



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Instituto de Biologia

Willian Goulart Salgueiro

HERANÇA INTERGERACIONAL INDUZIDA POR COLESTEROL SOB O  
DESENVOLVIMENTO DE *C. elegans* É MEDIADA POR VITELOGENINA E miRNAs

CAMPINAS

2020

**WILLIAN GOULART SALGUEIRO**

**HERANÇA INTERGERACIONAL INDUZIDA POR COLESTEROL SOB O  
DESENVOLVIMENTO DE *C. elegans* É MEDIADA POR VITELAGENINA E  
miRNAS**

*Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia  
da Universidade Estadual de Campinas como parte dos  
requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre  
em Genética e Biologia molecular, na área de Genética  
Animal e Evolução.*

Orientador: Prof. Dr. *MARCELO ALVES DA SILVA MORI*

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL  
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO  
WILLIAN GOULART SALGUEIRO E ORIENTADA PELO  
PROF. DR. MARCELO ALVES DA SILVA MORI

**CAMPINAS**

**2020**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Sa32h Salgueiro, Willian Goulart, 1993-  
A herança intergeracional induzida por altos níveis de colesterol em *C. elegans* é devido à vitelogenina e controlada por miRNAs / Willian Goulart Salgueiro. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Marcelo Alves da Silva Mori.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Colesterol. 2. Vitelogeninas. 3. *Caenorhabditis elegans*. 4. MicroRNAs. 5. Relação entre gerações. I. Mori, Marcelo Alves, 1980-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Intergenerational inheritance induced by high levels of cholesterol in *C. elegans* is due to vitellogenin and controlled by miRNAs

**Palavras-chave em inglês:**

Cholesterol

Vitellogenins

*Caenorhabditis elegans*

MicroRNAs

Intergenerational relations

**Área de concentração:** Genética Animal e Evolução

**Titulação:** Mestre em Genética e Biologia Molecular

**Banca examinadora:**

Marcelo Alves da Silva Mori [Orientador]

Daiana Silva de Ávila

Fabio Papes

**Data de defesa:** 28-08-2020

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-5283-634X>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/0039555088895717>

Campinas, 28/08/2020.

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

Profa. Dra. Daiana Silva Avila

Prof. Dr. Fabio Papes

Prof. Dr. Marcelo Alves da Silva Mori

*Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.*

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Unidade Instituto de Biologia.

Dedico essa dissertação aos meus pais,  
os quais me agraciaram com sorte já ao nascer.

Esse (não tão) pequeno punhado de palavras  
e imagens é mais um pequeno passo na jornada  
de um homem que foi ensinado em casa a  
compreender, ser grato e fazer bom uso dos  
privilégios que lhe foram dados.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, há de se agradecer às agências de financiamento e à universidade pública, sem as quais não haveria ciência em nosso país. Fapesp (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), a melhor e mais bem estruturada agência de financiamento público à pesquisa no Brasil, a qual financiou totalmente meu curso de mestrado através de uma bolsa no país (2017/22057-5), além de ter me dado a chance de fazer parte deste curso no exterior (2019/14391-8). Unicamp, uma das melhores universidades do país, pela excelente estrutura e pessoal, exemplo de excelência e também de “personalidade”. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil(CAPES) - Código de Financiamento 001.

Tão importante quanto, ao meu orientador. O Prof. Marcelo Mori é um verdadeiro cientista. Empolgado por tudo que envolva a vida e seus aspectos naturais. Literalmente respira ciência. Foi reconfortante poder trabalhar com alguém que se interessa legitimamente por aquilo com o que trabalha 40h por semana (ou seriam 80h?). Além de me orientar, abriu meus horizontes sobre o que é fazer ciência.

Ainda, há que se fazer menção à profissional que conduz o laboratório como se fosse seu filho, Elzira. Exemplo de dedicação inigualável, o LaBE seria muito menos sem a sua inestimável contribuição.

Aos meus colegas. Me emociono ao escrever, nenhum indício melhor para demonstrar meu afeto pelas pessoas que conheci aqui. Jornadas começam e se encerram, pessoas podem permanecer. Espero poder levar esse pedaço de Campinas comigo aonde quer que eu vá.

Finalmente, aos meus pais, pois além de jamais me deixarem desamparado, também me mostraram que aplausos quase nunca são certos (ou merecidos) e que há sempre muito mais a ser feito.

## RESUMO

O colesterol é essencial para diversos processos fisiológicos, principalmente por sua função estrutural e como precursor de uma ampla gama de sinalizadores endócrinos. No entanto, o consumo excessivo de uma dieta ocidental, a qual é rica em colesterol, pode levar à obesidade diferentes dislipidemias, o que resulta em um risco elevado para doenças metabólicas e cardiovasculares. Além disso, há um crescente montante de evidências sugerindo que pais com distúrbios metabólicos, incluindo aqueles que envolvem um excesso de colesterol, podem gerar descendentes com alterações provenientes de tais doenças, mesmo que estes nunca tenham tido contato com os fatores causais destas. Tal possibilidade é preocupante, pois propiciaria a perpetuação de efeitos possivelmente deletérios por gerações através de mecanismos epigenéticos. Visto que a pesquisa básica nessa área pode ser limitada pelo custo e tempo envolvidos com o uso de mamíferos e seus longos tempos de geração, o nematoide *C. elegans* surge como uma alternativa viável. Esse invertebrado não sintetiza colesterol e por isso seus níveis podem ser controlados essencialmente pela oferta dietética. Além disso, possui ortologia suficiente com mamíferos para que se formulem hipóteses por vezes extrapoláveis para organismos mais complexos. Ainda, pelo curto tempo de vida e geração, *C. elegans* são ideais para a condução de estudos que envolvam várias gerações. Aqui nós mostramos que *C. elegans* expostos a uma concentração alta de colesterol (50  $\mu$ M; 20  $\mu$ g/mL) em P0 apresentam diversos fenótipos alterados e herdáveis pela geração F1. O fenótipo de desenvolvimento acelerado é devido à maior expressão de vitelogenina, sobretudo de *vit-2*/YP170B. Nossos dados sugerem que miRNAs regulam positivamente a expressão de *vit-2* em P0 e F1, o que é suficiente para fenocopiar a exposição aos altos níveis de colesterol. Nós sugerimos que miRNAs da família dos *let-7* (*let-7-fam*) regulam a expressão de *vit-2*/YP170B, provavelmente de forma indireta, ocasionando uma maior oferta de vitelo para a progênie, onde possivelmente algum elemento carregado por este complexo reinicia o ciclo de expressão do mesmo fenótipo, incluindo expressão de miRNAs *let-7-fam* e *vit-2*/YP170B. Nossos resultados apontam para uma relação ainda não demonstrada entre uma maior oferta de colesterol e a regulação da expressão de vitelogenina por miRNAs de maneira intergeracional.

## ABSTRACT

Cholesterol is essential to many physiological processes, mainly for its structural function and as a precursor for a number of endocrine signaling molecules. However, its excessive intake in a western diet may lead to obesity and to different dyslipidemia, what might be translated into an increased risk for metabolic and cardiovascular diseases. Beyond that, there is a number of evidences showing that parents with metabolic diseases, including those associated with high cholesterol, may give birth to an offspring that has metabolic alterations even though it never got in contact with any of their causing factors. Such possibility is alarming, once it might allow the perpetration of those possibly deleterious disturbances through epigenetic mechanisms. Basic research in this field could be limited by costs and time needed for mammals to give birth to a new generation. Hence, the nematode *C. elegans* is a viable alternative. This invertebrate does not synthesize cholesterol, and, because of that, cholesterol levels can be tightly controlled through the diet. Besides that, *C. elegans* genes are highly conserved in mammals so that hypotheses confirmed in the worm can be extended and applied to more complex organisms. Even more, for its short generational time, *C. elegans* are ideal for conducting research that include multiple generations. Here we show that *C. elegans* exposed to a high concentration of cholesterol (50  $\mu$ M; 20  $\mu$ g/mL) in P0 results in many several phenotypes that are inheritable by F1. Accelerated developmental timing due to high cholesterol seems to be due to a higher expression of vitellogenin, mainly *vit-2*/YP170B. Our data suggest that miRNAs positively regulate *vit-2*/YP170B expression in P0 and F1, what is sufficient to phenocopy high cholesterol exposure. We suggest that miRNA of the *let-7* family (*let-7-fam*) regulate the expression of *vit-2*/YP170B, most likely in an indirect manner, providing a larger supply of yolk to the progeny, where an element is likely carried through the yolk complex to restart the cycle of expression of the same phenotype in the next generation, including upregulation of *let-7-fam* miRNAs and *vit-2*/YP170B. Our data points to a yet not established link between high cholesterol supply and the upregulation of vitellogenin expression by miRNAs.



## SUMÁRIO

1. Introdução.....	10
1.1. Doenças associadas à dieta rica em colesterol.....	10
1.2. Colesterol e vitelo em <i>C. elegans</i> .....	11
1.3. Efeitos trans e intergeracionais induzidos por dieta.....	12
2. Hipótese inicial.....	15
3. Objetivos.....	16
4. Materiais e métodos.....	17
5. Resultados e discussão.....	22
5.1. Figura 1.....	23
5.2. Figura 2.....	25
5.3. Figura 3.....	30
5.4. Figura 4.....	31
5.5. Figura 5.....	34
5.6. Figura 6.....	37
6. Conclusões e hipótese atual.....	36
7. Perspectivas futuras.....	37
8. Referências.....	38
9. Anexos.....	46
9.1. Biossegurança.....	47
9.2. Direitos autorais.....	57

## 1. Introdução

### 1.1. Doenças associadas à dieta rica em colesterol

O colesterol (dodecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ol) é essencial para uma grande variedade de processos celulares, incluindo sinalização hormonal e metabolismo de ácidos graxos, além de participar da composição das membranas biológicas, sendo que a desregulação de seu metabolismo pode ter sérias implicações no desenvolvimento embrionário e na etiologia de doenças (1,2). A importância desse esteroide vem da sua necessidade na produção de uma ampla gama de sinalizadores endócrinos lipofílicos, além do neurotransmissor serotonina e da vitamina D, todos essenciais na fisiologia animal, incluindo a humana (3).

A dieta hiperlipídica é fator de risco para diversas doenças, tais como diabetes, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, além de uma série de dislipidemias, reduzindo a expectativa de vida de humanos e também de diferentes modelos experimentais (1,4). Não por acaso, parte dessas patologias também estão associadas ao envelhecimento. Sabe-se que parte dos efeitos benéficos da restrição calórica, intervenção que estende a longevidade de diversos organismos, está ligada à diminuição da massa adiposa em roedores (5). Nesse contexto, um importante papel também pode ser atribuído ao colesterol, pois este está geralmente em excesso na dieta hiperlipídica ocidental e tem seus níveis séricos correlacionados à mortalidade causada por doenças como a aterosclerose (6). Níveis séricos elevados de colesterol figuram como fatores de risco para doenças neurodegenerativas e diabetes (1).

Uma vez que o colesterol e sua homeostase parecem desempenhar papel na gênese de doenças metabólicas e dislipidêmicas, o entendimento dos mecanismos pelos quais esse esteroide influencia na patogênese dessas doenças é de especial interesse, pois a prevalência das mesmas tem aumentado rapidamente e ainda não há estratégias farmacológicas destacadamente eficientes para conter esse crescimento (7). Porém, a pesquisa básica acerca do tema pode ser limitada pelo custo e tempo envolvidos no uso de modelos mamíferos ou pelo desenvolvimento de linhagens celulares adequadas. Nesse contexto, o nematoide *C. elegans* pode ser uma alternativa viável, uma vez que possui um intrincado, mas razoavelmente conservado e bem descrito metabolismo de ácidos graxos e esteróides (8), além de ser um animal de ciclo de vida curto e de fácil manipulação genética.

## 1.2. Colesterol e vitelo em *C. elegans*

*C. elegans* não é capaz de realizar a síntese *de novo* de colesterol, sendo auxotrófico para tal nutriente, o que permite um controle mais fino de dose-resposta. Assim, deve haver suplementação do meio de manutenção (Nematode Growth Media – NGM) com colesterol para que o nematoide se desenvolva normalmente (8). Em relação ao armazenamento de gordura, *C. elegans* não possui tecido adiposo, reservando a maior parte dos seus ácidos graxos (prevalentemente em forma de triglicerídeos) no intestino em estruturas intracelulares conhecidas como gotas lipídicas, comuns em ecdisozoa (9)(10).

Hormônios derivados do colesterol, tais como os ácidos  $\Delta 4$  e  $\Delta 7$ -dafacrônico são capazes de interagir com receptores nucleares de hormônio (NHR), como o DAF-12 (homólogo do receptor de vitamina D de vertebrados), sendo este o mais bem estudado entre os 248 receptores do tipo em *C. elegans* (11). Os ácidos  $\Delta 4$  e  $\Delta 7$ -dafacrônico são gerados a partir do colesterol em uma reação de dois e três passos, respectivamente, tendo em comum o passo catalisado por DAF-9/CYP27A1, uma subunidade catalítica de um complexo enzimático do tipo citocromo (12). DAF-12 é reprimido por DIN-1 em situações de escassez de comida ou superpopulação, impedindo o crescimento de *C. elegans* e ocasionando sua entrada no estado metabolicamente quiescente conhecido como *dauer*. Na presença dos seus ligantes, DAF-12 se transloca para o núcleo e regula diretamente a expressão da família *let-7* de miRNAs (*let-7-fam*), promovendo a progressão entre os estágios larvais até o animal adulto através da inibição de diferentes alvos, tais como *hbl-1*, *lin-41* e, inclusive, *daf-12* num *looping* de *feedback* negativo (13,14).

Em *C. elegans* o colesterol é transportado em um complexo de vitelo (*yolk*). As vitelogeninas recrutam lipídeos de gotas lipídicas durante a biogênese do complexo de vitelo no intestino (15). O vitelo é transportado para o espaço pseudocelômico (cavidade corporal dos nematoides) na forma de um complexo que inclui 15% de lipídeos e colesterol [fosfolipídeos (53%), triacil (27%) e diacilglicerídeos (3%), ácidos graxos livres (16%) e colesterol (<1%)] (16) e complexos proteicos formados por vitelogeninas. A partir do espaço pseudocelômico o complexo passa através da lâmina basal da gônada por meio de uma bainha de poros na gônada somática, antes de sua captação por oócitos em processo de maturação através de endocitose mediada pelo receptor RME-2 (17,18). Além de servir como a principal fonte de nutrientes (aminoácidos) para a progênie, as vitelogeninas no vitelo são importantes também para a ovulação e fertilização dos embriões, mas não indispensáveis para a fecundidade e a embriogênese dos animais, ao contrário do que se assumiu por muito tempo (19)(18)(20). Alternativamente, o vitelo parece ser mais relevante para o desenvolvimento e sobrevivência

da progênie no período pós-embriogênico. Além de quantidades consideráveis de vitelo no corpo da larva após eclosão (21), mutantes deficientes em diferentes passos da síntese e captação de vitelo têm níveis diminuídos de sobrevivência frente à restrição alimentar (20,22). Interessantemente, hermafroditas mais velhas produzem ovos com mais vitelogenina e larvas maiores e de desenvolvimento mais acelerado (23). Assim, uma grande provisão de vitelo para a progênie poderia garantir a sobrevivência em ambientes onde a comida é escassa, assim como também permitir que, na situação oposta, o animal tenha condição de chegar à fase adulta mais cedo e prover os nutrientes necessários para a sua progênie, oferecendo uma vantagem que pode ser crucial caso um período de escassez futura ocorra (24).

Além de sofrer regulação por diversas vias que respondem às condições ambientais, como a via da insulina/IGF-1 (25), TGF- $\beta$  (26) e TOR (27), a vitelogenese também pode ser regulada de forma não-autônoma por miRNAs na hipoderme. Foi demonstrado que isso se dá através da ativação e repressão sequencial de genes na hipoderme pela ação repressiva de *let-7* e *lin-4*, o que permite a expressão de *lin-29*, um fator de transcrição, entre o estágio larval L4 e a fase adulta. *lin-29*, por sua vez, regula positivamente e de maneira não-autônoma a expressão de *let-363* no intestino, o homólogo de mTOR (TORC2), ativando a cinase SGK-1, permitindo a localização nuclear do ativador transcricional das vitelogeninas, PQM-1 (27). Isso demonstra um importante meio pelo qual as vitelogeninas podem ter sua expressão regulada por elementos como os miRNAs.

### **1.3. Efeitos trans e intergeracionais induzidos por dieta**

Desde que August Weissman propôs o conceito da separação da linhagem germinativa e somática, foi considerado que a linhagem germinativa e conseqüentemente os traços fenotípicos dos descendentes de um indivíduo estariam livres da influência de tecidos somáticos e, dessa forma, do ambiente. Nas décadas recentes esse conceito foi desafiado, com um foco em mecanismos epigenéticos de herança, tais como metilação do DNA, modificações de cromatina e pequenos RNAs não codificantes (24,28). Quando lidamos com efeitos epigenéticos transmitidos de uma geração para outras, é importante que se faça a distinção entre herança intergeracional e transgeracional. Efeitos intergeracionais ocorrem quando a exposição ambiental materna (P0) tem efeitos diretos sobre as células do feto (F1) em desenvolvimento (incluindo a linhagem germinativa, a qual dará origem à F2). Na linhagem paterna, a exposição ambiental do pai pode ter efeitos diretos nas células que formarão a F1, mas não na linhagem germinativa de F1 que formará F2. Portanto, um efeito transgeracional real é apenas

demonstrado quando o efeito da exposição é transmitido até F2, no caso da linhagem paterna, ou F3, no caso da linhagem materna (quando a exposição ambiental se dá durante a gravidez).

Há uma crescente linha de evidência sugerindo que fenômenos epigenéticos (metilação de DNA, modificação de histonas e expressão de pequenos RNAs não-codificadores funcionais) podem estar associados aos fenótipos causados pela dieta ocidental, tais como o aumento da massa adiposa e dos marcadores inflamatórios (29). Enquanto ainda não é possível afirmar se as modificações epigenéticas encontradas em doenças metabólicas são causas ou consequências das mesmas (30,31), porém surge outra questão: poderiam mecanismos epigenéticos perpetuar fenótipos relacionados à dieta de maneira transgeracional? Fullston e colaboradores demonstraram que a dieta hiperlipídica na geração parental de ratos parece influenciar a fome e o risco para síndrome metabólica e diabetes tipo 2 nas duas gerações seguintes (32), um efeito intergeracional (F1) e transgeracional (F2). Além disso, o mesmo grupo demonstrou que a saúde reprodutiva dos filhotes de pais obesos também parece ser comprometida (33). Os pesquisadores atribuíram isso a um perfil diferencialmente expresso de pequenos RNAs nos testículos dos pais. Similarmente, Barres e colaboradores associaram o efeito de uma dieta rica em gordura em ratos machos da geração parental com a resistência à insulina nas fêmeas da geração filial (34), portanto um efeito intergeracional. Isso foi atribuído à expressão do miRNA *let-7c* em tecidos metabólicos.

