SV=1	1,822119	1	Up

P22282	Cystatin-related protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Andpro PE=1 SV=1	2,013753	1	Up
Q63617	Hypoxia up-regulated protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Hyou1 PE=1 SV=1	15,79984	1	Up
Q63607	Alpha-tropomyosin 3 OS=Rattus norvegicus GN=Tpm1 PE=1 SV=1	1,506818	1	Up
Q9R063	Peroxiredoxin-5_ mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Prdx5 PE=1 SV=1	1,309964	1	Up
P08723	Prostatic spermine-binding protein OS=Rattus norvegicus GN=Sbp PE=1 SV=1	2,886371	1	Up
P07647	Submandibular glandular kallikrein-9 OS=Rattus norvegicus GN=Klk9 PE=1 SV=1	1,568312	1	Up
Q64598	Histone H2A type 1-F OS=Rattus norvegicus PE=3 SV=3	1,20925	1	Up
P11232	Thioredoxin OS=Rattus norvegicus GN=Txn PE=1 SV=2	1,877611	1	Up
A0A0G2JTW9	Hemoglobin_ beta adult major chain OS=Rattus norvegicus GN=Hbb-b1 PE=1 SV=1	6,553505	1	Up
D4ACV3	Histone H2A OS=Rattus norvegicus GN=Hist2h2ac PE=3 SV=2	1,197217	1	Up
P0C170	Histone H2A type 1-E OS=Rattus norvegicus PE=1 SV=2	1,20925	1	Up
P0C169	Histone H2A type 1-C OS=Rattus norvegicus PE=1 SV=2	1,20925	1	Up
W4VSR8	Kallikrein 1-related peptidase C6 OS=Rattus norvegicus GN=Klk1c6 PE=3 SV=2	1,584074	1	Up
A0A0G2K4C9	Prostatic spermine-binding protein OS=Rattus norvegicus GN=Sbp PE=4 SV=1	2,886371	1	Up
A0A0G2JTU6	Prostatic spermine-binding protein OS=Rattus norvegicus GN=Sbp PE=4 SV=1	2,91538	1	Up
P02262	Histone H2A type 1 OS=Rattus norvegicus PE=1 SV=2	1,185305	1	Up
P15399	Probasin OS=Rattus norvegicus GN=Pbsn PE=1 SV=1	4,854956	1	Up
M0RDM4	Histone H2A OS=Rattus norvegicus GN=LOC680322 PE=3 SV=1	1,197217	1	Up
P36376	Glandular kallikrein-12_ submandibular/renal OS=Rattus norvegicus GN=Klk12 PE=2 SV=1	1,599994	1	Up
P36375	Glandular kallikrein-10 OS=Rattus norvegicus GN=Klk10 PE=1 SV=2	1,584074	1	Up
P36374	Prostatic glandular kallikrein-6 OS=Rattus norvegicus GN=Klk6 PE=3 SV=1	1,390968	1	Up
P36373	Glandular kallikrein-7_ submandibular/renal OS=Rattus norvegicus GN=Klk7 PE=1 SV=1	1,462285	1	Up
