



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



EXPRESSÃO DE mRNAs, miRNAs E PROTEÍNAS  
REGULADORAS DA NEFROGÊNESE EM RATOS  
PROGRAMADOS POR RESTRIÇÃO PROTEICA *IN UTERO*

**Letícia de Barros Sene**

**Botucatu-SP  
2016**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

EXPRESSÃO DE mRNAs, miRNAs E PROTEÍNAS  
REGULADORAS DA NEFROGÊNESE EM RATOS  
PROGRAMADOS POR RESTRIÇÃO PROTEICA *IN UTERO*

**Letícia de Barros Sene**

**Orientadora: Dra. Patrícia Aline Boer**

**Co-Orientador: Dr. Wellerson Rodrigo Scarano**

**Colaborador: Dr. José Antonio Rocha Gontijo**

Tese apresentada ao Instituto de Biotecnologia, Câmpus de Botucatu, UNESP, no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular e Funcional.

*Orientadora: Dra. Patricia Aline Boer*

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Sene, Leticia de Barros.

Expressão de mRNAs, miRNAs e proteínas reguladoras da nefrogênese em ratos programados por restrição proteica in utero / Leticia de Barros Sene. - Botucatu, 2016

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

Orientador: Patricia Aline Boer

Coorientador: Wellerson Rodrigo Scarano

Capes: 20600003

1. MicroRNAs. 2. Células-tronco. 3. Néfrons. 4. Rins - Desenvolvimento. 5. Feto - Desenvolvimento. 6. Dieta com restrição de proteínas.

Palavras-chave: Cap mesenquimal; Células progenitoras de néfron; Desenvolvimento renal; Programação fetal ; miRNAs.

Botucatu, 20 de dezembro de 2016.

**EXPRESSÃO DE mRNAs, miRNAs E PROTEÍNAS REGULADORAS DA  
NEFROGÊNESE EM RATOS PROGRAMADOS POR RESTRIÇÃO PROTEICA  
*IN UTERO***

**Banca Examinadora**

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Aline Boer

**Membros**

Profa. Dra. Priscylla Tatiana C. G. Okamoto

Profa. Dra. Guiomar Nascimento Gomes

Profa. Dra. Ana Paula Coelho Balbi

Dr. Bruno Fantinatti

*“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”*

*(Theodore Roosevelt)*

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

*(Arthur Schopenhauer)*

*Dedico esta tese aos meus pais, Angela e Sidney,  
e aos meus avós, Jurandir e Maria, por todo o  
esforço que fizeram para eu estar aqui hoje!*

*AGRADECIMENTOS*

Primeiramente agradeço a Deus! Que sempre me conforta, dá força e saúde para seguir e enfrentar todos os obstáculos, nessa longa caminhada.

Aos meus pais e irmão, pelo carinho, amor, e por sempre estarem presentes e por sempre incentivarem minhas escolhas. Obrigada por tudo, serei eternamente grata, por todo esforço que dedicaram a mim.

Aos meus avós, Maria e Jurandir, e a minha tia Alzira, por acompanharem toda a minha caminhada, sempre torcendo pelo meu sucesso. Meu avô, de onde quer que esteja, sei que está torcendo muito por mim.

Ao meu noivo, Sandro, obrigada por todo carinho, pela amizade, paciência, respeito, compreensão e por todo amor! Sou muito grata por todo apoio, e por sempre acreditar em mim. Sempre me incentivando e me contagiando com o seu otimismo e bondade! A cada dia meu amor por você só aumenta.

À minha cunhada, Cristina, por todos os momentos juntas, pela estadia em sua casa, por todo desabafo e companheirismo, que foram essenciais nesse momento.

À minha amiga, Mariana, pelos conselhos, motivação e carinho, sem a tua amizade toda essa jornada teria sido muito mais difícil.

À amiga Bárbara, por todo carinho e pelo acolhimento em Campinas, e mesmo estando em outro país, continua me apoiando, e apesar de ser mais nova, sempre me deu bons conselhos.

À minha amiga, Iveline, pelos momentos de diversão, conversar e risadas. E a suas queridas filhas, Júlia e Helena, pelos momentos de brincadeiras e carinho.

À minha orientadora, Prof. Dra. Patrícia Aline Boer, pela oportunidade de ter sido sua aluna desde o mestrado, sou infinitamente grata, por ter confiado e me aceito quando cheguei em sua sala, em 2010. Obrigada por toda oportunidade, por todos

ensinamentos, pela amizade e carinho, pelas estadias em Campinas. Espero ter retribuído, com mais esse trabalho, toda confiança que depositou em mim.

Ao Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano, meu co-orientador, por todos os esclarecimentos, sempre disposto a ajudar. Obrigada por ter aberto as portas do seu laboratório, onde eu consegui realizar boa parte das minhas atividades. Sou muito agradecida pelo acolhimento e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. José Antônio Gontijo pela colaboração e participação dessa tese. Por todo reagente cedido, sem o qual a realização do projeto não seria possível. Por todo tempo disponibilizado para com o meu projeto.