Assim, dentre os diferentes mecanismos epigenéticos que podem estar envolvidos em herança tanto intergeracional quanto transgeracional, os pequenos RNAs não-codificadores parecem ser bons candidatos. Os microRNAs (miRNAs) são importantes reguladores do transcriptoma por exercerem um controle mais preciso e direcionado sobre a transcrição e a tradução dos mRNAs (35). Dessa forma, são indispensáveis para a manutenção, sobrevivência e identidade celular. Os miRNAs são reguladores negativos da tradução e da estabilidade de mRNAs. Se originam de longos produtos de transcrição que contêm uma estrutura em grampo (*hairpin*). Para que miRNAs maduros sejam produzidos e assim cumpram sua função como reguladores gênicos, é indispensável o processamento pela enzima Dicer (endoribonuclease do tipo III) (36). A fita simples originada deste processo interfere com a expressão de mRNAs parcialmente complementares, servindo como guia para o complexo de silenciamento RISC, onde estão primariamente associados à proteínas do tipo Argonauta. Dicer atua tanto para produzir miRNAs quanto siRNAs (*small interfering RNAs*). Os siRNAs, assim como os miRNAs, também se associam à proteínas do tipo Argonauta, porém siRNAs possuem maior complementaridade e, portanto, são específicos para um alvo, enquanto miRNAs geralmente podem regular a expressão de diversos alvos, além de diferenças em suas estruturas originais,

pois siRNAs não apresentam a mesma estrutura em grampo que os miRNAs (37). Ainda, piRNAs (*Piwi-interacting RNA*) se originam de maneira independente de Dicer a partir de transcritos de fita simples (transposons, mRNA e lncRNA), tem entre 24-30nt e estão associados à subfamília Piwi de argonautas, estando presentes sobretudo na linhagem germinativa, onde parecem ser importantes para a sobrevivência e manutenção desta (37). É importante notar ainda que miRNAs, siRNAs, piRNAs e outros RNAs pequenos podem ser transmitidos transgeracionalmente pela linhagem germinativa (38,39). Um estudo identificou dsRNA fluorescente dentro do complexo de vitelo em *C. elegans*, sendo assim transmitido para a geração F1 através do canal SID-1, caracterizando a possibilidade de herança intergeracional de RNA pequeno nesse organismo (40).

Como mencionado anteriormente, em *C. elegans* o receptor hormonal nuclear responsivo a derivados do colesterol DAF-12 é capaz de regular a expressão de dois microRNAs importantes na regulação da longevidade, desenvolvimento e em resposta a sinais vindos da linhagem germinativa: mir-84 e mir-241 (41,42). Indo em encontro a esse achado, alguns miRNAs já foram associados aos efeitos de uma série de condições/regimes metabólicos e doenças relacionadas, tais como a restrição calórica, dieta hiperlipídica, diabetes do tipo II, síndrome metabólica e outras (43–45). De fato, nosso grupo demonstrou que a perda parcial ou total de síntese de miRNAs, particularmente no tecido adiposo, leva a uma redução do tempo de vida e a complicações relacionadas com a dieta hiperlipídica, tais como a resistência à insulina e dislipidemias (46).

Alterações epigenéticas, tais como a expressão de RNAs não-codificadores, estão presentes em doenças metabólicas relacionadas à dieta hiperlipídica, como por exemplo a diabetes do tipo II, onde o *locus* MEG3-DLK1 é hipermetilado, causando queda na expressão de alguns miRNAs nas células beta do pâncreas (43). Além disso, Dumortier e colaboradores estudaram o papel do microRNA-375 na herança intergeracional (F2) herdada de ratas alimentadas com baixos níveis de proteína. Uma aumentada expressão de miR-375 nas mães e filhotes estava correlacionada com massa anormal das ilhotas pancreáticas e menor secreção de insulina (44).

Estes fenômenos epigenéticos parecem estar tão ligados à herança inter e transgeracional que podem inclusive explicar a herança induzida por uma ampla gama de fatores ambientais além da dieta, tais como exposição a metais pesados, agroquímicos, psicoestimulantes e toxinas que induzem o acúmulo lipídico (fatores obesogênicos) (47,48). Ainda, Gapp e colaboradores mostraram que estresse traumático nos primeiros meses de vida de ratos pode induzir alterações comportamentais e bioquímicas na progênie e que esse efeito

está ligado à função epigenética de miRNAs específicos (49). Além disso, Rechavi e colaboradores observaram como *C. elegans* é capaz de herdar transgeracionalmente defesa baseada em RNAi contra um vírus (Flock House Virus) pela expressão de viRNAs (*virus derived RNAs*) (50). O mesmo grupo identificou também que siRNAs podem mediar a herança transgeracional que resulta em entrada no estágio quiescente de *dauer* depois de carência alimentar (51).

Interessantemente, um modelo de obesidade e dislipidemia pode ser gerado em *C. elegans* pela adição de altas concentrações de colesterol no meio, o que leva ao aumento no acúmulo de triglicerídeos e diminuição na resistência ao estresse oxidativo – uma marca de vulnerabilidade (52). Por ter o corpo totalmente transparente, o acúmulo lipídico em *C. elegans* pode ser facilmente visualizado *in vivo* com o auxílio de marcadores. Ainda, estudos que envolvam mais de uma geração podem ser facilmente conduzidos em *C. elegans* devido ao seu curto tempo de reprodução. Além disso, nocautes do tipo deleção e a técnica de RNAi possibilitam a interferência em vias conhecidas e envolvidas com a sinalização de colesterol (e seus derivados) e no controle do metabolismo lipídico, além de vias importantes para a função de pequenos RNAs funcionais, tais como os miRNAs, siRNAs e piRNAs.

## 2. Hipótese inicial

Durante minha iniciação científica observei que a suplementação com uma concentração alta de colesterol (50 $\mu$ M/20 $\mu$ g/mL) em meio NGM (grupo OP50+) reduz o tempo de vida do nematoide *C. elegans* quando comparado ao grupo controle (OP50, concentração padrão de 12,5 $\mu$ M/5 $\mu$ g/mL de colesterol). Esse efeito é observado na geração parental P0 e filial F1 (**Figura 1B**). O fato de haver alteração no tempo de vida mesmo na ausência da suplementação de colesterol, como é o caso na geração F1, sugere herança intergeracional. Altos níveis de colesterol ainda não foram descritos por seus efeitos sobre a longevidade de *C. elegans*, demonstrando que a homeostase de esteróis nesse nematoide pode promover profundas mudanças em sua fisiologia, mudanças estas que parecem ser herdadas de maneira intergeracional. Portanto, é importante que haja uma melhor compreensão tanto dos mecanismos pelos quais *C. elegans* tem sua fisiologia alterada por este esterol, quanto da maneira pela qual essas alterações são herdadas, uma vez que esse fenômeno perpetraria os efeitos deletérios da dieta rica em colesterol e poderia servir como base para propormos efeitos semelhantes em organismos mais complexos, como os mamíferos. Para tal fim, hipotetizamos

que os altos níveis de colesterol introduzidos na dieta de *C. elegans* em uma geração poderiam alterar a fisiologia da próxima geração por meio de mecanismos ainda não conhecidos e, uma vez que elementos diretamente responsivos a derivados de colesterol regulam a expressão de miRNAs que controlam o desenvolvimento de *C. elegans*, nos propomos a estudar a relação entre os mesmos.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivos gerais:**

- Procurar por fenótipos herdáveis e suficientemente robustos decorrentes da exposição aos altos níveis de colesterol;
- Caracterizar a origem de pelo menos um fenótipo encontrado;
- Caracterizar a herança de pelo menos um fenótipo encontrado;

#### **3.2. Objetivos específicos:**

- Caracterizar pelo menos um fenótipo encontrado em relação à sua dependência de:
  - Moléculas reguladas pelo ambiente com potencial herdável: RNAs pequenos não codificantes e proteínas do vitelo (vitelogeninas);
  - Definir as relações epistáticas entre os alvos encontrados;
- Caracterizar a herança de pelo menos um fenótipo encontrado em relação à sua dependência de:
  - Sexo da geração paterna;
  - Moléculas reguladas pelo ambiente com potencial herdável: RNAs pequenos não codificantes e proteínas do vitelo (vitelogeninas);
  - Definir as relações epistáticas entre os alvos encontrados;



## 4. Materiais e métodos

### 4.1. Manutenção e protocolo de exposição dos animais aos altos níveis de colesterol

As linhagens de *C. elegans* foram mantidas a 20°C em placas contendo NGM (Nematode Growth Media) semissólido (1,7% de ágar para placas de manutenção e a maioria dos experimentos e 2,5% para o experimento de tempo de vida). A fonte nutricional dos nematoides consistiu em *Escherischia coli* OP50-1 na concentração de  $5 \times 10^{11}$  células/mL, crescidas *overnight* em meio LB (Lisogeny Broth). As linhagens utilizadas foram: Bristol N2 (WT); HC108 (ccIs4251 [myo-3::gfp] I; dpy-18 [e364]); RT130 (pwIs23 [vit-2p::vit-2::GFP]); JR667 (wIs51 [scmp::GFP]); MT14118 (mir-84 [n4315] V; mir-241 [n4037] X); GR1428 (mgIs45 [mir-84(+)] + tub-1::GFP); As linhagens foram obtidas do Caenorhabditis Genetic Center (University of Minnesota).

Os experimentos conduzidos com *C. elegans* machos envolveram o cruzamento de machos com marcação fluorescente na faringe (HC108 [ccIs4251 myo-3::GFP]) com hermafroditas incapazes de produzir esperma em temperatura não permissiva (25°C) (BA671 spe-9 [hc88]). Brevemente, populações mistas, porém com grande prevalência de machos, foram expostas à altas concentrações de colesterol (P0) por 68h. Ao fim deste período, vários machos foram colocados em novas placas, com concentrações normais de colesterol, para cruzar com hermafroditas incapazes de produzir esperma (previamente crescidas a 25°C) em incubadora a 20°C. A prole resultante (F1) é quase 100% GFP positiva e, portanto, descendente do macho exposto a colesterol em altos níveis.

Para obter populações sincronizadas dois processos diferentes foram usados de acordo com a necessidade específica: 1) Sincronização por bleaching: NaOH 1M e NaClO 0,5% são usados para romper hermafroditas grávidos e liberar ovos fecundados, os quais eclodem em cerca de 9h após o fim do processo, rendendo populações consideravelmente sincronizadas, porém com diferenças de até 9h; 2) Sincronização por oviposição: Um grupo de hermafroditas grávidos é transferido para novas placas e deixado para botar ovos por 1h (ou mais, dependendo do tamanho da população desejada), rendendo uma população mais sincronizada, com diferenças de no máximo 1h entre cada indivíduo.

O meio de manutenção de *C. elegans* é suplementado com 12,5µM (5µg/mL) de colesterol, enquanto nosso tratamento consiste na exposição da geração parental (P0) à 50µM (20µg/mL). A exposição começa quando os animais ainda são ovos e vai até o primeiro dia de vida adulta (D0), somando cerca de 70-73h. A geração P0, exposta aos altos níveis de colesterol,

em seu D0, é transferida por 1h para placas com níveis normais de colesterol afim de que deposite seus ovos nesta nova placa. A geração F1 que se origina deste processo terá sido apenas exposta intrauterinamente (tanto células somáticas quanto linhagem germinativa), portanto qualquer herança aqui observada é intergeracional.

#### **4.2. Screening de fenótipos herdados de maneira intergeracional**

A geração parental (P0) foi mantida nas diferentes condições até o dia 0 de vida adulta (pico da postura de ovos), quando então foi transferida por 1h para placas em condições normais (bactéria/colesterol normais). A quantidade de vermes transferidos foi modificada dependendo da quantidade de prole necessária para o ensaio de interesse, variando entre 30 e 50 indivíduos. Após esse tempo, o hermafrodita P0 foi descartado e a progênie (F1) se desenvolveu sob condições normais.

##### *4.2.1. Mensuração de triglicerídeos*

500 animais adultos (D0) com cerca de 68h de vida foram recolhidos em tampão M9 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 22 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 42 mM, NaCl 86 mM, pH 6) e ultrasonicados em solução de lise própria para *C. elegans* (Tris 20mM pH 7,5, EDTA 50mM, NaCl 200mM, SDS 0,5%). Os tubos contendo o lisado foram centrifugados a 12000 RPM por 5min e o sobrenadante foi reservado. A quantificação de triglicerídeos se deu através de kit comercial (LabTest, Triglicérides Liquiform), sendo as amostras normalizadas por concentração proteica mensurada através de Bradford (Pierce Coomassie) (53). O experimento foi repetido 6 vezes com populações independentes.

##### *4.2.2. Tempo de vida*

Resumidamente, cerca 150 vermes sincronizados por oviposição foram transferidos para novas placas NGM contendo o inibidor de mitose FUdR (5- fluoro-2'-deoxiuridina) (50µg/mL) no primeiro dia de vida adulta (D0). O FUdR é empregado para que não haja prole, garantindo que apenas a população original permaneça na placa. As placas foram acrescidas de uma camada de *E. coli* OP50 na concentração de  $5 \times 10^{11}$ . Os animais foram monitorados todos os dias até o último dia de suas vidas. O experimento foi repetido pelo menos 3 vezes com populações independentes e em períodos distintos.

#### 4.3.3. “Brood size”

36 vermes dividido em três replicatas biológicas foram monitorados individualmente a cada 24h durante seu período fértil por um total de 4 dias. A cada 24h os hermafroditas foram retirados de suas placas e colocados em novas, permitindo que a progênie de um dia não fosse confundida com a de outros dias. As larvas foram contadas 48h depois da retirada do animal adulto da placa, permitindo contar somente a progênie viável.

#### 4.2.4. Tempo de desenvolvimento

Cerca de 100 vermes, sincronizados por oviposição, foram monitorados a partir da hora 60 de suas vidas, a contar do momento da oviposição, por pelo menos 10h de hora em hora. Cada contagem consistiu em classificar os animais entre adultos e não-adultos. Isso se deu observando a presença clara de ovos distinguíveis dentro do útero dos animais. Após 12h de contagem os animais que não atingiram a fase adulta foram considerados como “censored” para efeitos de análise estatística. Cada experimento foi repetido no mínimo 3 vezes com populações independentes e em dias diferentes.

### 4.3. Experimentos com RNAi

Brevemente, *E. coli* HT115 (DE3) transformada com vetor L4440 vazio ou contendo dsRNA correspondente ao gene de interesse foi inoculada em meio LB adicionado de ampicilina (100µg/mL) e tetraciclina (12,5µg/mL). Após crescimento overnight, o meio foi concentrado para render 5 x 10<sup>11</sup> células. 1mM do indutor de expressão IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo) foi adicionado tanto ao meio NGM quanto diretamente no caldo de cultura concentrado. Essa metodologia de RNAi por ingestão segue o descrito por Kamath et al., 2001 (54).

### 4.4. Aquisição e mensuração de imagens fluorescentes

Os animais repórter para diferentes proteínas foram fotografados usando um Zeiss Axio Imager Z1 no Instituto Nacional de Ciência de Tecnologia em Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INFABIC) da Unicamp. Levamisole 2,5mM foi utilizado para paralisar os animais numa superfície de agarose 2% coberta com lamínula. Os animais RT130 (pwIs23 [*vit-2::GFP*]) foram fotografados no primeiro dia de vida adulta (D0). Grupos de 7-10 animais foram

fotografados juntos e a média a fluorescência individual de todos foi plotada como um ponto, representando uma replicata experimental. Cerca de três replicatas experimentais foram mensuradas dentro de uma mesma replicata biológica (diferentes populações em diferentes dias). Três replicatas biológicas foram mensuradas. Os animais JR667 (*wIs51 [scmp:GFP]*) foram fotografados nas primeiras horas do estágio L4 (48h). O número de seam cells de um lado do corpo de cada animal foi contada individualmente para cerca de 50 animais por grupo. Os animais GR1428 (*mir-84p::GFP*) foram fotografados no primeiro dia de vida adulta (D0). Grupos de 7-10 animais foram fotografados em conjunto e a média da fluorescência individual de todos foi plotada como um ponto (replicata experimental) totalizando cerca de 50 indivíduos entre duas populações diferentes (cinco replicatas experimentais para cada uma das duas replicatas biológicas). A ferramenta “free hands” do software Fuji (ImageJ) foi utilizada para selecionais animais individuais, cuja medida da fluorescência era normalizada pela área. Enquanto *pwIs23 (vit-2::GFP)* teve a fluorescência do corpo inteiro mensurada, GR1428 (*mir-84p::GFP*) foi mensurada apenas nas células da faringe e na porção final do intestino.

#### 4.5. Expressão gênica

qRT-PCR foi empregado para avaliar a expressão gênica de certos alvos envolvidos no metabolismo lipídico, biogênese e função de miRNA. Brevemente, nós usamos um protocolo padrão de extração de RNA com Trizol. Após aferição da qualidade do RNA através dos quocientes 260/230 e 260/280 e de uma eletroforese em gel de agarose 1%, 0,5-1µg de RNA foi usado para sintetizar cDNA. Esse cDNA foi então acrescido de primers específicos para o gene de interesse e SYBR green. A expressão foi relativizada ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) em relação ao gene endógeno *his-10*. A lista de primers usados foi a seguinte: *daf-12F* – CCAGTCATCCACAGTCCACC; *daf-12R* – TCTGACGTCGTCGACTCTCT; *din-1F* – CAACTGTTGATCTTGCCGCC; *din-1R* – GCCAGATTTGCAAGGGAAGC; *pash-1F* – TGGTGGTCCTCCATTGATGC; *pash-1R* – ATTCCATTGGTTGAGGCGGT; *dcr-1F* – CATACTACGGGGCAGTCAGC; *dcr-1R* – CCAGTGCCTAGTTGGACGAT; *vit-2F* – TTGCTCCTCGTCTCTCTCGT; *vit-2R* – TCGAAGAGTTTCACCGCTC; *vit-3F* – CGATGAAAAGGAACTGAGAACCA; *vit-3R* – CTCAGAGACTGGCTCGATGG; *vit-6F* – CGATGAGCCAACTGAGCAAG; *vit-6R* – GAGGCAGTAGACGGAGGTCTT;

#### 4.6. Quantificação de miRNAs

Animais sob as mesmas condições foram coletados em sequência, de modo a obter diversas populações sincronizadas em estágios larvais diferentes. RNA foi extraído seguindo um protocolo padrão empregando Trizol. A transcrição reversa foi feita usando o miScript II RT Kit (Qiagen), onde a síntese do cDNA foi conduzida usando o Buffer HiSpec e 500ng de RNA. A expressão dos miRNAs de interesse foi aferida por qPCR usando os primers correspondentes inclusos no kit.