P04692	Tropomyosin alpha-1 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tpm1 PE=1 SV=3	1,476981	1	Up
G3V9C0	Histone H2A OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h2ac PE=3 SV=1	1,185305	1	Up
A0A0G2K176	Prostatic spermine-binding protein OS=Rattus norvegicus GN=Sbp PE=4 SV=1	2,886371	1	Up
A0A0G2JSU6	Cystatin OS=Rattus norvegicus GN=Andpro PE=3 SV=1	4,572225	1	Up
G3V8H1	Kallikrein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Klk1 PE=3 SV=1	1,336427	1	Up
A0A0G2K4U2	Glutathione S-transferase Mu 2 OS=Rattus norvegicus GN=Gstm7 PE=1 SV=1	1,993716	1	Up
G3V8G8	Kallikrein 1-related peptidase C8 OS=Rattus norvegicus GN=Klk1c8 PE=3 SV=1	1,377128	1	Up
A0A0G2K6G1	Kallikrein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Klk1c9 PE=3 SV=1	1,476981	1	Up
M0RCL5	Histone H2A OS=Rattus norvegicus GN=LOC100910554 PE=1 SV=1	1,197217	1	Up
A0A0G2JSQ4	Tropomyosin 1_ alpha_ isoform CRA_p OS=Rattus norvegicus GN=Tpm1 PE=1 SV=1	1,476981	0,99	Up
Q91XN6	Tropomyosin 1_ alpha_ isoform CRA_h OS=Rattus norvegicus GN=Tpm1 PE=1 SV=1	1,537258	0,99	Up
P18418	Calreticulin OS=Rattus norvegicus GN=Calr PE=1 SV=1	1,233678	0,99	Up
Q63610	Tropomyosin alpha-3 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tpm3 PE=1 SV=2	1,462285	0,99	Up
A0A0G2JSZ5	Protein disulfide-isomerase A6 OS=Rattus norvegicus GN=Pdia6 PE=1 SV=1	1,161834	0,99	Up
A0A0G2K7F7	Tropomyosin alpha-1 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tpm1 PE=1 SV=1	1,476981	0,99	Up
A0A0G2JX64	Tropomyosin 1_ alpha_ isoform CRA_i OS=Rattus norvegicus GN=Tpm1 PE=1 SV=1	1,491825	0,99	Up
A0A0G2K2G8	Tropomyosin alpha-4 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tpm4 PE=1 SV=1	1,491825	0,99	Up
E9PTV9	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=RGD1562758 PE=1 SV=2	1,698932	0,98	Up
A0A0G2JZ09	Glutathione S-transferase_ mu 6-like OS=Rattus norvegicus GN=Gstm6l PE=1 SV=1	1,284025	0,98	Up
Q63081	Protein disulfide-isomerase A6 OS=Rattus norvegicus GN=Pdia6 PE=1 SV=2	1,138828	0,98	Up
F1LUV3	Similar to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=LOC291543 PE=1 SV=3	1,506818	0,98	Up