#### 4.7. Análise estatística

A análise do tempo de vida foram realizadas pelo teste Log-Rank (Mantel Cox). Cada replicata biológica compreendeu cerca de 150 indivíduos, sendo repetida três vezes em períodos distintos e não sobrepostos de tempo.

A análise do tempo de desenvolvimento foi feita através do teste Log-Rank (Mantel Cox). Cada replicata biológica compreendeu cerca de 100 indivíduos, sendo repetida de 3-7 vezes em períodos distintos e não sobrepostos de tempo, de acordo com cada caso. As tabelas aqui contidas mostram apenas o tempo de desenvolvimento médio de uma população (o tempo que 50% de uma população leva, em horas, para chegar ao estágio adulto) é obtido pela média de 3 ou mais replicatas biológicas. As comparações aqui feitas são, a menos que explicito o contrário, entre o mesmo fenótipo para diferentes tratamentos (colesterol).

As análises da quantificação de triglicerídeos, brood size, expressão de repórter GFP e expressão gênica foram realizadas por uma One-Way ANOVA seguida de *post hoc* de Tukey. No caso do repórter *vit-2p::vit-2::GFP* Cada replicata biológica É importante notar que, no caso da expressão gênica e expressão de miRNAs, a análise estatística foi aferida plotando os valores aqui apresentados em gráficos de barras simples que incluíam os grupos = e +, assim como seus eventuais iguais expostos a RNAi, onde a análise One-Way Anova pode ser conduzida. A apresentação destes gráficos em um outro layout em nada modifica sua análise estatística, uma vez que as comparações feitas foram sempre entre grupos similares em diferentes condições de exposição ao colesterol.

Para análise dos estágios larvais no tempo de desenvolvimento, uma Two-Way ANOVA foi empregada, seguida também de *post hoc* de Tukey.

Replicata biológica aqui é usado para denotar diferentes populações (originadas de diferentes placas) em diferentes dias. Enquanto replicata experimental denota diferentes medidas da mesma população que foi separada para que se levasse em consideração a variabilidade do procedimento experimental em questão.

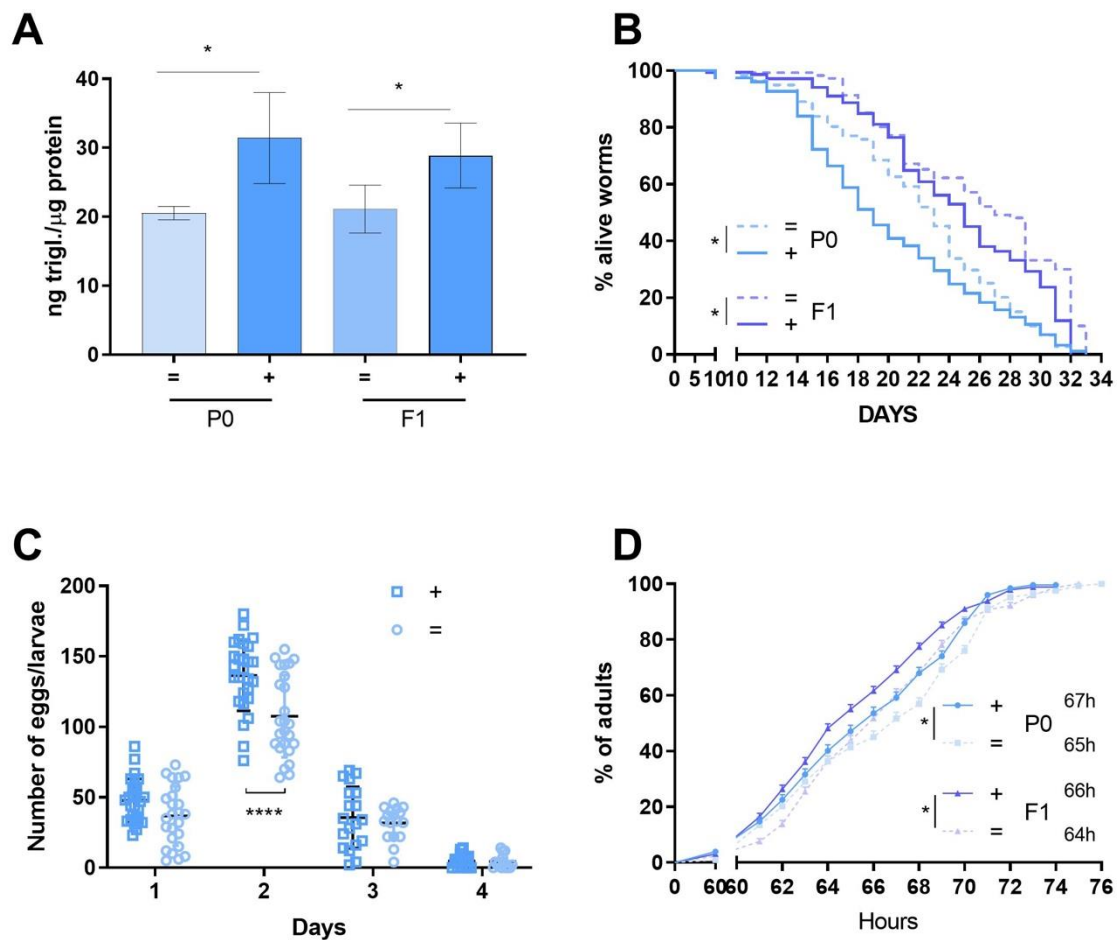
O software GraphPad Prism 8.0 foi utilizado para conduzir todas as análises, e para plotar os gráficos. \* em todos os gráficos representa uma diferença estatística significativa, resultado de um p que é, pelo menos, <0.05.

## 5. Resultados e discussão

Inicialmente buscamos testar se altos níveis de colesterol adicionados à dieta de *C. elegans* desde o início de suas vidas poderia induzir algum fenótipo, fosse ele deletério ou não. De acordo com a literatura, alguns estudos já haviam utilizado maiores concentrações de colesterol (25 $\mu$ M) no meio de manutenção de *C. elegans* para induzir o acúmulo excessivo de ácidos graxos na forma de triacilglicerol (52,55). Aqui, com animais expostos à 50 $\mu$ M (20 $\mu$ g/mL) de colesterol no meio, além de verificarmos um maior acúmulo de triglicérides (**Figura 1A**), também observamos fenótipos como redução no tempo de vida (**Figura 1B**), aceleração no tempo de postura de ovos (P0) (**Figura 1C**) e aceleração no tempo de desenvolvimento (**Figura 1D**). Um estudo prévio já havia identificado que uma maior provisão de colesterol é capaz de aumentar a capacidade reprodutiva de *C. elegans* para além dos níveis basais do tipo selvagem, além de também verificar um maior acúmulo de triglicérides (56), porém este mesmo estudo não observou redução no tempo de vida dos animais. Essa diferença pode ser atribuída ao fato de que nosso estudo expôs os animais a partir de ovos, enquanto o estudo aqui mencionado o fez a partir do estágio larval L4. Além disso, a ideia de que o tempo de vida seria inversamente proporcional à taxa metabólica (aqui estendida para compreender um desenvolvimento acelerado) compreende uma teoria clássica do envelhecimento, conhecida como “rate of living” (57). Nesta mesma linha, o pleiotropismo antagônico sugere que genes benéficos à propagação da espécie seriam geralmente deletérios para o envelhecimento da mesma (58). Isso vai em encontro tanto ao desenvolvimento acelerado (**1D**) quanto à acelerada postura de ovos (**1C**).

Estudos como o de Magner *et. al.*, 2013 (56) iniciam uma exposição tardia ao colesterol (ou a qualquer outro agente químico) a partir de um estágio larval tardio para que se evitem observações provenientes de alterações devidas à interferência com o desenvolvimento dos animais, o que foi justamente observado aqui. Diversos estudos anteriores descreveram que a manutenção de níveis apropriados de colesterol na dieta de *C. elegans* são essenciais para que o desenvolvimento dos animais se dê de forma completa (59). No entanto, nenhum estudo em *C. elegans* havia ainda descrito qualquer tipo de herança intergeracional ligada à suplementação de colesterol na dieta relativas a um dos fenótipos aqui descritos. Diferente de todos os outros fenótipos observados, o tempo de desenvolvimento acelerado se mostrou robusto e de fácil

aferição, o que nos fez utilizá-lo para o estudo dos mecanismos pelos quais tal herança estaria ocorrendo.



**Figura 1.** A exposição a altos níveis de colesterol (50µM ou 20mg/mL) induz diferentes fenótipos em ambas P0 e F1. A) Níveis de triglicerídeos. Cinco replicatas biológicas (cinco populações crescidas e analisadas em momentos diferentes e não sobrepostos), cada uma contando com duas replicatas experimentais (duas medidas da mesma amostra) B) Tempo de vida. Três replicatas biológicas para cada uma das gerações, cada uma contando com uma replicata experimental (placa com vermes originados da mesma população). C) Postura de ovos por dia. Três replicatas biológicas, cada uma contando com 6 replicatas experimentais (seis vermes em seis diferentes placas, todos originados da mesma população). D) Tempo de desenvolvimento. Cinco replicatas biológicas para P0 e sete replicatas biológicas para F1, cada uma com uma replicata experimental (placa com vermes originados da mesma população). + indica animais expostos a maiores níveis de colesterol (P0) ou descendentes de pais que foram (F1). = indica animais criados em condições normais em todas as gerações. \* indica diferença estatística evidenciada por um  $p < 0.05$ , pelo menos. Linhas entre dois grupos indicam comparação estatística feita entre os mesmos.

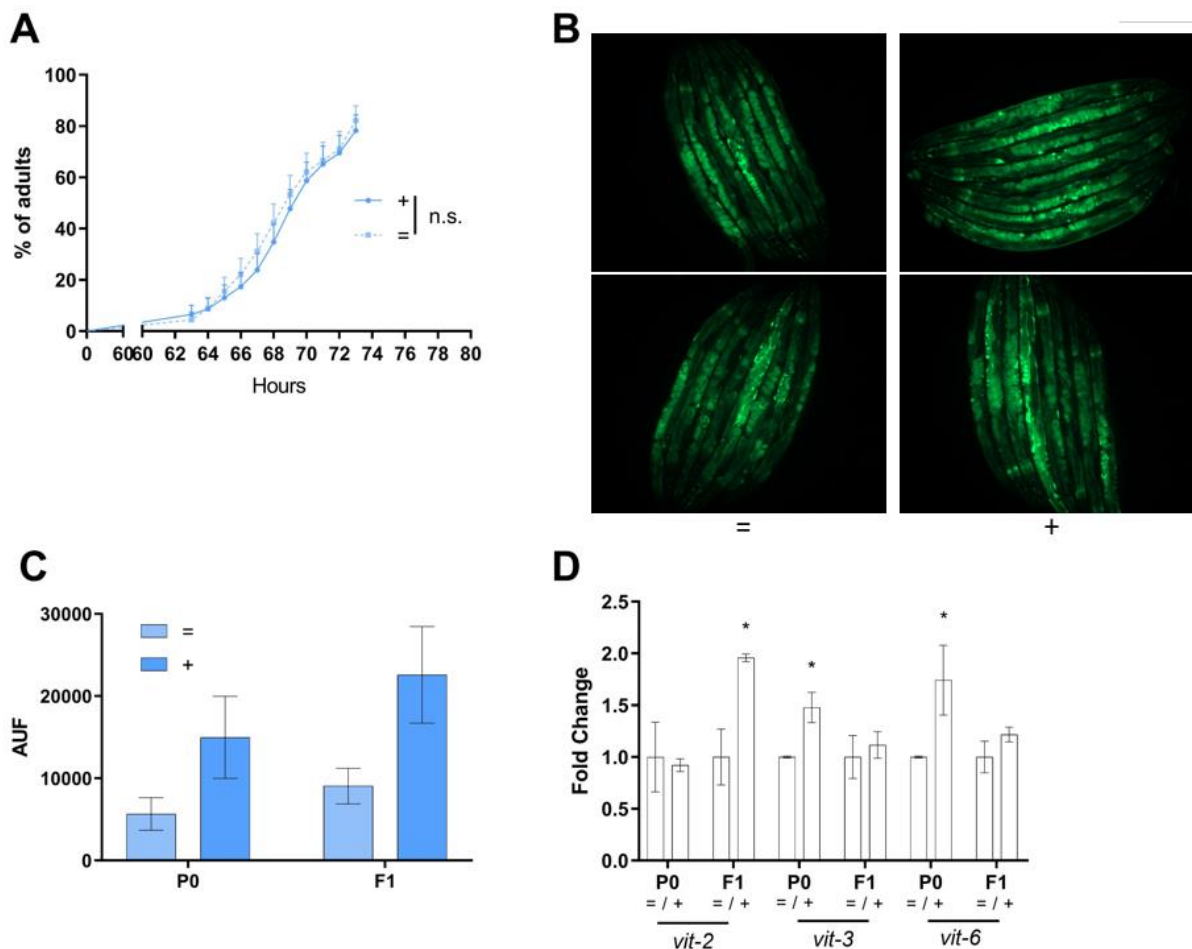
O primeiro passo foi identificar se a herança intergeracional que resulta em um desenvolvimento acelerado estaria ligada à um ou outro sexo na geração parental. A literatura

relata comumente a associação entre o sexo e a herança em questão (60) e enquanto a maioria dos estudos é focado em intervenções ou eventos associados à linhagem materna (61)(62)(63), mais recentemente a linhagem paternal também começou a ser explorada como um potencial contribuidor para a propagação de herança de caráter epigenético (64)(65). Portanto, para determinar se um ou outro sexo na geração parental poderia ser isoladamente responsável pela passagem e/ou aquisição da herança observada após à exposição ao colesterol, nós isolamos *C. elegans* machos GFP+ (*myo-2p::myo-2::GFP*) e os cruzamos com hermafroditas que tem a espermatogênese prejudicada em temperatura não-permissiva, ou seja, quando mantidos à 25°C ao invés de 20°C produzem apenas ovócitos viáveis, mas não espermatozoides. Desta forma, podemos aferir dentro de uma população quais animais F1 são provenientes do cruzamento do macho GFP+ com a hermafrodita, além de esperar por um grande número destes, uma vez que a reprodução normal da hermafrodita está prejudicada pelo seu crescimento em 25°C. A **Figura 2A** mostra que a exposição da linhagem paterna não é suficiente para transmitir e/ou adquirir o fenótipo de tempo de desenvolvimento acelerado. Infelizmente, uma falha experimental deste teste é o fato de que os parâmetros usados para determinar a maturidade reprodutiva de *C. elegans* hermafrodita são os mesmos parâmetros por nós usados para classificar os animais como adultos no ensaio de desenvolvimento, criando assim uma impossibilidade de aferir o tempo de desenvolvimento de *C. elegans* machos de forma robusta sob microscopia convencional. Assim, não fomos capazes de verificar se a geração P0 paternal se desenvolve mais rapidamente, tal como a geração P0 composta apenas por hermafroditas, logo não podemos excluir a possibilidade de a herança intergeracional não ter sido transmitida devido ao fato de que esta nunca foi adquirida pelo mesmo.

Tendo em vista que nossos resultados apontaram para a impossibilidade de a herança observada ser transmitida e/ou adquirida por *C. elegans* macho, o próximo passo foi aferir a participação do animal hermafrodita neste mesmo cenário de aquisição e transmissão de fenótipo de desenvolvimento acelerado. Neste contexto, aferir a expressão de vitelogeninas nos pareceu uma opção viável, pois além de ser produzida apenas por *C. elegans* hermafroditas (66), também toma parte no transporte de colesterol (além de lipídeos e aminoácidos em forma de proteínas) das células somáticas para a linhagem germinativa (17). Além disso, também é um potencial veículo para o transporte de moléculas que medeiam herança intergeracional, já que é passada diretamente da hermafrodita para a próxima geração e sua produção é controlada por diversas vias metabólicas responsivas a condições ambientais (24). De fato, observamos que ambas P0 e F1 possuem elevados níveis de expressão de vitelogenina a nível de proteína (**Figura 2B e C**) (aferida pelo reporter GFP traducional) e de mRNA (**Figuras 2D**).



Interessantemente, o mRNA de *vit-2* está mais expresso apenas em F1, enquanto *vit-3* e *vit-6* estão superexpressas em P0, porém o repórter traducional está regulado em ambas P0 e F1. Isso pode ser devido ao fato de que YP170B é codificado por ambos *vit-1* e *vit-2*, porém não foi até relativamente recentemente que *vit-1* foi descrito como um gene funcional (67), assim esse poderia ser o transcrito regulado em P0, não excluindo a possibilidade de também haver regulação do mesmo em F1. Dentre os 6 genes que codificam para os quatro polipeptídeos que compõem a vitelogenina de *C. elegans* (YP170A=*vit-3,4,5*, YP170B=*vit-1,2* YP115/88=*vit-6*), nós escolhemos aferir a expressão daqueles que contribuem com o maior número de transcritos para cada polipeptídeo. De fato, as maiores quantidades de vitelogenina que uma hermafrodita mais velha é capaz de fornecer aos seus ovos é fator causal para o desenvolvimento acelerado desta progênie tardia (23). Assim, nossas evidências apontam para um papel maior ou exclusivo da hermafrodita na aquisição e/ou passagem da herança que desencadeia um desenvolvimento acelerado da progênie, processo esse que parece estar ligado à sua capacidade de fazer vitelogênese e, especificamente aqui, se engajar em uma maior expressão de vitelogeninas, principalmente *vit-2*/YP170B.



**Figura 2.** O fenótipo não parece não ser transmitido por *C. elegans* macho, pois pode estar associado à expressão de vitelogenina. A) tempo de desenvolvimento em animais F1 provenientes de cruzamento entre machos expostos à colesterol e hermafroditas mantidas em condições normais. Três replicatas biológicas, cada uma contando com uma replicata experimental. B) Figura representativa do repórter traducional *vit-2::GFP* (pwIs23) (P0, 30ms de exposição). C) Mensuração dos níveis de *vit-2::GFP*. Três replicatas biológicas, cada uma contando com cerca de 15 vermes. D) Expressão relativa de mRNA de *vit-2*, *vit-3* e *vit-6*. Cinco replicatas biológicas, cada uma contando com duas replicatas experimentais. + indica animais expostos a maiores níveis de colesterol (P0) ou descendentes de pais que foram crescidos em maiores níveis de colesterol (F1). = indica animais criados em condições normais em todas as gerações. \* indica diferença estatística evidenciada por um  $p < 0.05$ , pelo menos. Linhas entre dois grupos indicam comparação estatística feita entre os mesmos.

Levando em consideração que observamos o envolvimento de vitelogeninas em um fenótipo herdável ligado a desenvolvimento, hipotetizamos que miRNAs poderiam estar, de alguma forma, envolvidos. Além de controlarem o desenvolvimento de *C. elegans* (68), membros da família *let-7* de miRNAs (*let-7-fam = let-7*, *mir-48*, *mir-84* e *mir-241*) são capazes de regular a vitelogênese no intestino (*vit-2* e *vit-3*) a partir da hipoderme. Isso se dá através da ativação e repressão sequencial de genes na hipoderme pela ação repressiva de *let-7* e *lin-4*, permitindo expressão de *lin-29*, o qual regula positivamente e de maneira não-autônoma o homólogo de mTOR (TORC2) no intestino, ativando a quinase SGK-1, permitindo a localização nuclear do ativador transcricional das vitelogeninas, PQM-1 (27). Também é digno de nota o fato de que a família de miRNAs *let-7* pode ser transcricionalmente regulada pelo receptor nuclear DAF-12 (42), que é responsivo a colesterol, uma vez que a síntese de seus ligantes depende da oferta deste (12). Finalmente, um outro estudo identificou que dsRNA exógeno pode ser transportado juntamente com o vitelo (*yolk*) a partir do intestino para os ovos (40), sendo o receptor SID-1 nos ovos responsável pela captação desse dsRNA em paralelo com o receptor de vitelogenina RME-2, o qual liga vitelogeninas.

Assim, alimentamos os animais com RNAi para *pash-1*, o homólogo de DGCR8 e específico para a biossíntese de miRNAs, na geração P0 e F1. Observamos que o fenótipo de desenvolvimento acelerado não mais se manifestava (**Figura 3A**), sendo que o mesmo não é observado em F1 quando o RNAi é oferecido para a geração P0, indicando a não participação de miRNAs na passagem da herança de P0 para F1. Adicionalmente, nem siRNAs ou piRNAs são capazes de inibir o fenótipo de desenvolvimento acelerado de modo consistente e robusto, uma vez que alimentando os animais com RNAi para a argonauta *rde-1* (específica para siRNAs) e *prg-1* (específica para a síntese de piRNAs) em diferentes momentos entre diferentes gerações não inibe a aquisição ou passagem do fenótipo (**dados não mostrados**). De modo a confirmar que o nosso fenótipo estava ligado a regulação da expressão de miRNAs e/ou de seus

alvos, aferimos a quantidade de “seam cells” que animais de ambas as gerações P0 e F1 possuíam em um determinado momento (L4). As *seam cells* de *C. elegans* formam duas bordas laterais no corpo de *C. elegans* e são importantes para a formação de cutículas específicas de cada estágio larval através da síntese de diversos colágenos (69). O número de *seam cells* é altamente regulado e específico de cada estágio larval, sendo que um animal L4 possui 16 e o adulto nenhuma, uma vez que no último elas se diferenciam terminalmente em células hyp7 ou neurônios e glia (70). A família *let-7* de miRNAs regula a expressão de *lin-41*, *hbl-1* e *daf-12* de modo a controlar o destino e tempo das *seam cells* (68,71,72), assim mutantes para qualquer um destes miRNAs possuem um número aberrante de *seam cells* em um determinado estágio, além de não atingirem a maturidade sexual em um tempo apropriado e/ou sincronizado com o resto da população, portanto um fenótipo heterocrônico (68). A **Figura 3B** mostra que ambas P0 e F1 possuem um número significativamente maior de *seam cells* nas primeiras horas do estágio larval L4 nos grupos expostos às maiores concentrações de colesterol. Além disso, a passagem entre o estágio larval L2 e L3 se deu de forma mais acelerada nos grupos expostos às maiores concentrações de colesterol, efeito esse que foi perdido quando os animais foram alimentados com RNAi para *pash-1* (**Figura 3C**). Assim, estes dados apontam para um possível envolvimento da *let-7-fam* no nosso fenótipo, uma vez que os miRNAs *mir-48*, *mir-241* e *mir-84* devem ser expressos ao final do estágio L2 para que haja a muda em tempo correto para L3, assim como para que haja uma maior expressão de *let-7* no final do estágio L4, permitindo a muda final para o estágio adulto e um número correto de *seam cells* em um determinado momento (13,14). Portanto, no caso da **Figura 3C**, o bloqueio da biossíntese de miRNAs que deveria ser causado pelo RNAi contra *pash-1* poderia interferir com a expressão destes miRNAs, de modo que a transição entre os estágios larvais L2 e L3 se dê de forma não-acelerada.

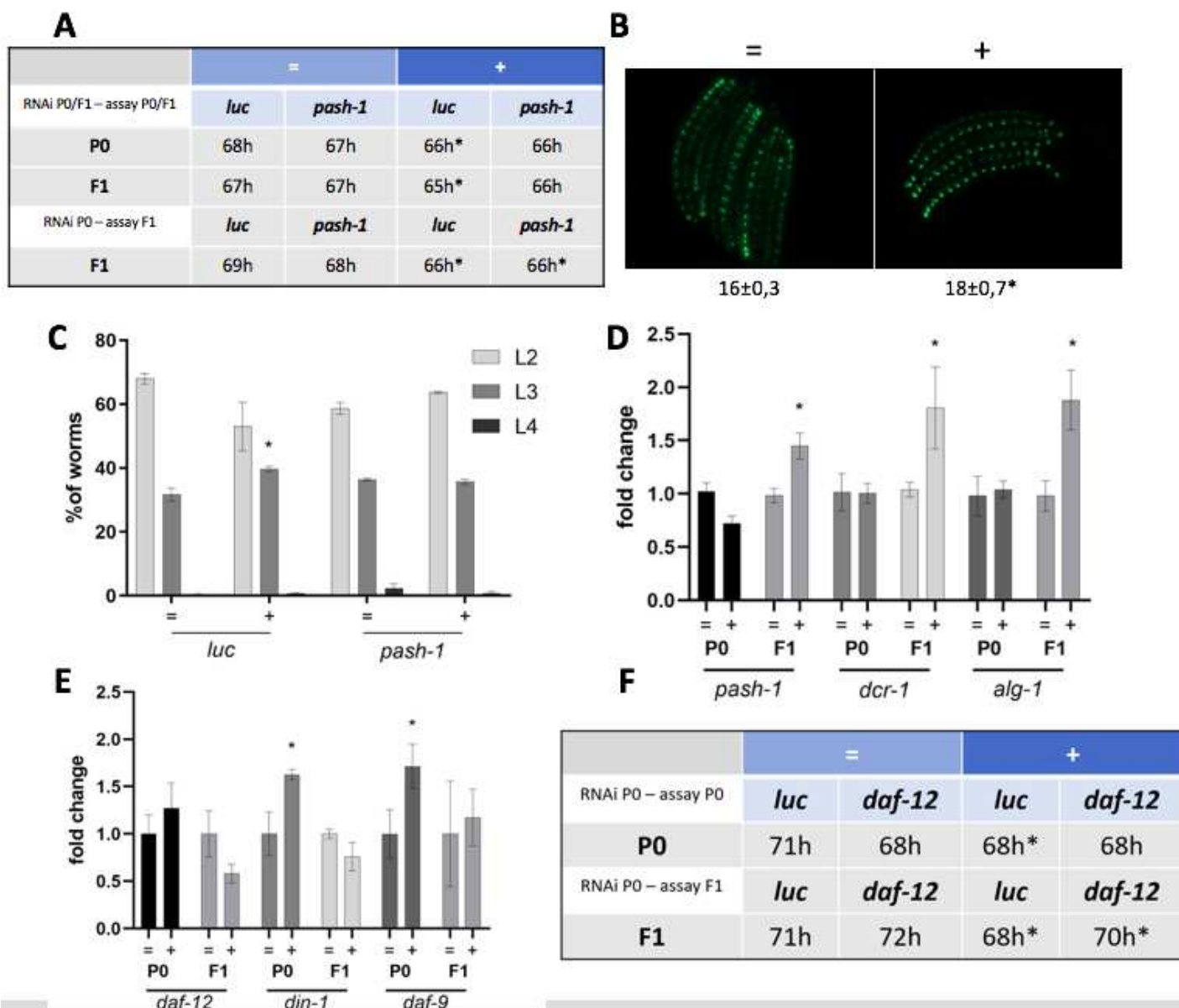
Além de observarmos indicações de uma regulação por parte de miRNAs no nosso fenótipo intergeracional de desenvolvimento acelerado, também aferimos a expressão da maquinaria envolvida com a síntese, tais como *dcr-1* e *pash-1*, e a ação de miRNAs, no caso a argonauta *alg-1* (**Figura 3D**), porém tal aumento de expressão no nível de mRNA se deu apenas da geração F1. Se a regulação positiva de miRNAs é necessária para o nosso fenótipo em ambas as gerações como acreditamos ser, a ausência de maior expressão da mesma em P0 poderia se dar por uma diferença temporal em sua regulação, pois aferimos os níveis de mRNA apenas em adultos, quando nossas evidências sugerem que o papel dessas moléculas poderia estar se dando tão cedo quanto no estágio L2. Como mencionado anteriormente, o receptor nuclear DAF-12 é capaz de ativar diretamente a expressão de *let-7-fam*, sendo que a translocação de DAF-12 para

o núcleo depende da ligação deste com ácidos dafacrônicos, cuja síntese depende de DAF-9 (12), e de sua liberação do repressor DIN-1 (73). Embora não tenhamos observado diferença nos níveis de mRNA de *daf-12* em P0 ou em F1, seu repressor *din-1* e *daf-9* estavam superexpressos em P0 (**Figura 3E**).

Desta forma, acreditamos que a maior expressão de *din-1*, assim como a maior expressão de *daf-9* e conseqüentemente dos ligantes ácidos dafacrônicos de DAF-12, quando observados em conjunto com o restante dos nossos dados, sugere um *feedback* negativo em resposta à uma possível maior atividade do receptor nuclear de hormônio DAF-12. Finalmente, RNAi contra *daf-12* é apenas capaz de inibir o fenótipo de desenvolvimento acelerado em P0, mas não em F1 quando administrado em P0 (**Figura 3F**). Isso sugere que enquanto a expressão do fenótipo, pelo menos em P0, é dependente de *daf-12*, a transmissão do mesmo para F1 é independente. Se nossa hipótese for correta e DAF-12 realmente for necessário para regular a expressão de *let-7-fam* e, ultimamente, o fenótipo observado, isso implicaria também em uma inibição do fenótipo quando o RNAi fosse aplicado em F1, porém este experimento não foi conduzido. Da mesma forma, se a maior expressão de *din-1* e *daf-9* forem resultados da ativação de DAF-12, isso requereria sua ativação de forma independente, talvez pela passagem de ácidos dafacrônicos através das proteínas do vitelo, dispensando DAF-9 em F1.

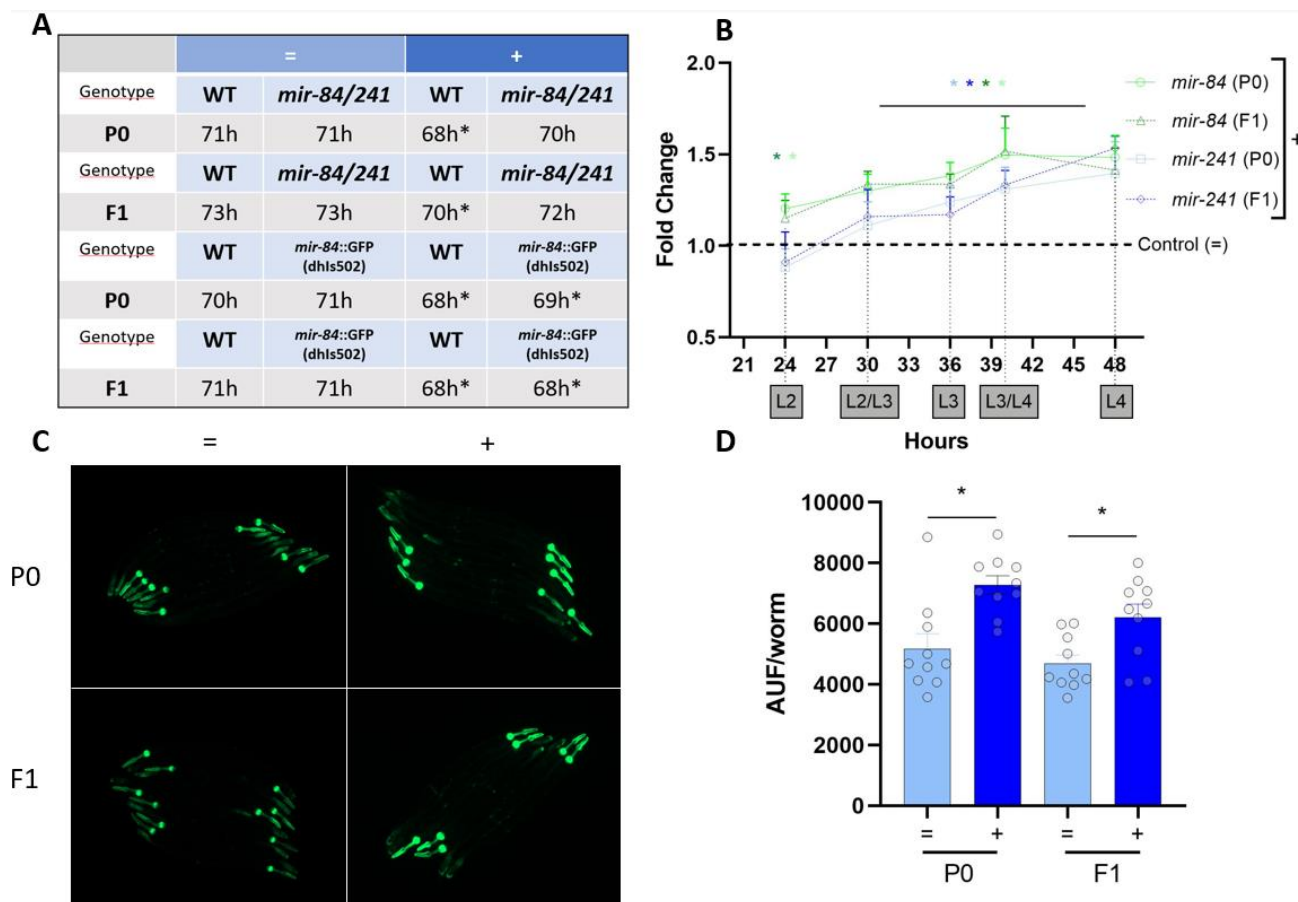
Levando em conta o fato de que animais com *pash-1* silenciado em P0 ainda expressam o fenótipo em F1 (**Figura 3A**) e que DAF-12, um regulador da expressão dos miRNAs *let-7-fam*, é necessário para a expressão do fenótipo em P0 mas não para a passagem do mesmo para F1 (**Figura 3F**), o papel destes RNAs não codificantes parece ser necessário e/ou suficiente para a expressão do fenótipo em uma dada geração, mas o mesmo não pode ser dito para a transmissão do mesmo. De acordo, observamos que, dentre três mutantes duplos para *let-7-fam*, apenas um foi capaz de influenciar nosso fenótipo, *mir-84/241*, e este o fez fenocopiando o silenciamento de *pash-1* (**Figura 4A**), mais uma vez não sendo capaz de inibir a transmissão do fenótipo e apenas sua aquisição/expressão. Quando consideramos o fato de que a expressão de *mir-84* e *mir-241* é temporalmente controlada para permitir a muda de L2 para e L3 e, sequencialmente, regular *let-7* na muda final de L4 para o estágio adulto, decidimos mensurar os níveis desses dois miRNAs em tempos específicos desde o estágio larval L2 até o estágio adulto. A **Figura 4B** mostra que em ambas P0 e F1 há expressão diferencial entre o grupo exposto a altas concentrações de colesterol e o controle, sobretudo de *mir-84* desde as primeiras horas do estágio larval L2, com discreto aumento de *mir-241* algumas horas mais tarde, próximo à muda L2/L3. Esse aumento segue se acentuando até o último ponto aferido, no estágio larval L4, sendo que não parece haver diferença de tendência ou de valores absolutos entre as

diferentes gerações. Confirmamos os dados de expressão com um repórter GFP de *mir-84*, o qual teve expressão diferencial mais acentuada, onde é observável a maior expressão desse miRNA em ambas P0 e F1 expostas a maiores concentrações de colesterol (**Figura 4C e D**). Porém, a expressão deste repórter não foi capaz de fenocopiar a exposição às maiores concentrações de colesterol por si só, mesmo sendo um construto funcional [assim a inserção desta cópia extra no genoma (no mínimo uma cópia é inserida, o número é variável e aleatório) deveria constituir uma superexpressão funcional] (**Figura 4A**). Assim *mir-84* parece ser necessário para a aquisição/expressão do fenótipo, mas não o suficiente para causá-lo, uma vez que a falta deste (em conjunto com *mir-241*) inibe a expressão do fenótipo, mas sua superexpressão não o recapitula. Esse resultado sugere que, epistaticamente, deve haver outro elemento à jusante dos miRNAs.



**Figura 3.** O fenótipo de desenvolvimento acelerado depende de miRNAs e pode estar associado à sua regulação transcricional. A) Tempo de desenvolvimento médio apresentado em horas. A comparação estatística foi conduzida entre o mesmo RNAi nas diferentes condições (= e +). A segunda célula da primeira coluna indica que o silenciamento se deu na mesma geração em que o ensaio de desenvolvimento foi conduzido. A quinta linha da primeira coluna indica que o silenciamento ocorreu em P0 e o ensaio em F1. Quatro replicatas biológicas para cada grupo, sendo cada uma composta por uma replicata experimental. B) Animais transgênicos para *scmp::GFP* (seam cells) (50ms de exposição). O número médio de seam cells de 50 animais por grupo está representado abaixo das imagens. Uma replicata biológica. C) Número de animais em diferentes estágios com 36h de idade. A comparação estatística foi feita dentro dos mesmos estágios larvais no mesmo RNAi entre as diferentes condições (= e +). Duas replicatas biológicas, sendo cada uma composta por uma replicata experimental. D) Expressão relativa de mRNA de *pash-1*, *dcr-1* e *alg-1*. Cinco replicatas biológicas, sendo cada uma composta por 2 replicatas experimentais. E) Expressão relativa de mRNA de *daf-12*, *din-1* e *daf-9*. Cinco replicatas biológicas, sendo cada uma composta por duas replicatas experimentais. F) Tempo de desenvolvimento médio apresentado em horas. Duas replicatas biológicas, sendo cada uma composta por uma replicata experimental. + indica animais expostos

a maiores níveis de colesterol (P0) ou descendentes de pais que foram (F1). = indica animais criados em condições normais em todas as gerações. \* indica diferença estatística evidenciada por um  $p < 0.05$ , pelo menos. Linhas entre dois grupos indicam comparação estatística feita entre os mesmos.