P58775	Tropomyosin beta chain OS=Rattus norvegicus GN=Tpm2 PE=1 SV=1	1,476981	0,98	Up
A0A0G2K6L4	Glutathione S-transferase_ mu 6 (Predicted)_ isoform CRA_a OS=Rattus norvegicus GN=Gstm6l PE=1 SV=1	1,29693	0,97	Up
P04636	Malate dehydrogenase_ mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Mdh2 PE=1 SV=2	1,377128	0,96	Up
P04785	Protein disulfide-isomerase OS=Rattus norvegicus GN=P4hb PE=1 SV=2	1,185305	0,96	Up
D3ZVQ8	Glutathione S-transferase_ mu 6-like OS=Rattus norvegicus GN=Gstm6 PE=4 SV=3	1,2586	0,95	Up
A0A140TAF0	RCG62531_ isoform CRA_g OS=Rattus norvegicus GN=Tpm3 PE=1 SV=1	1,390968	0,94	
P53534	Glycogen phosphorylase_ brain form (Fragment) OS=Rattus norvegicus GN=Pygb PE=1 SV=3	1,030455	0,93	
Q66HD0	Endoplasmic reticulum chaperone protein OS=Rattus norvegicus GN=Hsp90b1 PE=1 SV=2	1,271249	0,92	
M0R757	Elongation factor 1-alpha OS=Rattus norvegicus GN=LOC100360413 PE=3 SV=1	1,127497	0,91	
P62630	Elongation factor 1-alpha 1 OS=Rattus norvegicus GN=Eef1a1 PE=2 SV=1	1,127497	0,9	
Q9Z1B2	Glutathione S-transferase Mu 5 OS=Rattus norvegicus GN=Gstm5 PE=1 SV=3	1,284025	0,89	
A0A0A0MY09	Endoplasmic reticulum chaperone protein OS=Rattus norvegicus GN=Hsp90b1 PE=1 SV=1	1,185305	0,89	
P34058	Heat shock protein HSP 90-beta OS=Rattus norvegicus GN=Hsp90ab1 PE=1 SV=4	1,094174	0,87	
F1LXL7	Glutathione S-transferase_ mu 6-like OS=Rattus norvegicus GN=Gstm6l PE=4 SV=3	1,271249	0,87	
P62632	Elongation factor 1-alpha 2 OS=Rattus norvegicus GN=Eef1a2 PE=1 SV=1	1,116278	0,86	
G3V8R3	Globin e1 OS=Rattus norvegicus GN=Hbz PE=3 SV=1	1,246077	0,85	
G3V6Y6	Alpha-1_4 glucan phosphorylase OS=Rattus norvegicus GN=Pygb PE=1 SV=2	1,020201	0,85	
A0A0G2K4I4	Endoplasmic reticulum chaperone protein OS=Rattus norvegicus GN=Hsp90b1 PE=1 SV=1	1,150274	0,82	
Q63910	Alpha globin OS=Rattus norvegicus GN=Hba-a3 PE=1 SV=2	1,185305	0,8	
B1WC26	N-acetylneuraminic acid synthase OS=Rattus norvegicus GN=Nans PE=1 SV=1	1,083287	0,79	
A0A0G2JXJ9	Keratin_ type I cytoskeletal 14 OS=Rattus norvegicus GN=Krt14 PE=1 SV=1	1,271249	0,79	