**Figura 4.** A expressão de miRNAs é necessária, mas não suficiente para o fenótipo de desenvolvimento acelerado. A) Tempo de desenvolvimento médio apresentado em horas para nocautes *mir-84/241* e vermes transgênicos *vit-2::GFP*. Quatro replicatas biológicas para *mir84/241* e três para *mir-84::GFP*, cada uma composta por uma replicata experimental. B) Expressão relativa de *mir-84* e *mir-241* em animais P0 e F1 expostos às maiores concentrações de colesterol em diferentes estágios larvais. Quatro replicatas biológicas, cada uma composta de três replicatas experimentais. A comparação estatística se deu entre os grupos mostrados e seus respectivos controles individuais (mesmo miRNA em comparação com o grupo criado em condições normais =). Embora cada grupo controle seja diferente, aqui todos estão representados pela linha tracejada, já que a média aritmética de todas as replicatas é igual à 1. C) Imagem representativa do repórter tradicional de *mir-84::GFP* (100ms de exposição). D) Mensuração dos níveis de expressão do repórter tradicional *mir-84::GFP* em grupos de 7-10 vermes entre 10 imagens obtidas a partir de duas replicatas biológicas no mesmo dia. + indica animais expostos a maiores níveis de colesterol (P0) ou descendentes de pais que foram (F1). = indica animais criados em condições normais em todas as gerações. \* indica diferença estatística evidenciada por um  $p < 0.05$ , pelo menos. Linhas entre dois grupos indicam comparação estatística feita entre os mesmos.

Por outro lado, *vit-2/YP170B* poderia ser tanto um potencial efetor do fenótipo de desenvolvimento acelerado quanto de sua transmissão, uma vez que uma maior provisão desta

causa desenvolvimento acelerado na progênie de mães mais velhas e também por sua expressão ser controlada por diversos fatores ambientais, sendo passada diretamente à progênie (23,24). Assim, resolvemos silenciar *vit-2* para definirmos se sua maior expressão em P0 e F1 é causal para o fenótipo de desenvolvimento acelerado e também definir se poderia estar envolvida com a herança do mesmo. A **Figura 5A** mostra que o silenciamento de *vit-2* é capaz de suprimir o fenótipo em qualquer uma das condições, seja em P0, em F1 ou em F1 quando feito em P0. Ainda, a superexpressão de *vit-2*/YP170B no animal repórter traducional (o repórter transcreve uma cópia completa e funcional de YP170B endógena) fenocopia a exposição aos altos níveis de colesterol, ou seja, o grupo controle destes animais tem desenvolvimento acelerado. Assim, nossos resultados sugerem que *vit-2*/YP170B é necessária e suficiente para a expressão do fenótipo de desenvolvimento acelerado observado, além de ser necessária também para a herança do mesmo pela geração F1.

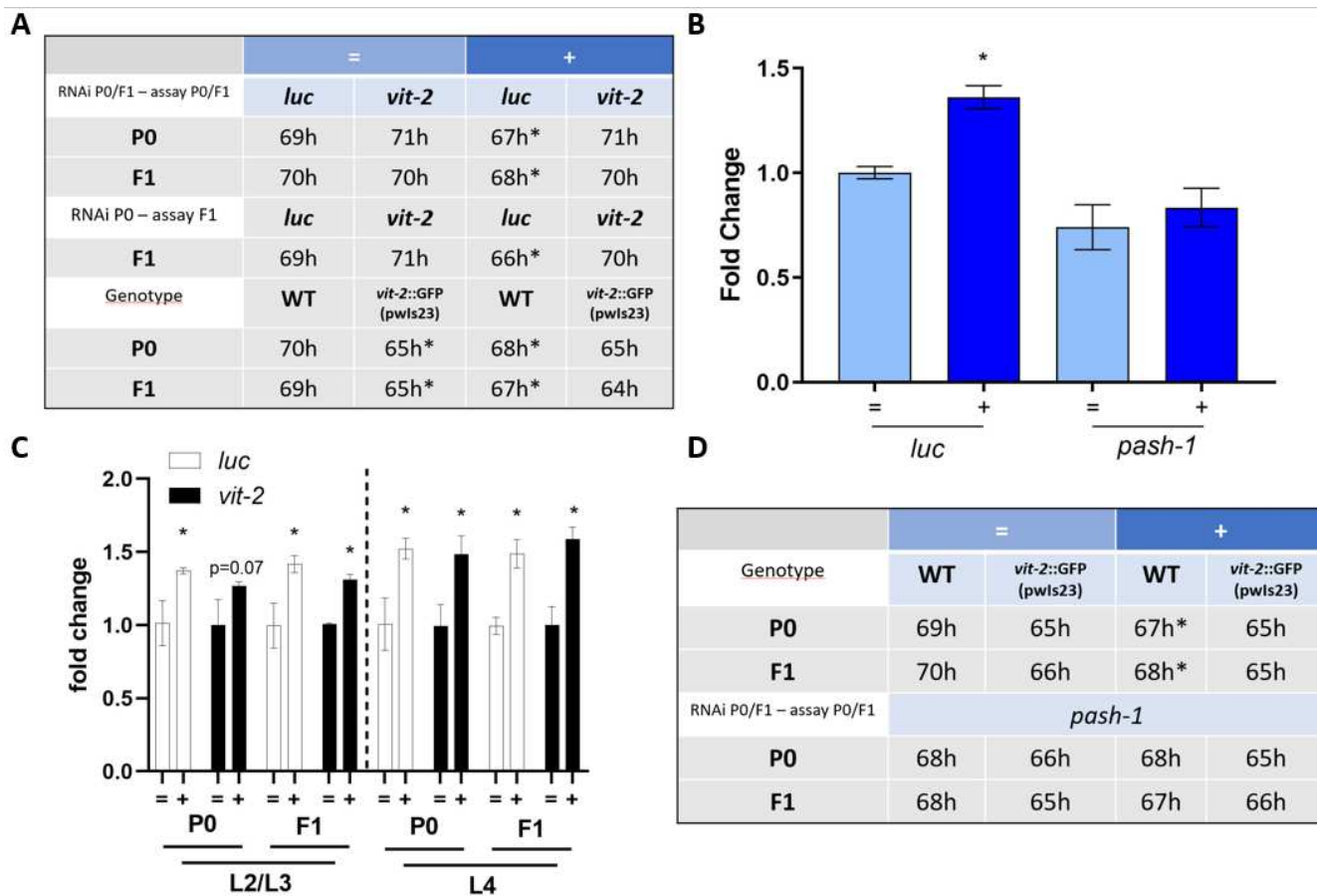
Em busca de aferir se poderia haver alguma forma de conversa entre ambos os elementos até aqui identificados como necessários para a aquisição/expressão de fenótipo de desenvolvimento acelerado induzido por altas concentrações de colesterol, e considerando que miRNAs controlam diretamente a expressão de diversos alvos, silenciamos *pash-1* e aferimos a expressão do mRNA de *vit-2*. A **Figura 5B** mostra que a superexpressão de *vit-2* em F1 é perdida quando *pash-1* é silenciado nessa mesma geração. Uma rápida análise de predição de alvos online (TargetScan Worm - <http://www.targetscan.org/worm> 52/) não identificou nenhum sítio de ligação para *let-7-fam* na região 3'UTR de *vit-2*. De forma geral, a maior força por trás da ligação de miRNAs com seus alvos é a região “seed” na porção inicial de suas sequências, porém a região 3' também pode contribuir para a ligação diferencial de alguns miRNAs dentro da mesma família (74) e não costuma ser considerada por ferramentas de predição simples como a que empregamos. Assim, embora haja regulação da expressão de *vit-2*/YP170B por miRNAs, esta poderia ser indireta ou se dar através de outros miRNAs que não *let-7-fam*. Por outro lado, o silenciamento de *vit-2* em P0 e F1 não inibe a maior expressão de *mir-84* no período próximo a muda L2/L3 e no animal L4 (**Figura 5C**). Finalmente, o silenciamento de *pash-1* em F1 e P0 no animal repórter para *vit-2*/YP170B (superexpressão de *vit-2*) não é capaz de resgatar o fenótipo de desenvolvimento acelerado deste animal (**Figura 5D**), sugerindo que mesmo com deficiência de miRNAs, a superexpressão de *vit-2*/YP170B é suficiente para gerar o fenótipo e sua herança. De modo geral, podemos concluir que miRNAs estariam à montante de *vit-2*/YP170B no caminho que leva à expressão e herança do fenótipo de desenvolvimento acelerado.



Interessantemente, animais com superexpressão de *vit-2* expostos a maiores níveis de colesterol não aceleram seu desenvolvimento (**Figura 5A e 5D**). Portanto, essa falta de efeito aditivo sugere que não há uma via paralela de ação para colesterol que não inclua *vit-2/YP170B* no tocante à indução do desenvolvimento acelerado, pois se este fosse o caso a exposição ao colesterol induziria desenvolvimento ainda mais acelerado. Soma-se a isso o fato de que não há diferença estatística entre o grupo controle e aquele onde *pash-1* foi silenciado nos animais com superexpressão de *vit-2/YP170B* (**Figura 5D**). Embora a superexpressão de *vit-2* seja o suficiente para a expressão do fenótipo de forma independente de miRNAs, sua maior expressão endógena quando da exposição aos maiores níveis de colesterol deve ser resultado de alguma regulação ligada a miRNAs, já que o *knockdown* de *pash-1* e *mir-84/241* abolem o fenótipo (**Figura 3A e 4A**). É necessário notar que para nossa hipótese ser verdadeira, outros fatores, possivelmente miRNAs, deveriam se somar à *mir-84* para regular positivamente *vit-2*, visto que somente a superexpressão do primeiro não leva ao fenótipo de desenvolvimento acelerado (**Figura 4A**). Infelizmente não tivemos acesso à outros transgenes, como por exemplo *mir-241::GFP*, para verificar se a superexpressão um ou mais miRNAs sozinhos ou em conjunto poderiam fenocopiar o desenvolvimento acelerado e a superexpressão de *vit-2/YP170B*.

Infelizmente não conseguimos aferir se a superexpressão de *vit-2* resgata o fenótipo dos animais mutantes para *mir-84/241* a cimentar a posição à montante do primeiro em relação ao último, pois o transgene (pwIs23) está inserido no mesmo cromossomo em que a mutação (n4315;n4017) se localiza (cruzamentos que se baseiam em crossing-over demandam tempo que, devido às circunstâncias atuais, não dispusemos). No mesmo sentido, também não conseguimos fenocopiar o desenvolvimento acelerado apenas superexpressando *mir-84*, sendo que temos no *mir-241* o candidato mais plausível a ser testado, porém no momento não dispomos deste transgene no laboratório. Adicionalmente, o papel de DAF-12 em F1 deve ser averiguado, pois se confirmado, apontaria para um papel desse elemento responsivo a colesterol na expressão do fenótipo em F1 e reforçaria seu papel como o regulador da expressão de *let-7-fam* no nosso fenótipo. Por outro lado, uma negativa sugeriria que o mesmo fenótipo poderia ser expresso de formas diferentes nas duas gerações, onde *let-7-fam* poderia ser regulado por diferentes elementos entre as gerações. Portanto, no presente momento nossos dados podem apenas sugerir que miRNAs, tais como *mir-84* e possivelmente outros *let-7-fam*, estão à montante de *vit-2* para induzir o fenótipo observado, o que vai em encontro ao fato de que *let-7* na hipoderme é capaz de controlar a vitelogênese (majoritariamente *vit-3/YP170A*, mas alguns experimentos também foram conduzidos com o repórter de *vit-2*) no intestino por meio de um mecanismo que envolve TORC2, SGK-1 e PQM-1 (27). Finalmente, o único elemento

capaz de influenciar a herança do fenótipo parece ser *vit-2*/YP170B, porém a forma como este o faz ainda não pôde ser discriminado pelos nossos dados.



**Figura 5.** miRNAs parecem estar upstream do efector do fenótipo de desenvolvimento acelerado, *vit-2*/YP170B. A) Tempo de desenvolvimento médio apresentado em horas para vermes WT em RNAi para *vit-2* e transgênicos *vit-2*::GFP. Três replicatas biológicas para *vit-2* e duas para *vit-2*::GFP, sendo cada uma composta de uma replicata experimental. No caso de *vit-2*::GFP, além da comparação do grupo + com =, há também a comparação entre WT e transgênico no grupo não exposto às maiores concentrações de colesterol. B) Expressão relativa do mRNA de *vit-2* em F1 em animais onde *pash-1* foi silenciado nesta mesma geração. Quatro replicatas biológicas, sendo cada uma composta de 2 replicatas experimentais. A comparação estatística foi feita entre os grupos + e – dentro de um mesmo RNAi. C) Expressão de *mir-84* em animais onde *vit-2* foi silenciado em P0 e F1 e medido nestas mesmas gerações em dois momentos distintos: na transição L2/L3 e em L4. Quatro replicatas biológicas, onde cada uma é composta por duas replicatas experimentais. As comparações estatísticas foram feitas dentro mesmo RNAi entre os grupos = e +. D) Tempo de desenvolvimento médio apresentado em horas para vermes WT e *vit-2*::GFP onde *pash-1* foi silenciado em P0 e F1 e o ensaio de desenvolvimento foi conduzido nestas mesmas gerações. Três replicatas biológicas, onde cada uma é composta por uma replicata experimental. + indica animais expostos a maiores níveis de colesterol (P0) ou descendentes de pais que foram (F1). = indica animais criados em condições normais em todas as gerações. \* indica diferença estatística evidenciada por um  $p < 0.05$ , pelo menos. Linhas entre dois grupos indicam comparação estatística feita entre os mesmos.

Deste modo, nós sugerimos que o elemento decisivo para a herança poderia ser o próprio colesterol ou algum derivado, como os ácidos dafacrônicos, herdados de P0 para F1 dentro do vitelo. Embora o colesterol dentro desse complexo componha a menor porção de seus constituintes (<1%) (16), a sua capacidade de gerar ligantes para DAF-12, um ativador transcricional de *let-7-fam*, faz com que essa hipótese seja factível, uma vez que observamos superexpressão de *daf-9* e *din-1* em P0. O fato destes genes não estarem superexpressos em F1 (e de não termos testado a importância de DAF-12 em F1 quando silenciado nesta mesma geração) não nos permite fazer qualquer afirmação, mas apenas sugerir este mecanismo. Alternativamente, outros componentes não derivados do colesterol no vitelo também poderiam estar diferencialmente mobilizados em F1, como por exemplo triacilgliceróis, os quais constituem cerca de 25% do complexo vitelo (16) e estão presentes em maiores quantidades em ambas P0 e F1 segundo nossos dados. Ambos ácidos linoleico e esteárico podem encurtar o tempo de vida de *C. elegans* e modificar o tamanho do corpo dos nematoides (75). Além disso, ácidos graxos poli-insaturados ômega-6 controlam o acúmulo de vitelo no pseudoceloma de *C. elegans* (76). Porém, para a nossa hipótese se confirmar, a ausência de *vit-2* no vitelo não poderia comprometer sua capacidade de transportar a molécula mediadora da herança (seja ela colesterol, ácidos graxos ou qualquer outra), pois nossos resultados mostram que o *knockdown* de *vit-2* em F1 não inibe pelo menos os primeiros passos que levam ao nosso fenótipo, no caso a superexpressão de *mir-84* (e potencialmente de outros miRNAs) (**Figura 5C**), sugestivo de que mesmo sem *vit-2* o elemento mediador da herança foi passado. O fato de o *knockdown* de *vit-2* abolir o fenótipo independente da superexpressão de *mir-84* reforça a posição à jusante do primeiro em relação ao último.

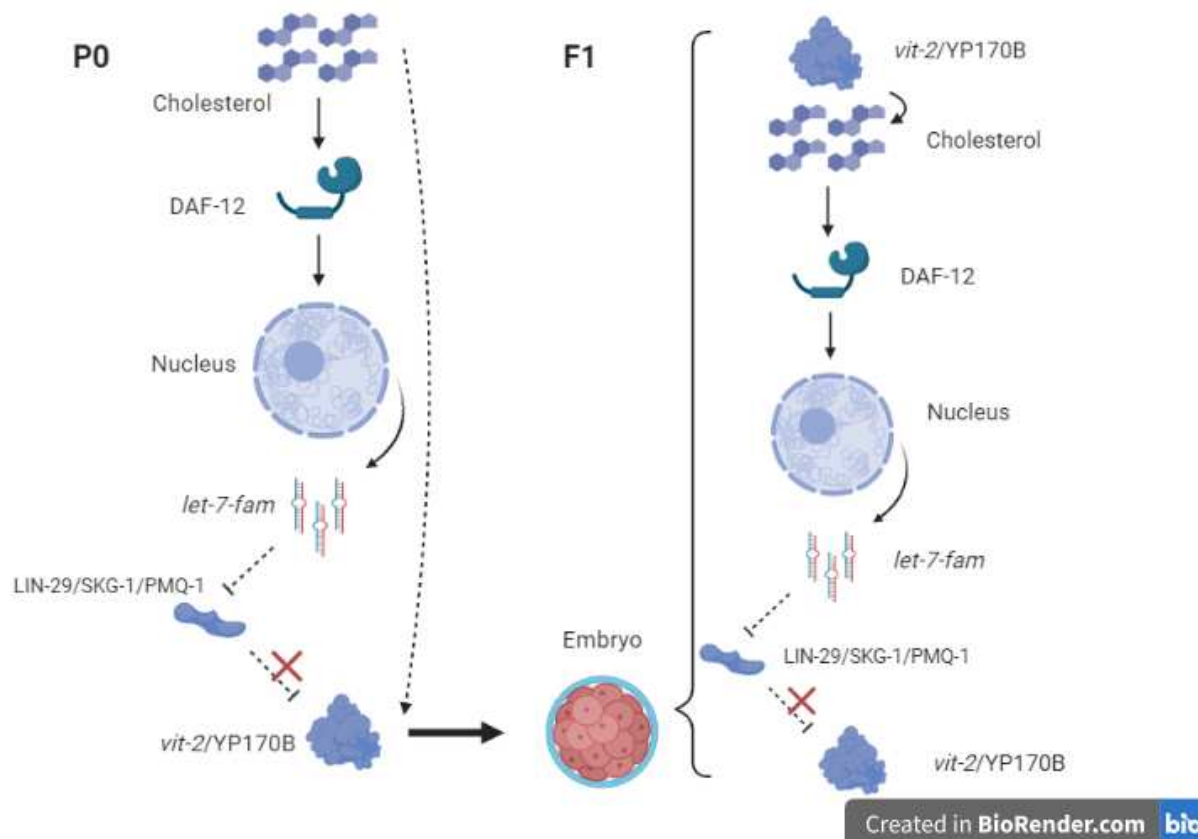
## 6. Conclusões e Hipótese Atual

Em resumo, nosso trabalho concluiu que:

- Colesterol induz diversos fenótipos que podem ser herdados por pelo menos uma geração;
- O fenótipo de desenvolvimento acelerado parece ser devido à produção aumentada de proteínas do vitelo, sobretudo *vit-2/YP170B*;
- A maior expressão de *vit-2/YP170B* é regulada, provavelmente de forma indireta, por um ou mais membros da família *let-7* de miRNAs;
- Desta forma, ambos *vit-2* e *mir-84/mir-241* desempenham papéis fundamentais na expressão do fenótipo de desenvolvimento acelerado, sendo que o primeiro também é requerido para sua herança.