F1M927	Ribosomal protein S27a_ pseudogene 5 OS=Rattus norvegicus GN=Rps27a-ps5 PE=4 SV=2	1,105171	0,78	
P82995	Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Rattus norvegicus GN=Hsp90aa1 PE=1 SV=3	1,083287	0,76	
P09811	Glycogen phosphorylase_ liver form OS=Rattus norvegicus GN=Pygl PE=1 SV=5	1,01005	0,68	
P0DMW0	Heat shock 70 kDa protein 1A OS=Rattus norvegicus GN=Hspa1a PE=2 SV=1	1,040811	0,66	
P0DMW1	Heat shock 70 kDa protein 1B OS=Rattus norvegicus GN=Hspa1b PE=2 SV=1	1,030455	0,64	
P62963	Profilin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Pfn1 PE=1 SV=2	1,051271	0,63	
Q00729	Histone H2B type 1-A OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h2ba PE=1 SV=2	0,951229	0,62	
P62738	Actin_ aortic smooth muscle OS=Rattus norvegicus GN=Acta2 PE=2 SV=1	1	0,58	
P68136	Actin_ alpha skeletal muscle OS=Rattus norvegicus GN=Acta1 PE=1 SV=1	1,01005	0,58	
P55063	Heat shock 70 kDa protein 1-like OS=Rattus norvegicus GN=Hspa1l PE=2 SV=2	1,020201	0,57	
D3ZXP3	Histone H2A OS=Rattus norvegicus GN=H2afx PE=1 SV=1	1,01005	0,57	
G3V6D3	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=1 SV=1	1,040811	0,57	
P68035	Actin_ alpha cardiac muscle 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actc1 PE=2 SV=1	1	0,57	
Q5XHZ0	Heat shock protein 75 kDa_ mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Trap1 PE=1 SV=1	1,020201	0,56	
D3ZYM6	Calreticulin 4 OS=Rattus norvegicus GN=Calr4 PE=1 SV=2	1,051271	0,56	
F1M5A1	Calreticulin 4 OS=Rattus norvegicus GN=Calr4 PE=1 SV=2	1,051271	0,55	
P63018	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Rattus norvegicus GN=Hspa8 PE=1 SV=1	1,01005	0,53	
Q5BKC3	Park7 protein OS=Rattus norvegicus GN=Park7 PE=1 SV=1	1	0,52	
P09812	Glycogen phosphorylase_ muscle form OS=Rattus norvegicus GN=Pygm PE=1 SV=5	1	0,51	
M0R8M9	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Rattus norvegicus GN=Hspa8 PE=3 SV=2	1	0,5	
O88767	Protein DJ-1 OS=Rattus norvegicus GN=Park7 PE=1 SV=1	1,020201	0,5	
P10719	ATP synthase subunit beta_ mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=1 SV=2	0,980199	0,49	