De forma mais específica, nosso trabalho identificou um fenótipo de desenvolvimento acelerado induzido por altas concentrações de colesterol que pode ser herdado de maneira intergeracional. Nossos dados apontaram que a expressão do fenótipo em ambas as gerações P0 e F1 depende, finalmente, de uma maior expressão de vitelogenina, sobretudo de *vit-2/YP170B*, com papéis não explorados para *vit-3/YP170A* e *vit-6/YP88* e YP115 em P0. Nós hipotetizamos que a expressão de miRNAs (e aqui estudamos principalmente *mir-84*) é capaz de regular positivamente a expressão de *vit-2/YP170B*, provavelmente de forma indireta por mecanismos aqui não explorados, mas já sugeridos na literatura. Além disso, a forma com que esse fenótipo é herdado para a geração F1 parece também ser dependente de *vit-2/YP170B*, mas não da expressão de miRNAs no momento da exposição ao colesterol. Isso sugere que, embora seja necessária a maior expressão de *mir-84* e/ou um grupo de miRNAs para que haja superexpressão de *vit-2/YP170* em uma dada geração, a passagem desses miRNAs de uma geração para outra não parece ser importante para a propagação do fenótipo.

Alternativamente, nós sugerimos que algum elemento herdado dentro do complexo de vitelo poderia ser o responsável por iniciar a expressão em F1 do mesmo fenótipo iniciado em P0 por colesterol. Nossos dados sugerem, ainda que de maneira discreta, que esse elemento poderia ser o próprio colesterol ou algum derivado, pois o mesmo é capaz de regular elementos que diretamente influenciariam na expressão de miRNAs, como DAF-12. Um resumo da nossa hipótese atual é mostrado na **Figura 6**.



**Figura 6.** Hipótese atual que atribuí um papel de efetor e transmissor da herança à *vit-2/YP170B* e a miRNAs membros da *let-7-fam* o papel de reguladores da expressão desta vitelogenina. Sugerimos que maiores quantidades de colesterol ou derivados são incorporados no vitelo, que é passado e reinicia a resposta que leva ao desenvolvimento acelerado em F1.

## 7. Perspectivas futuras

Nos resta elucidar qual ou quais elemento(s) estariam sendo diretamente transmitidos e iniciando o programa que leva ao desenvolvimento acelerado em F1, além de determinar qual ou quais miRNAs podem efetivamente reproduzir o fenótipo de desenvolvimento acelerado por si só(s) através da regulação positiva de *vit-2/YP170B*. Adicionalmente, o laço que DAF-12 constitui entre o colesterol e a maior expressão de miRNAs precisa ser estreitado com experimentos que demonstrem sua importância em F1 e a tentativa de reproduzir nossos achados com ligantes de DAF-12 adicionados à dieta.

## 8. Referências

1. Martins IJ, Hone E, Foster JK, Sünram-Lea SI, Gnjec A, Fuller SJ, et al. Apolipoprotein E, cholesterol metabolism, diabetes, and the convergence of risk factors for Alzheimer's disease and cardiovascular disease. *Molecular Psychiatry*. 2006.
2. LA W. Where does fetal and embryonic cholesterol originate and what does it do? *Annu Rev Nutr*. 2008;
3. Lupattelli G, De Vuono S, Mannarino E. Patterns of cholesterol metabolism: Pathophysiological and therapeutic implications for dyslipidemias and the metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* [Internet]. 2011 Sep;21(9):620–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939475311001050>
4. Nomura S, Shouzu A, Omoto S, Inami N, Tanaka A, Nanba M, et al. Correlation between adiponectin and reduction of cell adhesion molecules after pitavastatin treatment in hyperlipidemic patients with type 2 diabetes mellitus. *Thromb Res* [Internet]. 2008 Jan;122(1):39–45. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049384807003313>
5. Huffman DM, Barzilai N. Role of visceral adipose tissue in aging. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 2009.
6. Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55 000 vascular deaths. *Lancet* [Internet]. 2007 Dec;370(9602):1829–39. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673607617784>
7. Philip W, James T. Obesity—a modern pandemic: the burden of disease. *Endocrinol y Nutr* [Internet]. 2013 Jan;60:3–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1575092213700159>
8. Srinivasan S. Regulation of body fat in *Caenorhabditis elegans*. *Annu Rev Physiol*. 2015;
9. Xu N, Zhang SO, Cole RA, McKinney SA, Guo F, Haas JT, et al. The FATP1-DGAT2 complex facilitates lipid droplet expansion at the ER-lipid droplet interface. *J Cell Biol*. 2012;
10. Mak HY. Lipid droplets as fat storage organelles in *Caenorhabditis elegans*. *J Lipid Res*

- [Internet]. 2012 Jan;53(1):28–33. Available from: <http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.R021006>
11. O'Rourke EJ, Soukas AA, Carr CE, Ruvkun G. C. elegans Major Fats Are Stored in Vesicles Distinct from Lysosome-Related Organelles. *Cell Metab.* 2009;
  12. Motola DL, Cummins CL, Rottiers V, Sharma KK, Li T, Li Y, et al. Identification of Ligands for DAF-12 that Govern Dauer Formation and Reproduction in *C. elegans*. *Cell.* 2006;
  13. Hammell CM, Karp X, Ambros V. A feedback circuit involving let-7-family miRNAs and DAF-12 integrates environmental signals and developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 2009 Nov 3;106(44):18668–73. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0908131106>
  14. Bethke A, Fielenbach N, Wang Z, Mangelsdorf DJ, Antebi A. Nuclear hormone receptor regulation of microRNAs controls developmental progression. *Science [Internet]*. 2009 Apr 3;324(5923):95–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19342589>
  15. Zhang P, Na H, Liu Z, Zhang S, Xue P, Chen Y, et al. Proteomic study and marker protein identification of *Caenorhabditis elegans* lipid droplets. *Mol Cell Proteomics.* 2012;
  16. Kubagawa HM, Watts JL, Corrigan C, Edmonds JW, Sztul E, Browse J, et al. Oocyte signals derived from polyunsaturated fatty acids control sperm recruitment in vivo. *Nat Cell Biol.* 2006;
  17. Hall DH, Winfrey VP, Blaeuer G, Hoffman LH, Furuta T, Rose KL, et al. Ultrastructural features of the adult hermaphrodite gonad of *Caenorhabditis elegans*: Relations between the germ line and soma. *Dev Biol.* 1999;
  18. Grant B, Hirsh D. Receptor-mediated endocytosis in the *Caenorhabditis elegans* oocyte. *Mol Biol Cell.* 1999;
  19. Ezcurra M, Benedetto A, Sornda T, Gilliat AF, Au C, Zhang Q, et al. *C. elegans* Eats Its Own Intestine to Make Yolk Leading to Multiple Senescent Pathologies. *Curr Biol.* 2018;
  20. Rompay L Van, Borghgraef C, Beets I, Caers J, Temmerman L. New genetic regulators

- question relevance of abundant yolk protein production in *C. Elegans*. *Sci Rep*. 2015;
21. Bossinger O, Schierenberg E. The use of fluorescent marker dyes for studying intercellular communication in nematode embryos. *Int J Dev Biol*. 1996;
  22. Chotard L, Skorobogata O, Sylvain MA, Shrivastava S, Rocheleau CE. TBC-2 is required for embryonic yolk protein storage and larval survival during L1 diapause in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*. 2010;
  23. Perez MF, Francesconi M, Hidalgo-Carcedo C, Lehner B. Maternal age generates phenotypic variation in *C. elegans* Europe PMC Funders Group. *Nature*. 2017;
  24. Perez MF, Lehner B. Vitellogenins - Yolk Gene Function and Regulation in *Caenorhabditis elegans*. *Frontiers in Physiology*. 2019.
  25. DePina AS, Iser WB, Park S-S, Maudsley S, Wilson MA, Wolkow CA. Regulation of *Caenorhabditis elegans* vitellogenesis by DAF-2/IIS through separable transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *BMC Physiol* [Internet]. 2011 Jul 12;11:11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21749693>
  26. Goszczynski B, Captan V V, Danielson AM, Lancaster BR, McGhee JD. A 44 bp intestine-specific hermaphrodite-specific enhancer from the *C. elegans* vit-2 vitellogenin gene is directly regulated by ELT-2, MAB-3, FKH-9 and DAF-16 and indirectly regulated by the germline, by daf-2/insulin signaling and by the TGF- $\beta$ /Sma/Mab pa. *Dev Biol* [Internet]. 2016 May 1;413(1):112–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26963674>
  27. Downen RH, Breen PC, Tullius T, Conery AL, Ruvkun G. A microRNA program in the *C. elegans* hypodermis couples to intestinal mTORC2/PQM-1 signaling to modulate fat transport. *Genes Dev* [Internet]. 2016;30(13):1515–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27401555>
  28. Perez MF, Lehner B. Intergenerational and transgenerational epigenetic inheritance in animals. *Nature Cell Biology*. 2019.
  29. Wahl S, Drong A, Lehne B, Loh M, Scott WR, Kunze S, et al. Epigenome-wide association study of body mass index, and the adverse outcomes of adiposity. *Nature* [Internet]. 2017 Jan 21;541(7635):81–6. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature20784>



30. Demerath EW, Guan W, Grove ML, Aslibekyan S, Mendelson M, Zhou YH, et al. Epigenome-wide association study (EWAS) of BMI, BMI change and waist circumference in African American adults identifies multiple replicated loci. *Hum Mol Genet.* 2015;
31. Dick KJ, Nelson CP, Tsaprouni L, Sandling JK, Aïssi D, Wahl S, et al. DNA methylation and body-mass index: A genome-wide analysis. *Lancet.* 2014;
32. Fullston T, Ohlsson-Teague EMC, Print CG, Sandeman LY, Lane M. Sperm microRNA Content Is Altered in a Mouse Model of Male Obesity, but the Same Suite of microRNAs Are Not Altered in Offspring's Sperm. *PLoS One* [Internet]. 2016;11(11):e0166076. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27814400>
33. Fullston T, Ohlsson Teague EMC, Palmer NO, DeBlasio MJ, Mitchell M, Corbett M, et al. Paternal obesity initiates metabolic disturbances in two generations of mice with incomplete penetrance to the F2 generation and alters the transcriptional profile of testis and sperm microRNA content. *FASEB J* [Internet]. 2013 Oct;27(10):4226–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23845863>
34. de Castro Barbosa T, Ingerslev LR, Alm PS, Versteijhe S, Massart J, Rasmussen M, et al. High-fat diet reprograms the epigenome of rat spermatozoa and transgenerationally affects metabolism of the offspring. *Mol Metab* [Internet]. 2016 Mar;5(3):184–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26977389>
35. Ebert MS, Sharp PA. Roles for MicroRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell.* 2012.
36. Kutter C, Svoboda P. miRNA, siRNA, piRNA: Knowns of the unknown. In: *RNA Biology.* 2008.
37. Huang Y, Zhang JL, Yu XL, Xu TS, Wang Z Bin, Cheng XC. Molecular functions of small regulatory noncoding RNA. *Biochemistry (Moscow).* 2013.
38. Devanapally S, Ravikumar S, Jose AM. Double-stranded RNA made in *C. Elegans* neurons can enter the germline and cause transgenerational gene silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;
39. de Albuquerque BFM, Placentino M, Ketting RF. Maternal piRNAs Are Essential for Germline Development following De Novo Establishment of Endo-siRNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Cell.* 2015;

40. Marré J, Traver EC, Jose AM. Extracellular RNA is transported from one generation to the next in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;
41. Shen Y, Wollam J, Magner D, Karalay O, Antebi A. A steroid receptor-microRNA switch regulates life span in response to signals from the gonad. *Science* [Internet]. 2012 Dec 14;338(6113):1472–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23239738>
42. Bethke A, Fielenbach N, Wang Z, Mangelsdorf DJ, Adam A. Nuclear hormone receptor regulation of microRNAs controls developmental progression. *Science* (80- ). 2009;
43. Deiuiliis JA. MicroRNAs as regulators of metabolic disease: Pathophysiologic significance and emerging role as biomarkers and therapeutics. *International Journal of Obesity*. 2016.
44. Dumortier O, Hinault C, Gautier N, Patouraux S, Casamento V, Obberghen V. Maternal protein restriction leads to pancreatic failure in offspring: Role of misexpressed microRNA-375. *Diabetes*. 2014;
45. Kilic ID, Dodurga Y, Uludag B, Alihanoglu YI, Yildiz BS, Enli Y, et al. microRNA -143 and -223 in obesity. *Gene* [Internet]. 2015 Apr;560(2):140–2. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111915000785>
46. Mori MA, Thomou T, Boucher J, Lee KY, Lallukka S, Kim JK, et al. Altered miRNA processing disrupts brown/white adipocyte determination and associates with lipodystrophy. *J Clin Invest*. 2014;124(8):3339–51.
47. Berger A, Ziv-Gal A, Cudiamat J, Wang W, Zhou C, Flaws JA. The effects of in utero bisphenol A exposure on the ovaries in multiple generations of mice. *Reprod Toxicol*. 2016;
48. Rissman EF, Adli M. Minireview: Transgenerational epigenetic inheritance: Focus on endocrine disrupting compounds. *Endocrinology*. 2014.
49. Gapp K, Jawaid A, Sarkies P, Bohacek J, Pelczar P, Prados J, et al. Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice. *Nat Neurosci*. 2014;
50. Rechavi O, Minevich G, Hobert O. Transgenerational inheritance of an acquired small RNA-based antiviral response in *C. elegans*. *Cell*. 2011;

51. Rechavi O, Houry-Ze'evi L, Anava S, Goh WSS, Kerk SY, Hannon GJ, et al. Starvation-induced transgenerational inheritance of small RNAs in *C. elegans*. *Cell*. 2014;
52. Sethupathy S, Vigneshwari L, Valliammai A, Balamurugan K, Pandian SK. L-Ascorbyl 2,6-dipalmitate inhibits biofilm formation and virulence in methicillin-resistant: *Staphylococcus aureus* and prevents triacylglyceride accumulation in *Caenorhabditis elegans*. *RSC Adv*. 2017;
53. Bradford MM. Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*. 1976;
54. Hamlin BJ, Rong J, Tan M-W. Systematic dissection of *Caenorhabditis elegans* innate immunity using RNAi. *International Worm Meeting*. 2003.
55. Roncato JFF, Camara D, Brussulo Pereira TC, Quines CB, Colomé LM, Denardin C, et al. Lipid reducing potential of liposomes loaded with ethanolic extract of purple pitanga (*Eugenia uniflora*) administered to *Caenorhabditis elegans*. *J Liposome Res*. 2019;
56. Magner DB, Wollam J, Shen Y, Hoppe C, Li D, Latza C, et al. The NHR-8 nuclear receptor regulates cholesterol and bile acid homeostasis in *C. elegans*. *Cell Metab*. 2013;
57. Sohal RS. The Rate of Living Theory: A Contemporary Interpretation. In: *Insect Aging*. 1986.
58. Williams GC. Pleiotropy, Natural Selection, and the Evolution of Senescence. *Evolution* (N Y). 1957;
59. Antebi A. Nuclear receptor signal transduction in *C. elegans*. *WormBook* [Internet]. 2015 Jun 9;1–49. Available from: [http://www.wormbook.org/chapters/www\\_nuclearhormonerecep.2/nucleceptor.html](http://www.wormbook.org/chapters/www_nuclearhormonerecep.2/nucleceptor.html)
60. Kaati G, Bygren LO, Pembrey M, Sjöström M. Transgenerational response to nutrition, early life circumstances and longevity. *Eur J Hum Genet*. 2007;
61. Harris A, Seckl J. Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease. *Horm Behav* [Internet]. 2011 Mar;59(3):279–89. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0018506X10001674>
62. Whitelaw NC, Whitelaw E. Transgenerational epigenetic inheritance in health and disease. *Current Opinion in Genetics and Development*. 2008.
63. Youngson NA, Whitelaw E. Transgenerational Epigenetic Effects. *Annu Rev Genomics*

- Hum Genet [Internet]. 2008 Sep;9(1):233–57. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.genom.9.081307.164445>
64. Carone BR, Fauquier L, Habib N, Shea JM, Hart CE, Li R, et al. Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell*. 2010;
  65. Ng SF, Lin RCY, Laybutt DR, Barres R, Owens JA, Morris MJ. Chronic high-fat diet in fathers programs  $\beta$  2-cell dysfunction in female rat offspring. *Nature*. 2010;
  66. Kimble J, Sharrock WJ. Tissue-specific synthesis of yolk proteins in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*. 1983;
  67. Liang V, Ullrich M, Lam H, Chew YL, Banister S, Song X, et al. Altered proteostasis in aging and heat shock response in *C. elegans* revealed by analysis of the global and de novo synthesized proteome. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2014 Sep;71(17):3339–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24458371>
  68. Abbott AL, Alvarez-Saavedra E, Miska EA, Lau NC, Bartel DP, Horvitz HR, et al. The let-7 MicroRNA Family Members mir-48, mir-84, and mir-241 Function Together to Regulate Developmental Timing in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Cell* [Internet]. 2005 Sep;9(3):403–14. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580705002893>
  69. MC T, G M, AD W, IL J, CB S, AP P. *Caenorhabditis elegans* exoskeleton collagen COL-19: an adult-specific marker for collagen modification and assembly, and the analysis of organismal morphology. *Dev Dyn*. 2003;
  70. Ji YJ, Wang J. Heterochronic Phenotype Analysis of Hypodermal Seam Cells in *Caenorhabditis elegans*. *Bio-protocol* [Internet]. 2019 Jan 5;9(1). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30792567>
  71. Abrahante JE, Daul AL, Li M, Volk ML, Tennessen JM, Miller EA, et al. The *Caenorhabditis elegans* hunchback-like gene *lin-57/hbl-1* controls developmental time and is regulated by microRNAs. *Dev Cell* [Internet]. 2003 May;4(5):625–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12737799>
  72. Grosshans H, Johnson T, Reinert KL, Gerstein M, Slack FJ. The temporal patterning microRNA *let-7* regulates several transcription factors at the larval to adult transition in *C. elegans*. *Dev Cell* [Internet]. 2005 Mar;8(3):321–30. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15737928>

73. Ludewig AH, Kober-Eisermann C, Weitzel C, Bethke A, Neubert K, Gerisch B, et al. A novel nuclear receptor/coregulator complex controls *C. elegans* lipid metabolism, larval development, and aging. *Genes Dev* [Internet]. 2004 Sep 1;18(17):2120–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15314028>
74. Broughton JP, Lovci MT, Huang JL, Yeo GW, Pasquinelli AE. Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. *Mol Cell* [Internet]. 2016;64(2):320–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27720646>
75. Wang X, Zhang L, Zhang L, Wang W, Wei S, Wang J, et al. Effects of excess sugars and lipids on the growth and development of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Nutr*. 2020;
76. Chen W-W, Yi Y-H, Chien C-H, Hsiung K-C, Ma T-H, Lin Y-C, et al. Specific polyunsaturated fatty acids modulate lipid delivery and oocyte development in *C. elegans* revealed by molecular-selective label-free imaging. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6:32021. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27535493>

**ANEXOS**

- 1)** A declaração de que o trabalho não versou sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais, patrimônio genético ou temas afetos a biossegurança.