P0C0S7	Histone H2A.Z OS=Rattus norvegicus GN=H2afz PE=1 SV=2	0,99005	0,48	
D4AEC0	Histone H2A OS=Rattus norvegicus GN=H2afv PE=3 SV=1	0,99005	0,47	
A0A0A0MXW3	Histone H2A OS=Rattus norvegicus GN=H2afz PE=3 SV=1	0,99005	0,46	
P63269	Actin_ gamma-enteric smooth muscle OS=Rattus norvegicus GN=Actg2 PE=2 SV=1	1	0,46	
D3ZWE0	Histone H2A OS=Rattus norvegicus GN=Hist2h2ab PE=3 SV=1	0,99005	0,42	
A0A0G2K793	Heat shock protein HSP 90-beta OS=Rattus norvegicus GN=Hsp90ab1 PE=1 SV=1	0,980199	0,41	
A0A0G2K4M6	Actin_ aortic smooth muscle OS=Rattus norvegicus GN=Acta2 PE=3 SV=1	1	0,4	
G3V8V3	Alpha-1_4 glucan phosphorylase OS=Rattus norvegicus GN=Pygm PE=1 SV=1	1	0,39	
Q63279	Keratin_ type I cytoskeletal 19 OS=Rattus norvegicus GN=Krt19 PE=1 SV=2	0,923116	0,38	
P20059	Hemopexin OS=Rattus norvegicus GN=Hpx PE=1 SV=3	0,960789	0,37	
P19944	60S acidic ribosomal protein P1 OS=Rattus norvegicus GN=Rplp1 PE=3 SV=1	0,941765	0,3	
D3ZGY4	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh-ps2 PE=1 SV=1	0,88692	0,27	
Q9ESV6	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase_ testis-specific OS=Rattus norvegicus GN=Gapdhs PE=1 SV=1	0,860708	0,19	
Q6P136	Hyou1 protein OS=Rattus norvegicus GN=Hyou1 PE=1 SV=1	0,748264	0,18	
F1LU69	Ubiquitin B pseudogene 4 OS=Rattus norvegicus GN=Ubbp4 PE=4 SV=3	0,941765	0,18	
Q63429	Polyubiquitin-C OS=Rattus norvegicus GN=Ubc PE=1 SV=1	0,951229	0,17	
P62986	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40 OS=Rattus norvegicus GN=Uba52 PE=1 SV=2	0,941765	0,16	
B1WBQ8	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdhs PE=1 SV=1	0,843665	0,15	
A0A0H2UHR8	Prostatic steroid-binding protein C2 OS=Rattus norvegicus GN=Psbpc2 PE=4 SV=1	0,970446	0,15	
F1LZI1	Similar to heat shock protein 8 OS=Rattus norvegicus GN=LOC680121 PE=3 SV=2	0,802519	0,15	
B5DEI2	Amine oxidase OS=Rattus norvegicus GN=Lao1 PE=2 SV=1	0,491644	0,14	
P62982	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a OS=Rattus norvegicus GN=Rps27a PE=1 SV=2	0,932394	0,14	
E9PTN6	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus PE=3 SV=1	0,83527	0,14	
M0R590	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=LOC108351137 PE=3 SV=1	0,843665	0,13	
F1LML2	Polyubiquitin-C OS=Rattus norvegicus GN=Ubc PE=4 SV=1	0,932394	0,12	
P04764	Alpha-enolase OS=Rattus norvegicus GN=Eno1 PE=1 SV=4	0,88692	0,11	
P0CG51	Polyubiquitin-B OS=Rattus norvegicus GN=Ubb PE=1 SV=1	0,932394	0,1	
P14659	Heat shock-related 70 kDa protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Hspa2 PE=1 SV=2	0,895834	0,09	
P46462	Transitional endoplasmic reticulum ATPase OS=Rattus norvegicus GN=Vcp PE=1 SV=3	0,895834	0,08	
G3V9C7	Histone H2B OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h2bk PE=3 SV=1	0,763379	0,08	
P20761	Ig gamma-2B chain C region OS=Rattus norvegicus GN=Igh-1a PE=1 SV=1	0,571209	0,07	
A0A0G2JUT0	Heat shock-related 70 kDa protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Hspa2 PE=1 SV=1	0,88692	0,06	
M0R660	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus PE=1 SV=1	0,771052	0,05	Down
P04797	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3	0,794534	0,05	Down
Q00715	Histone H2B type 1 OS=Rattus norvegicus PE=1 SV=2	0,726149	0,04	Down
D4A4S3	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Rattus norvegicus GN=Hspa8 PE=3 SV=3	0,895834	0,04	Down
P12346	Serotransferrin OS=Rattus norvegicus GN=Tf PE=1 SV=3	0,895834	0,03	Down
A0A0G2QC06	Serotransferrin OS=Rattus norvegicus GN=Tf PE=1 SV=1	0,895834	0,03	Down
A0A0G2QC50	CD55 molecule_ decay accelerating factor for complement OS=Rattus norvegicus GN=Cd55 PE=1 SV=1	0,802519	0,02	Down
P60711	Actin_ cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1	0,951229	0,02	Down
D3ZRN3	Actin_ beta-like 2 OS=Rattus norvegicus GN=Actbl2 PE=1 SV=1	0,913931	0,01	Down
P01026	Complement C3 OS=Rattus norvegicus GN=C3 PE=1 SV=3	0,582748	0,01	Down

P63259	Actin_ cytoplasmic 2 OS=Rattus norvegicus GN=Actg1 PE=1 SV=1	0,951229	0,01	Down
D3ZNZ9	Histone H2B OS=Rattus norvegicus GN=Hist3h2ba PE=3 SV=1	0,718924	0,01	Down
Q6IE52	Murinoglobulin-2 OS=Rattus norvegicus GN=Mug2 PE=1 SV=1	0,486752	0	Down
M0RBQ5	Histone H2B OS=Rattus norvegicus GN=Hist3h2bb PE=3 SV=1	0,71177	0	Down
P02091	Hemoglobin subunit beta-1 OS=Rattus norvegicus GN=Hbb PE=1 SV=3	0,895834	0	Down
A0A0G2K926	Alpha-1-inhibitor III OS=Rattus norvegicus GN=LOC297568 PE=1 SV=1	0,40657	0	Down
A0A0G2K2E4	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Rattus norvegicus GN=LOC100911252 PE=3 SV=1	0,559898	0	Down
M0R5V7	Murinoglobulin-2 OS=Rattus norvegicus GN=Mug2 PE=1 SV=2	0,472367	0	Down
A0A0G2JXI9	Histone H2B OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h2bo PE=3 SV=1	0,718924	0	Down
G3V8B3	Histone H2B OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h2bq PE=3 SV=1	0,71177	0	Down
F1LPQ6	Immunoglobulin heavy constant mu OS=Rattus norvegicus GN=Ighm PE=4 SV=2	0,332871	0	Down
D3ZLY9	Histone H2B OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h2bh PE=3 SV=2	0,71177	0	Down
Q5BJY9	Keratin_ type I cytoskeletal 18 OS=Rattus norvegicus GN=Krt18 PE=1 SV=3	0,718924	0	Down
A0A0G2JXE0	Histone H2B OS=Rattus norvegicus GN=LOC102549061 PE=3 SV=1	0,718924	0	Down
A0A0G2JWK7	Transgelin OS=Rattus norvegicus GN=Tagln PE=1 SV=1	0,718924	0	Down
P02782	Prostatic steroid-binding protein C1 OS=Rattus norvegicus GN=Psbpc1 PE=1 SV=1	0,496585	0	Down
A0A0G2JUW7	Alpha-1-inhibitor III OS=Rattus norvegicus GN=Mug1 PE=1 SV=1	0,472367	0	Down
P02770	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2	0,71177	0	Down
P05964	Protein S100-A6 OS=Rattus norvegicus GN=S100a6 PE=1 SV=3	0,740818	0	Down
P02769	Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4	0,398519	0	Down
B2GV72	Carbonyl reductase 3 OS=Rattus norvegicus GN=Cbr3 PE=1 SV=1	0,860708	0	Down
D3ZNH4	Histone H2B OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h2bo PE=3 SV=1	0,71177	0	Down
P31232	Transgelin OS=Rattus norvegicus GN=Tagln PE=1 SV=2	0,71177	0	Down
D4AA52	Alpha-1-inhibitor III OS=Rattus norvegicus GN=Mug1 PE=1 SV=3	0,410656	0	Down
A0A0G2JSH5	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=1	0,733447	0	Down
P22283	Cystatin-related protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Crp2 PE=2 SV=1	0,554327	0	Down
F1M6C2	Elongation factor 1-alpha 1 pseudogene OS=Rattus norvegicus GN=LOC103691939 PE=1 SV=1	0,402524	0	Down
P14046	Alpha-1-inhibitor 3 OS=Rattus norvegicus GN=A1i3 PE=1 SV=1	0,427415	0	Down
A0A0G2K9Y0	Immunoglobulin heavy constant mu OS=Rattus norvegicus GN=Ighm PE=4 SV=1	0,319819	0	Down
R4GNK3	Thioredoxin OS=Rattus norvegicus GN=Txn1 PE=1 SV=1	0,625002	0	Down
P11598	Protein disulfide-isomerase A3 OS=Rattus norvegicus GN=Pdia3 PE=1 SV=2	0,88692	0	Down
D4A6E3	Alpha-1-inhibitor III OS=Rattus norvegicus GN=Mug1 PE=1 SV=2	0,472367	0	Down
A0A0G2K3K2	Actin_ cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1	0,951229	0	Down
G3V9J1	Alpha-1-inhibitor III OS=Rattus norvegicus GN=LOC297568 PE=1 SV=3	0,516851	0	Down
A0A0G2JUP5	Alpha-1-inhibitor III OS=Rattus norvegicus GN=Mug1 PE=1 SV=1	0,496585	0	Down
A0A0H2UHM5	Protein disulfide-isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Pdia3 PE=1 SV=1	0,895834	0	Down
Z4YNX7	Cystatin OS=Rattus norvegicus GN=P22k15 PE=3 SV=2	0,554327	0	Down
P10111	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Rattus norvegicus GN=Ppia PE=1 SV=2	0,559898	0	Down
F1LN61	Immunoglobulin heavy constant mu OS=Rattus norvegicus GN=Ighm PE=4 SV=3	0,310367	0	Down
M0R4L7	Histone H2B OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h2bl PE=3 SV=1	0,71177	0	Down
P01946	Hemoglobin subunit alpha-1/2 OS=Rattus norvegicus GN=Hba1 PE=1 SV=3	0,778801	0	Down
Q03626	Murinoglobulin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Mug1 PE=2 SV=1	0,477114	0	Down
A0A0G2JSW3	Globin a4 OS=Rattus norvegicus GN=Hbb PE=1 SV=1	0,88692	0	Down
Q63041	Alpha-1-macroglobulin OS=Rattus norvegicus GN=A1m PE=1 SV=1	0,612626	0	Down