28/06/2019

INTRANET IB

Relatório anual CIBio	
<b>No. do projeto:</b>	5 / 2016
<b>Título do projeto de pesquisa</b>	Interferindo com o Envelhecimento por Meio da Via de Interferência por RNA
<b>Nome do pesquisador principal</b>	Marcelo Alves da Silva Mori
<b>Situação</b>	Em andamento
<b>Unidade</b>	Instituto de Biologia
<b>Departamento</b>	BIOQUÍMICA E BIOLOGIA TECIDUAL
<b>Nome do laboratório/casa de vegetação/biotério</b>	Laboratório de Biologia do Envelhecimento
<b>OGMs do projeto original extintos ou eliminados</b>	- Camundongos Myf5tm3(cre)Sor = Myf5Cre: Modificação genética (knock-in) que resulta em expressão de Cre recombinase de bacteriófago P1 sob o comando do promotor endógeno do gene Myf5 de camundongo. A construção interrompe a região 5'-UTR do gene endógeno e portanto nocauteia o gene; - Camundongos Myf5tm1(cre/Esr1*)Trdo = Myf5CreER : Modificação genética (knock-in) que insere um internal ribosome entry site (IRES) fundido ao cDNA que codifica para CreERTM (CreERTM; Cre recombinase de bacteriófago P1 fundida à forma mutante G525R do domínio de ligação à estrógeno do receptor de estrógeno) à jusante do códon de terminação no exon 3 do gene Myf5.
<b>OGMs em estoque (congelado) no laboratório</b>	Todos as cepas de <i>C. elegans</i> e <i>E. coli</i> tem amostras congeladas no laboratório.
OGMs usados no período:	
<b>Organismo / Subprojeto</b>	
<b>Nome comum do OGM</b>	Caenorhabditis elegans ( <i>C. elegans</i> )
<b>Nome científico do OGM</b>	Caenorhabditis elegans
<b>Espécie de origem do gene</b>	Caenorhabditis elegans, Homo sapiens
<b>Gene/seqüências introduzido(as) ou modificadas (Evitar siglas)</b>	- Componentes da via de RNAi: Dicer, Argonautes, Sids, Rsd, Rdes, Nrdes, Rff-1, Adrs, Prg-1. - Genes envolvidos no controle do envelhecimento: eat-2, daf-16, daf-2, daf-12, daf-9, skn-1, hsf-1, impt-1, gcn-2, gcn-1, atf-5, glp-1, lin-4, clk-1, aak-2, mir-71, mir-34, pha-1, hsp-6, hsp-4, hsp-16, isp-1, nuo-6, sod-3, lin-14 (todas mutações espontâneas). - Proteínas fluorescentes: GFP, mCherry, YFP - Peptídeos com potencial para formar agregados: repetição de glutaminas, peptídeo beta-amilóide humano
<b>Vetor</b>	Os transgênicos foram gerados por microinjeção na linhagem germinativa e formação de arranjos extra-cromossômicos, que em alguns casos foram inseridos no genoma por radiação. As mutações espontâneas foram induzidas por agentes mutagênicos.
<b>Como resultado da alteração gênica, o OGM poderá passar a ser:</b>	<input type="checkbox"/> patogênico <input type="checkbox"/> produtor de toxina <input type="checkbox"/> virulento/infeccioso <input type="checkbox"/> vantagem adaptativa <input checked="" type="checkbox"/> nenhuma das anteriores
<b>Funções do gene</b>	- Componentes da via de RNAi: São genes fundamentais para a expressão, processamento, transporte ou função de RNAs pequenos regulatórios. - Genes envolvidos no controle do envelhecimento: genes que de alguma forma afetam o tempo ou a qualidade de vida do verme. - Proteínas fluorescentes: usadas para marcar estruturas e a expressão de genes e proteínas. - Peptídeos com potencial para formar agregados: peptídeos que se agregam com a idade e servem como modelos de proteotoxicidade nos nematoides.
<b>Forma de identificação do OGM em relação ao organismo selvagem (macroscópica, fenotípica ou genotípica)</b>	Fenotipagem (os alelos modificados geralmente tem marcadores de fácil identificação visual) e/ou genotipagem por PCR ou HRM (high resolution melting).

28/06/2019

INTRANET IB

<b>Origem/procedência do OGM</b>	Blackwell lab (Harvard University, EUA) e Caenorhabditis Genetics Center (University of Minnesota, EUA)
<b>Classificação de risco do OGM</b>	Tipo I
<b>Organismo / Subprojeto</b>	
<b>Nome comum do OGM</b>	Bactéria E. coli
<b>Nome científico do OGM</b>	Escherichia coli das cepas OP50, OP50-1, OP50-GFP, HT115(DE3), DH5α eTOP10
<b>Espécie de origem do gene</b>	Caenorhabditis elegans, Mus musculus e Homo sapiens
<b>Gene/sequências introduzido(as) ou modificadas (Evitar siglas)</b>	- Fragmentos de genes de Caenorhabditis elegans para silenciamento por RNAi: dcr-1, atf-5, skn-1, blmp-1, daf-16, dpl-1, elt-3, eor-1, hlh-8, hpl-2, lin-15b, lin-35, w03f9.2, ceh-14, elg-5, eor-1, fos-1, gmeb-1, hlh-8, lin-13, lin-39, nhr-77, pha-4, pqm-1, r02d3.7, snpc-4, lin-1, pos-1, unc-22, cco-1, impt-1, aak-2. - Dicer1 (Homo sapiens e Mus musculus) - Proteínas marcadoras: GFP (Aequorea victoria), RFP (modificado de GFP), luciferase (Renilla e Firefly)
<b>Vetor</b>	L4440, pAD12, pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro, pLKO.1, pFRT/TO/FLAG/HA-DEST, pShuttle-IRES-hrGFP-1, pMir-Report, pRL, pGIPZ, pGL3
<b>Como resultado da alteração gênica, o OGM poderá passa a ser:</b>	<input type="checkbox"/> patogênico <input type="checkbox"/> produtor de toxina <input type="checkbox"/> virulento/infeccioso <input type="checkbox"/> vantagem adaptativa <input checked="" type="checkbox"/> nenhuma das anteriores
<b>Funções do gene</b>	- Fragmentos de genes de Caenorhabditis elegans para silenciamento por RNAi: são fragmentos gênicos que quando clonados no MCS do vetor L4440 e expressos em bactérias E. coli HT115(DE3) dão origem a RNAs dupla-fita longos. Ao se alimentar dessas bactérias, os RNAs são absorvidos pelos vermes, processados pela maquinaria de RNAi e silenciam seus alvos complementares. Este mecanismo é seguro e não oferece perigo à saúde humana já que a absorção de RNA dupla-fita longo a partir do meio ambiente não acontece em mamíferos. - Dicer1: enzima central no processamento de RNAs. Seu cDNA ou shRNAs complementares serão clonados em vetores de expressão em células de eucariotos. - Proteínas marcadoras: servem como controle de transfecção e para marcar células.
<b>Forma de identificação do OGM em relação ao organismo selvagem (macroscópica, fenotípica ou genotípica)</b>	As bactérias transformadas pelos vetores acima apresentam resistência a antibióticos que permitem sua seleção em relação à linhagem parental não transformada. Os clones selecionados serão expandidos e congelados. Essas são práticas comuns em laboratórios de biologia molecular certificados com NB-1 e não representam nenhum tipo de risco à saúde.
<b>Origem/procedência do OGM</b>	As cepas OP50, OP50-1, OP50-GFP e HT115(DE3) foram obtidas do Caenorhabditis Genetics Center (CGC). As cepas DH5α e TOP10 foram obtidas da Invitrogen.
<b>Classificação de risco do OGM</b>	Tipo I
<b>Organismo / Subprojeto</b>	
<b>Nome comum do OGM</b>	Camundongo
<b>Nome científico do OGM</b>	Mus musculus
<b>Espécie de origem do gene</b>	Mus musculus, Homo sapiens, Bacteriófago P1
<b>Gene/sequências introduzido(as) ou modificadas (Evitar siglas)</b>	- Tg(Adipo-cre)1Evdr: Transgene que expressa a Cre recombinase de bacteriófago P1 sob o comando do promotor de Adipoq de camundongo; - DicerloxP: Modificação genética (knock-in) em que os exons 20 e 21 do gene da Dicer do camundongo estão flanqueados por sítios LoxP; - Gcn1loxP: Modificação genética (knock-in) em que os exons 51 a 54 do gene Gcn1 do camundongo estão flanqueados por sítios LoxP; - Tg(APP <sup>swe</sup> ,PSEN1 <sup>dE9</sup> )85Dbo = APP/PSEN1: Duplo transgene que expressa uma forma quimérica (camundongo/humana) do precursor amilóide (Mo/HuAPP695swe) e um alelo mutante da presenilina 1 humana (PS1-dE9) ambos direcionados ao sistema nervoso central. - FVB-Tg(CAG-luc,-GFP)L2G85Chco/J: Expressa firefly luciferase e GFP dirigido pelo promotor ubíquo CAG. Quantidade de animais importados: 1



28/06/2019

INTRANET IB

	<p>macho e 2 fêmeas da linhagem. - B6(129S4)-Il33&lt;tm1.1Bryc&gt;/J: Possui sítios loxP flanqueando os exons 5-7 do gene da interleucina 33 (IL33). Quantidade de animais importados: 1 machos e 2 fêmeas. - B6.129S6(SJL)-Fgf21&lt;tm1.2Djm&gt;/J: Possui sítios loxP flanqueando os exons 1-3 do gene fibroblast growth factor 21 (Fgf21). Quantidade de animais importados: 1 machos e 2 fêmeas. - B6.129S4-Il2rg&lt;tm1Wj&gt;/J: deficiente em IL-2R<math>\gamma</math>-chain. Quantidade de animais importados: 1 machos e 2 fêmeas. - C57BL/6-Gt(ROSA)26Sor&lt;tm1(CAG-ECFP*/Rapgef3/Venus*)Kam: Expressa o sensor de cAMP TEpacVV sob o comando dos promotores GT(ROSA)26Sor e CAG quando o cassete floxed-STOP é deletado pelo cruzamento com uma linhagem que expressa Cre. Quantidade de animais importados: 1 macho e 1 fêmea. - B6.129-Tg(Adipoq-cre/Esr1*)1Evd/J: Expressa Cre recombinase sob o comando do promotor de adiponectina e é funcional apenas quando os animais são tratados com tamoxifeno. Quantidade de animais importados: 2 machos. - B6.FVB-Tg(Ucp1-cre)1Evd/J: Expressa Cre recombinase sob o comando do promotor de Ucp1. Quantidade de animais importados: 2 machos. - B6(129X1)-Tg(Cd4-cre/ERT2)11Gnri/J: Expressa Cre recombinase sob o comando do promotor de CD4 e é funcional apenas quando os animais são tratados com tamoxifeno. Quantidade de animais importados: 2 machos. - B6(Cg)-Mir203&lt;tm1.1Yir&gt;/J. O locus do mir203 é flanqueado por dois sítios LoxP. Quantidade de animais importados não especificada (crio-recuperação de linhagem). Machos e fêmeas. - B6.129P2-Apo1tm1Unc/J: Stock No: 002055. A proteína ApoA1 é deletada nestes animais através da substituição do exon 2 por um cassete resistente a neomicina. Quantidade de animais importados: 1 macho e 2 fêmeas. - B6N.129S-Pnpla2tm1Eek/J: Stock No: 024278 - Estes camundongos possuem sítios lox-p flanqueando os exons 2 ao 7 do gene Pnpla2. Quantidade de animais importados: 1 macho e 2 fêmeas.</p>
<b>Vetor</b>	As construções foram geradas em outros laboratórios por meio de transfecção ou micro-injeção dos fragmentos de DNA, resultando em recombinação homóloga ou inserção aleatória, respectivamente.
<b>Como resultado da alteração gênica, o OGM poderá passar ser:</b>	<input type="checkbox"/> patogênico <input type="checkbox"/> produtor de toxina <input type="checkbox"/> virulento/infeccioso <input type="checkbox"/> vantagem adaptativa <input checked="" type="checkbox"/> nenhuma das anteriores
<b>Funções do gene</b>	<p>Os transgenes inseridos que carregam Cre recombinase não apresentam nenhum tipo de função descrita além de recombinar sítios LoxP. Esses animais não apresentam nenhum tipo de característica fenotípica a não ser que cruzados com animais que carregam alelos modificados contendo sítios LoxP. Os sítios LoxP, por outro lado, se não recombinados, não causam alteração descrita na expressão do gene hospedeiro.</p> <p>Dicer: RNase III responsável pelo processamento de miRNAs e siRNAs  GCN1: Proteína que se liga ao ribossomo e à quinase GCN2, que fosforila e inibe eIF2a em resposta à restrição de aminoácidos.  APP/PSEN1: Genes mutantes que resultam em risco elevado à doença de Alzheimer.  Firefly luciferase: Enzima que reage com luciferina e produz luz.  IL33: interleucina envolvida em processos inflamatórios e imunes.  FGF21: fator de crescimento envolvido em processos metabólicos.  IL-2R<math>\gamma</math>-chain: proteína de células NK.  TEpacVV: sensor de AMP cíclico.  mir203: microRNA com função em grande parte desconhecida. Está associado à câncer de pele.  ApoA1: proteína envolvida no metabolismo de lipídeos  Pnpla2: proteína envolvida no metabolismo de lipídeos</p>
<b>Forma de identificação do OGM em relação ao organismo selvagem (macroscópica, fenotípica ou genotípica)</b>	Genotipagem e presença dos alelos modificados.
<b>Origem/procedência do OGM</b>	UNIFESP e Jackson Laboratory
<b>Classificação de risco do OGM</b>	Tipo I
<b>Resultados</b>	
<b>Resumo dos principais resultados obtidos no período</b>	<p>Os OGMs utilizados durante o ano de 2018 foram essenciais para a geração de novos dados e publicação de artigos. Após cruzamento dos camundongos Myf5Cre e Myf5CreER com camundongos DicerloxP e Gcn1loxP, decidimos descartar essas linhagens pois essas estavam causando letalidade embrionária. Os camundongos Tg(Adipo-cre)1Evd/J também foram cruzados com Gcn1loxP para caracterização, e dados estão sendo gerados com esses animais quanto ao seu fenótipo metabólico em resposta a diferentes tipos de dietas. Em paralelo, animais Tg(Adipo-cre)1Evd/J;DicerloxP (AdicerKO) continuaram a ser estudados extensivamente em vários protocolos do laboratório. Nossos estudos também se voltaram à análise do tempo de vida, resposta ao estresse oxidativo e térmico, desenvolvimento, movimentação, fertilidade e outros parâmetros fisiológicos dos nematoides <i>C. elegans</i> geneticamente modificados. Por fim, bactérias geneticamente modificadas foram usadas para a clonagem de genes e para a alimentação de <i>C. elegans</i> e consequente silenciamento gênico.</p>