D4A817	Histone H2B OS=Rattus norvegicus GN=Hist2h2be PE=3 SV=3	0,718924	0	Down
P11517	Hemoglobin subunit beta-2 OS=Rattus norvegicus PE=1 SV=2	0,826959	0	Down
A0A0G2JSV6	Globin c2 OS=Rattus norvegicus GN=Hba-a2 PE=1 SV=1	0,794534	0	Down
A0A0G2K1P0	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Ppia PE=1 SV=1	0,554327	0	Down
Q10758	Keratin_ type II cytoskeletal 8 OS=Rattus norvegicus GN=Krt8 PE=1 SV=3	0,802519	0	Down
D3ZWM5	Histone H2B OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h2bd PE=3 SV=2	0,726149	0	Down
P20760	Ig gamma-2A chain C region OS=Rattus norvegicus GN=Igg-2a PE=1 SV=1	0,600496	0	Down
P20759	Ig gamma-1 chain C region OS=Rattus norvegicus PE=1 SV=1	0,336216	0	Down
O88752	Epsilon 1 globin OS=Rattus norvegicus GN=Hbe1 PE=1 SV=1	0,83527	0	Down

5. Referencias.

ABD ELMAGEED, Z. Y. et al. Neoplastic Reprogramming of Patient-Derived Adipose Stem Cells by Prostate Cancer Cell-Associated Exosomes. **STEM CELLS**, v. 32, n. 4, p. 983–997, abr. 2014.

AUMÜLLER, G.; SEITZ, J. Protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands. **International review of cytology**, v. 121, p. 127–231, 1990.

BAO, Z.-S. et al. Prognostic Value of a Nine-Gene Signature in Glioma Patients Based on mRNA Expression Profiling. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 20, n. 2, p. 112–118, fev. 2014.

BARKER, D. J. P. et al. WEIGHT IN INFANCY AND DEATH FROM ISCHAEMIC HEART DISEASE. **The Lancet**, v. 334, n. 8663, p. 577–580, 9 set. 1989.

BILEN, M. A. et al. Proteomics Profiling of Exosomes from Primary Mouse Osteoblasts under Proliferation versus Mineralization Conditions and Characterization of Their Uptake into Prostate Cancer Cells. **Journal of Proteome Research**, v. 16, n. 8, p. 2709–2728, 4 ago. 2017.

BOSLAND, M. C. The role of steroid hormones in prostate carcinogenesis. **Journal of the National Cancer Institute. Monographs**, n. 27, p. 39–66, 2000.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

CAMARGO, A. C. L. L. et al. Streptozotocin-Induced Maternal Hyperglycemia Increases the Expression of Antioxidant Enzymes and Mast Cell Number in Offspring Rat Ventral Prostate. v. 300, n. 2, p. 291–299, fev. 2017.

CASTELLANO, E.; DOWNWARD, J. RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. **Genes & cancer**, v. 2, n. 3, p. 261–74, mar. 2011.

CEZAR DE OLIVEIRA, J. et al. Protein-restriction During the Last Third of Pregnancy Malprograms the Neuroendocrine Axes to Induce Metabolic Syndrome in Adult Male Rat Offspring. **Endocrinology**, p. en20151883, 2016.

COLOMBELLI, K. T. et al. Impairment of microvascular angiogenesis is associated with delay in prostatic development in rat offspring of maternal protein malnutrition. **General**

and Comparative Endocrinology, v. 246, p. 258–269, 15 maio 2017.

CUNHA, G. R. Mesenchymal-epithelial interactions during androgen-induced development of the prostate. **Progress in clinical and biological research**, v. 171, p. 15–24, 1985.

DOMONKOS, E. et al. Sex differences and sex hormones in anxiety-like behavior of aging rats. **Hormones and Behavior**, v. 93, p. 159–165, 1 jul. 2017.

FERNÁNDEZ-MEDARDE, A.; SANTOS, E. Ras in cancer and developmental diseases. **Genes & cancer**, v. 2, n. 3, p. 344–58, mar. 2011.

FUJIMOTO, N. et al. Identification of rat prostatic secreted proteins using mass spectrometric analysis and androgen-dependent mRNA expression. **Journal of andrology**, v. 30, n. 6, p. 669–78, 2009.

GRABOWSKA, M. M. et al. Mouse models of prostate cancer: picking the best model for the question. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 33, n. 2–3, p. 377–397, 23 set. 2014.

HÄRKÖNEN, P. L.; MÄKELÄ, S. I. Role of estrogens in development of prostate cancer. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 92, n. 4, p. 297–305, nov. 2004.

IHNATOVYCH, I.; SIELSKI, N. L.; HOFMANN, W. A. Selective Expression of Myosin IC Isoform A in Mouse and Human Cell Lines and Mouse Prostate Cancer Tissues. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e108609, 26 set. 2014.

MACCIONI, M.; CABEZAS, L. E.; RIVERO, V. E. Effect of prostatein, the major protein produced by the rat ventral prostate, on phagocytic cell functions. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 50, n. 6, p. 473–480, dez. 2003.

MARKER, P. C. et al. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. **Developmental biology**, v. 253, n. 2, p. 165–74, 15 jan. 2003.

MERICQ, V. et al. Long-term metabolic risk among children born premature or small for gestational age. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 50–62, 19 ago. 2016.

NAKAZAWA, M. et al. Spontaneous neoplastic lesions in aged Sprague-Dawley rats. **Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science**, v. 50, n. 2, p. 99–103, abr. 2001.

NAN, X. et al. Ras-GTP dimers activate the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 26, p. 7996–8001, 30 jun. 2015.

OZANNE, S. E.; HALES, C. N.; HALES, P. C. N. The long-term consequences of intra-uterine protein malnutrition for glucose metabolism. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 58, p. 615–619, 1999.

PETRY, C. J. et al. Diabetes in old male offspring of rat dams fed a reduced protein diet. **International journal of experimental diabetes research**, v. 2, n. 2, p. 139–43, 2001.

PINHO, C. F. et al. Gestational protein restriction delays prostate morphogenesis in male rats. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 7, ago. 2014.

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**, v. 123, n. 11, p. 1939–1951, nov. 1993.

RINALDI, J. C. et al. Implications of intrauterine protein malnutrition on prostate growth, maturation and aging. **Life Sciences**, v. 92, n. 13, p. 763–774, 19 abr. 2013.

SANTOS et al. Maternal low protein diet impairs prostate growth and induces prostate carcinogenesis in aged offspring rats (dados ainda não publicados).

SENE, L. D. B. et al. Involvement of renal corpuscle microRNA expression on epithelial-to-mesenchymal transition in maternal low protein diet in adult programmed rats. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e71310, 2013.

THOMAS, J. D. et al. Rab1A Is an mTORC1 Activator and a Colorectal Oncogene. **Cancer Cell**, v. 26, n. 5, p. 754–769, 10 nov. 2014.

TIMMS, B. G.; MOHS, T. J.; DIDIO, L. J. Ductal budding and branching patterns in the developing prostate. **The Journal of urology**, v. 151, n. 5, p. 1427–32, 1994.

WANG, Z. et al. Loss of ATF3 promotes Akt activation and prostate cancer development in a Pten knockout mouse model. **Oncogene**, v. 34, n. 38, p. 4975–4984, 22 set. 2015.

WELSH, M. et al. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1479–1490, 1 abr. 2008.

XU, B.-H. et al. Aberrant amino acid signaling promotes growth and metastasis of hepatocellular carcinomas through Rab1A-dependent activation of mTORC1 by Rab1A. **Oncotarget**, v. 6, n. 25, p. 20813–28, 28 ago. 2015.

ZHANG, J. et al. Mouse Prostate Proteomes Are Differentially Altered by Supranutritional Intake of Four Selenium Compounds. **Nutrition and Cancer**, v. 63, n. 5, p. 778–789, jul. 2011.