28/06/2019

INTRANET IB

<p><b>Artigos publicações relacionados ao projeto no período</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Monte GG, Nani JV, de Almeida Campos MR, Dal Mas C, Marins LAN, Martins LG, Tasic L, Mori MA, Hayashi MAF. Impact of nuclear distribution element genes in the typical and atypical antipsychotics effects on nematode <i>Caenorhabditis elegans</i>: Putative animal model for studying the pathways correlated to schizophrenia. <i>Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry</i>. 2018 Dec 19;92:19-30.</li> <li>2. de-Lima-Júnior JC, Souza GF, Moura-Assis A, Gaspar RS, Gaspar JM, Rocha AL, Ferrucci DL, Lima TI, Victório SC, Bonfante ILP, Cavaglieri CR, Pareja JC, Brunetto SQ, Ramos CD, Geloneze B, Mori MA, Silveira LR, Segundo GRS, Ropelle ER, Velloso LA. Abnormal brown adipose tissue mitochondrial structure and function in IL10 deficiency. <i>EBioMedicine</i>. 2019 Jan;39:436-447.</li> <li>3. da Silva I, da Costa Vieira R, Stella C, Loturco E, Carvalho AL, Veo C, Neto C, Silva SM, D'Amora P, Salzgeber M, Matos D, Silva CR, Oliveira JR, Rabelo I, Yamakawa P, Maciel R, Biscolla R, Chiamolera M, Fraietta R, Reis F, Mori M, Marchioni D, Carioca A, Maciel G, Tomioka R, Baracat E, Silva C, Granato C, Diaz R, Scarpellini B, Egle D, Fiegl H, Himmel I, Troi C, Nagourney R. Inborn-like errors of metabolism are determinants of breast cancer risk, clinical response and survival: a study of human biochemical individuality. <i>Oncotarget</i>. 2018 Aug 3;9(60):31664-31681.</li> <li>4. Pinto S, Sato VN, De-Souza EA, Ferraz RC, Camara H, Pinca APF, Mazzotti DR, Lovci MT, Tonon G, Lopes-Ramos CM, Parmigiani RB, Wurtele M, Massirer KB, Mori MA. Enoxacin extends lifespan of <i>C. elegans</i> by inhibiting miR-34-5p and promoting mitohormesis. <i>Redox Biol</i>. 2018 Sep;18:84-92. Mafra FF, Gattai PP, Macedo MM, Mori MA, Araujo RC. The angiotensin-I-converting enzyme insertion/deletion in polymorphic element codes for an AluYa5 RNA that downregulates gene expression. <i>The Pharmacogenomics Journal</i>. 2018 Online.</li> <li>5. Otton R, Bolin AP, Ferreira LT, Marinovic MP, Rocha ALS, Mori MA. Polyphenol-rich green tea extract improves adipose tissue metabolism by down-regulating miR-335 expression and mitigating insulin resistance and inflammation. <i>J Nutr Biochem</i>. 2018 Apr 7;57:170-179. 2.</li> <li>6. Mori MA. Editorial: Non-Coding RNAs: Entwining Metabolism and Aging. <i>Front Endocrinol (Lausanne)</i>. 2018 Mar 19;9:111.</li> <li>7. Sardeli AV, Komatsu TR, Mori MA, Gáspari AF, Chacon-Mikahil MPT. Resistance Training Prevents Muscle Loss Induced by Caloric Restriction in Obese Elderly Individuals: A Systematic Review and Meta-Analysis. <i>Nutrients</i>. 2018 Mar 29;10(4). pii: E423.</li> <li>8. Marinovic MP, Campeiro JD, Lima SC, Rocha AL, Nering MB, Oliveira EB, Mori MA, Hayashi MAF. Crotamine induces browning of adipose tissue and increases energy expenditure in mice. <i>Sci Rep</i>. 2018 Mar 22;8(1):5057.</li> <li>9. Ludwig RG, Rocha AL, Mori MA. Circulating molecules that control brown/beige adipocyte differentiation and thermogenic capacity. <i>Cell Biol Int</i>. 2018 Jan 31. Review.</li> </ol>
<p><b>Dissertações de mestrado em andamento</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sweta Sarmah. Identificação de novos reguladores da expressão DAF-16/FOXO. Início: 2018. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. (Orientador).</li> <li>2. Willian Goulart Salgueiro. Estudo dos efeitos fisiológicos e de sua herança transgeracional induzidos pelo excesso de colesterol na dieta de <i>Caenorhabditis elegans</i>. Início: 2018. Dissertação (Mestrado profissional em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas. (Orientador).</li> <li>3. Guilherme Tonon. Investigação da interação de Dicer com a via de sinalização de NAD+ no contexto do metabolismo e do envelhecimento em <i>C. elegans</i>. Início: 2017. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. (Orientador).</li> <li>4. Thiago Leite Knittel. Caracterização de Alterações Proteicas Tecido-Específicas com o Envelhecimento e a Restrição Calórica em <i>C. Elegans</i>. Início: 2017. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. (Orientador).</li> </ol>
<p><b>Teses de doutorado em andamento</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Raissa Guimarães Ludwig. Varredura e caracterização de moléculas circulantes que afetam o gasto energético. Início: 2018. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. (Orientador).</li> <li>2. Gerson Profeta de Souza. TRIAGEM E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS FLUOROQUINOLÔNICOS E SUA INFLUÊNCIA SOBRE A BIOGÊNESE DE miRNAs. Início: 2018. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. (Orientador).</li> <li>3. Deisi Lilian Braga. Caracterização em <i>C. elegans</i> de Novos Genes Envolvidos no Envelhecimento e nos Mecanismos Conservados de Miméticos de Restrição Dietética. Início: 2018. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. (Orientador).</li> <li>4. Henrique Camara. Desvendando Mecanismos de Controle da Longevidade por RNAs Móveis. Início: 2017.</li> </ol>

28/06/2019

INTRANET IB

	<p>Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. (Orientador).</p> <p>5. Andréa Livia Silva Rocha. Papel de Dicer em Adipócitos Controlando a Função Imune e a Ativação das Células Beges no Tecido Adiposo. Início: 2017. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. (Orientador).</p> <p>6. Silas Pinto da Silva. Estudo dos efeitos de Dicer sobre a função mitocondrial, o metabolismo e o envelhecimento em nematoides <i>C. elegans</i>. Início: 2017. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. (Orientador).</p> <p>7. Beatriz Alves Guerra. Estudo do Papel da Proteína GCN1 na Gênese de Doenças Metabólicas em Camundongos. Início: 2015. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas (Biologia Molecular)) - Universidade Federal de São Paulo, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. (Orientador).</p>
--	--

<b>Dissertações e Teses defendidas no período</b>	<p>1. Juliana Ramirez Arruda. Metanálise e Caracterização de Novos miRNAs com Função no Envelhecimento de Nematoides <i>C. elegans</i>. 2018. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, . Orientador: Marcelo Alves da Silva Mori.</p> <p>2. Raissa Guimarães Ludwig. Caracterização Metabólica de Adipócitos em Resposta ao Soro de Roedores Submetidos à Restrição Dietética. 2018. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. Orientador: Marcelo Alves da Silva Mori.</p> <p>3. Gloria Alejandra Gallo Enamorado. Caracterização Estrutural da Proteína CSM2, uma proteína do sistema CRISPR-Cas. 2018. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Paulo, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Orientador: Marcelo Alves da Silva Mori.</p>
---	---

**Relacionar os nomes, CPF, formação profissional, titulação e capacitação em biossegurança da equipe técnica envolvida no trabalho com OGM e seus derivados, apresentando curriculum vitae de cada participante que não estiver inscrito na Plataforma Lattes.**

<b>Membro da equipe</b>	
<b>Nome</b>	Carlos Alberto Vergani Junior
<b>CPF (Apenas números)</b>	41602475806
<b>Email</b>	cavergani@hotmail.com
<b>Formação profissional</b>	Ensino superior completo
<b>Titulação</b>	Bacharel em Ciências Biomédicas
<b>Treinamento em biossegurança no período</b>	Treinado pela Dra. Elzira E. Saviani (técnica do LaBE e funcionária da Gestão Ambiental), pelo Sr. Luiz Henrique Gonzaga Ribeiro (facilitador de resíduos do DBBT) e pelo Prof. Marcelo A. Mori em questões de biossegurança.
<b>Membro da equipe</b>	
<b>Nome</b>	Narayana P. B. Fazolini
<b>CPF (Apenas números)</b>	07088063689
<b>Email</b>	narafazolini@gmail.com
<b>Formação profissional</b>	Doutorado
<b>Titulação</b>	Doutor em Ciências
<b>Treinamento em biossegurança no período</b>	Treinada pela Dra. Elzira E. Saviani (técnica do LaBE e funcionária da Gestão Ambiental), pelo Sr. Luiz Henrique Gonzaga Ribeiro (facilitador de resíduos do DBBT) e pelo Prof. Marcelo A. Mori em questões de biossegurança.
<b>Membro da equipe</b>	
<b>Nome</b>	Deisi Lilian Braga
<b>CPF (Apenas números)</b>	02305244193

28/06/2019

INTRANET IB

<b>Email</b>	braga.deisi@gmail.com
<b>Formação profissional</b>	Ensino Superior Completo
<b>Titulação</b>	Bacharel em Ciências Biomédicas
<b>Treinamento em biossegurança no período</b>	Treinada pela Dra. Elzira E. Saviani (técnica do LaBE e funcionária da Gestão Ambiental), pelo Sr. Luiz Henrique Gonzaga Ribeiro (facilitador de resíduos do DBBT) e pelo Prof. Marcelo A. Mori em questões de biossegurança.
<b>Membro da equipe</b>	
<b>Nome</b>	Luiz Osório Leiria
<b>CPF (Apenas números)</b>	82635196087
<b>Email</b>	loleiria@gmail.com
<b>Formação profissional</b>	Doutorado
<b>Titulação</b>	Doutor em Ciências
<b>Treinamento em biossegurança no período</b>	Foi treinado no exterior (Joslin Diabetes Center) no uso de OGMs nos níveis NB-1 e NB-2. Tem 8 anos de experiência na área de biologia molecular utilizando transgênicos e outros OGMs.
<b>Membro da equipe</b>	
<b>Nome</b>	Gabriel Palermo Ruiz
<b>CPF (Apenas números)</b>	45807294807
<b>Email</b>	gpalermoruiz@gmail.com
<b>Formação profissional</b>	Ensino Médio Completo
<b>Titulação</b>	Cursando Bacharelado em Biomedicina
<b>Treinamento em biossegurança no período</b>	Treinado diretamente pelo Prof. Marcelo A. Mori em questões de biossegurança
<b>Membro da equipe</b>	
<b>Nome</b>	Carolina Mie Kawagosi Onodera
<b>CPF (Apenas números)</b>	37411627879
<b>Email</b>	kawagosi.mie@gmail.com
<b>Formação profissional</b>	Ensino Superior Completo
<b>Titulação</b>	Mestre em Ciências
<b>Treinamento em biossegurança no período</b>	Treinada diretamente pelo Prof. Marcelo A. Mori em questões de biossegurança
<b>Membro da equipe</b>	
<b>Nome</b>	Willian Goulart Salgueiro
<b>CPF (Apenas números)</b>	02744142018
<b>Email</b>	willian_cgs@hotmail.com
<b>Formação profissional</b>	Ensino Superior Completo
<b>Titulação</b>	Bacharel em Ciências Farmacêuticas
<b>Treinamento em biossegurança no período</b>	Treinado diretamente pelo Prof. Marcelo A. Mori em questões de biossegurança
<b>Membro da equipe</b>	
<b>Nome</b>	Danilo Lopes Ferrucci

28/06/2019

INTRANET IB

<b>CPF (Apenas números)</b>	31085017800
<b>Email</b>	daniolferrucci@yahoo.com.br
<b>Formação profissional</b>	Doutorado
<b>Titulação</b>	Doutor em Ciências
<b>Treinamento em biossegurança no período</b>	Treinado diretamente pelo Prof. Marcelo A. Mori em questões de biossegurança
<b>Membro da equipe</b>	
<b>Nome</b>	Juliano Quintella Dantas Rodrigues
<b>CPF (Apenas números)</b>	28273887820
<b>Email</b>	quintella.juliano@gmail.com
<b>Formação profissional</b>	Doutorado
<b>Titulação</b>	Doutor em Ciências
<b>Treinamento em biossegurança no período</b>	Treinado diretamente pelo Prof. Marcelo A. Mori em questões de biossegurança
<b>Membro da equipe</b>	
<b>Nome</b>	Raissa de Paula Moro
<b>CPF (Apenas números)</b>	41849799806
<b>Email</b>	mouraisa@gmail.com
<b>Formação profissional</b>	Ensino Superior Completo
<b>Titulação</b>	Bacharel em Ciências Biomédicas
<b>Treinamento em biossegurança no período</b>	Treinado diretamente pelo Prof. Marcelo A. Mori em questões de biossegurança
<b>Membro da equipe</b>	
<b>Nome</b>	Guilherme Tonon
<b>CPF (Apenas números)</b>	39800510800
<b>Email</b>	tonon.guisilva@gmail.com
<b>Formação profissional</b>	Ensino Médio Completo
<b>Titulação</b>	Cursando Ciências Biomédicas
<b>Treinamento em biossegurança no período</b>	Treinado diretamente pelo Prof. Marcelo A. Mori em questões de biossegurança
<b>Membro da equipe</b>	
<b>Nome</b>	Thiago Leite Knittel
<b>CPF (Apenas números)</b>	36828353854
<b>Email</b>	tknittinho@hotmail.com
<b>Formação profissional</b>	Ensino Médio Completo
<b>Titulação</b>	Cursando Ciências Biomédicas
<b>Treinamento em biossegurança no período</b>	Treinado diretamente pelo Prof. Marcelo A. Mori em questões de biossegurança



28/06/2019

INTRANET IB

<b>Membro da equipe</b>	
<b>Nome</b>	Raissa Guimarães Ludwig
<b>CPF (Apenas números)</b>	35641847836
<b>Email</b>	raissa.gludwig@gmail.com
<b>Formação profissional</b>	Superior Completo
<b>Titulação</b>	Mestre em Ciências
<b>Treinamento em biossegurança no período</b>	Treinada diretamente pelo Prof. Marcelo A. Mori em questões de biossegurança
<b>Membro da equipe</b>	
<b>Nome</b>	Andréa Livia Rocha
<b>CPF (Apenas números)</b>	01047851440
<b>Email</b>	andrearotcha@live.com
<b>Formação profissional</b>	Superior Completo
<b>Titulação</b>	Mestre em Ciências
<b>Treinamento em biossegurança no período</b>	Treinada diretamente pelo Prof. Marcelo A. Mori em questões de biossegurança
<b>Membro da equipe</b>	
<b>Nome</b>	Silas Pinto da Silva
<b>CPF (Apenas números)</b>	31752194896
<b>Email</b>	silas008@gmail.com
<b>Formação profissional</b>	Superior Completo
<b>Titulação</b>	Mestre em Ciências
<b>Treinamento em biossegurança no período</b>	Treinado diretamente pelo Prof. Marcelo A. Mori em questões de biossegurança
<b>Membro da equipe</b>	
<b>Nome</b>	Henrique Câmara
<b>CPF (Apenas números)</b>	41970278854
<b>Email</b>	henriquecamara.45@gmail.c
<b>Formação profissional</b>	Superior Completo
<b>Titulação</b>	Mestre em Ciências
<b>Treinamento em biossegurança no período</b>	Treinado diretamente pelo Prof. Marcelo A. Mori em questões de biossegurança
<b>Membro da equipe</b>	
<b>Nome</b>	Beatriz Alves Guerra
<b>CPF (Apenas números)</b>	34832093878
<b>Email</b>	bia.a.guerra@hotmail.com
<b>Formação profissional</b>	Superior Completo
<b>Titulação</b>	Mestre em Ciências
<b>Treinamento em biossegurança no período</b>	Treinada diretamente pelo Prof. Marcelo A. Mori em questões de biossegurança

28/06/2019

INTRANET IB

<b>biossegurança no período</b>	
<b>Membro da equipe</b>	
<b>Nome</b>	Elzira Elisabeth Saviani
<b>CPF (Apenas números)</b>	08276235859
<b>Email</b>	esaviani@unicamp.br
<b>Formação profissional</b>	Ciências Biológicas - PUC CAMPINAS
<b>Titulação</b>	Doutorado em Biologia Vegetal - UNICAMP
<b>Treinamento em biossegurança no período</b>	Trabalhou no Laboratório da Profa. Ione Salgado por muitos anos em Nível de Biossegurança 1, porém obteve treinamento na prática, nunca formal.
<b>Membro da equipe</b>	
<b>Nome</b>	Marcelo A. Mori
<b>CPF (Apenas números)</b>	29497499841
<b>Email</b>	morima@unicamp.br
<b>Formação profissional</b>	Superior Completo
<b>Titulação</b>	Doutor em Ciências
<b>Treinamento em biossegurança no período</b>	Foi treinado no exterior (Joslin Diabetes Center) no uso de OGMs nos níveis NB-1 e NB-2. Tem 15 anos de experiência na área de biologia molecular utilizando transgênicos e outros OGMs.
<b>Termo de responsabilidade</b>	
Resolução Normativa Nº 1, de 20 de Junho de 2006 ( <a href="http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/3486.html">http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/3486.html</a> )	
<input checked="" type="checkbox"/> Li e cumprirei a Resolução Normativa Nº 1/2006	
Resolução Normativa Nº 2, de 27 de novembro de 2006 ( <a href="http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/3913.html">http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/3913.html</a> )	
<input checked="" type="checkbox"/> Li e cumprirei a Resolução Normativa Nº 2/2006	
Diretrizes Gerais para o Trabalho em Contenção com Agentes Biológicos ( <a href="http://www.ib.unicamp.br/comissoes/sites/www.ib.unicamp.br/comissoes/files/DiretrizesAgenBiologicos_2010_3Edic.pdf">http://www.ib.unicamp.br/comissoes/sites/www.ib.unicamp.br/comissoes/files/DiretrizesAgenBiologicos_2010_3Edic.pdf</a> )	
<input checked="" type="checkbox"/> Estou ciente	
Classificação de Risco dos Agentes Biológicos ( <a href="http://www.ib.unicamp.br/comissoes/sites/www.ib.unicamp.br/site/comissoes/files/classificacao_risco_agentes_biologicos_2ed.pdf">http://www.ib.unicamp.br/comissoes/sites/www.ib.unicamp.br/site/comissoes/files/classificacao_risco_agentes_biologicos_2ed.pdf</a> )	
<input checked="" type="checkbox"/> Estou ciente	
Comprometo-me a dar treinamento especializado adequado ao nível de biossegurança a equipe que participa deste projeto.	
<input checked="" type="checkbox"/> Confirmo	
Comprometo-me a, em caso de qualquer acidente ou contaminação ou liberação acidental envolvendo o(s) OGM(s) do projeto, notificar imediatamente a CIBio/IB-UNICAMP	
<input checked="" type="checkbox"/> Confirmo	
Comprometo-me a solicitar nova aprovação à CIBio sempre que ocorra alteração significativa nos objetivos, procedimentos e instalações aprovadas.	
<input checked="" type="checkbox"/> Confirmo	
Comprometo-me a encaminhar à CIBio um relatório anual de andamento de projeto aprovado até 15 de fevereiro de cada ano.	
<input checked="" type="checkbox"/> Confirmar	
<input checked="" type="checkbox"/> Tudo que foi declarado é a absoluta expressão da verdade. Estou ciente de que o eventual não cumprimento das Resoluções Normativas da CTNBio é de minha total responsabilidade e que estarei sujeito às punições previstas na legislação em vigor.	


2) Declaração de que a dissertação ou tese não infringe os dispositivos da lei nº 9610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.




**Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **A HERANÇA INTERGERACIONAL INDUZIDA POR ALTOS NÍVEIS DE COLESTEROL EM C. elegans É DEVIDO À VITELOGENINA E CONTROLADA POR miRNAs**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 28/08/2020

Assinatura :   
Nome do(a) autor(a): **Willian Goulart Salgueiro**  
RG n.º 2106546753

Assinatura :   
Nome do(a) orientador(a): **Marcelo Alves da Silva Mori**  
RG n.º 32684904x