À Prof. Dra. Íscia Cendes e ao seu aluno de doutorado, Alexandre, pela disponibilização do laboratório e por me ensinarem a técnica de Sequenciamento de Nova Geração.

Ao Dr. Tao Chen, a Dra. Ying Chen, ao Jian Yan, e a todos da Divisão de Genética e Toxicologia Molecular (DGMT), do Centro Nacional de Pesquisas Toxicológicas (NCTR), em Jefferson, AR, EUA, que me receberam tão bem durante o período de doutorado sanduíche. Obrigada por toda paciência, de cada um, por todo aprendizado que me proporcionaram, por me incluírem em todas as atividades do laboratório. Esses três meses me ofereceram uma experiência grandiosa, tanto para minha formação profissional quanto para minha vida pessoal.

Ao Prof. Dr. Cláudio Oliveira e sua aluna de pós-doc, Cristiane, pela disponibilização do laboratório e auxílio para a realização da sexagem nos fetos.

Ao Prof. Dr. Danilo Pinhal, pela disponibilização do equipamento StepOne Plus para a realização do PCR em tempo real.

Ao Prof. Dr. Rafael Henrique Nóbrega e a sua aluna Giovana, por terem disponibilizado e ensinado a usar a lupa e o software.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia. Em especial a Dona Terezinha, pelos cafés, chás, pão caseiro e pipoca.

Aos colegas de laboratório, Victor, Agnes, Daniele, Heloísa, Mariana, Lívia, Lucas, Joyce, Cristiane, Leonardo, André (Qualy) e André (Dói). Em especial ao Victor, Heloísa, Agnes, Lívia, Lucas e Mariana, que compartilharam conhecimento e conversas descontraídas, sempre me incentivaram e me colocaram para cima. Helo, obrigada pelos artigos conseguidos através do seu VPN. E ao Leonardo pelos almoços e pelas pausas para o café.

Aos amigos Leonardo Mendes e Jason, pelos ensinamentos de biologia molecular.

Aos demais amigos, parentes, aqui não mencionados, mas que são muito importantes para mim, principalmente por sempre me darem apoio.

Agradeço especialmente à Prof. Dra. Flávia Karina Delella e ao Dr. Bruno Fantinatti pelas grandiosas contribuições durante o Exame de Qualificação.

Agradeço à FAPESP pela bolsa de doutorado (2012/18492-4) e pela bolsa BEPE (2015/15148-9) concedida, sem as quais seria inviável a realização desse trabalho.

RESUMO

## RESUMO

Tanto a desnutrição proteico-calórica quanto a hipertensão representam problemas globais de saúde pública. Estudos epidemiológicos em diversas populações, bem como resultados experimentais indicam que as condições nutricionais intrauterinas "programam" o desenvolvimento de hipertensão e doença cardíaca coronariana em adultos. A privação de proteína, durante o período ativo de nefrogênese, provoca redução do número de néfrons no momento do nascimento. Assim, a predisposição para hipertensão arterial pode ser determinada, pelo menos em parte, pelo desenvolvimento anormal dos rins. No entanto, não é conhecido os mecanismos que comprometem o processo de nefrogênese. Estudos recentes mostram que o número de células-tronco presentes no *cap* mesenquimal (CM), em torno da extremidade dos brotos do ureter, determina o número de néfrons que serão formados. Nosso grupo demonstrou anteriormente, redução significativa (27%) do número de néfrons, em prole masculina adulta, proveniente de ratas submetidas à restrição proteica gestacional. O objetivo deste trabalho foi verificar a área, o índice de morte e proliferação celular, a expressão gênica e de miRNAs, número de células positivas para proteínas controladoras do ciclo celular e marcadoras de células tronco progenitoras em metanefros de machos da prole de ratas submetidas à restrição proteica gestacional, comparativamente aos seus controles, em diferentes períodos da ontogênese renal. Ratas Wistar foram alimentadas durante a prenhez com dietas com conteúdo normal de proteína (NP 17% de caseína) ou baixo conteúdo de proteína (LP 6% de caseína). No 17<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> de dia de gestação (DG) e no 7<sup>o</sup> dia pós-natal (DPN) os rins foram processados para coloração de HE, imunolocalização, sequenciamento (NGS) e RT-qPCR. Foi obtido um grande número de miRNAs diferencialmente expressos, entre eles, o miR-127-3p, let-7a-5p, miR-199a-5p, miR-298-5p, miR-144-3p, miR-181a-5p e o miR-181c-5p, que foram validados por RT-qPCR. Os animais LP, com 17 DG, apresentaram redução da área renal total, da área nefrogênica e redução de células em proliferação. Os animais LP, com 21DG, também apresentaram redução da área nefrogênica, além de menor peso do rim. O miR-127-3p, o miR-144-3p e o miR-199a-5p está menos expresso nos animais LP de 17 DG, enquanto que o miR-181a-5p, miR-181c-3p e o let-7a-5p estão mais expressos. O Six2, está diminuído nos animais LP de 17

DG, assim como o c-Myc, Vegf e Notch1. Já Bax, Tgfb1, Bcl6, c-Ret, Map2k2, Mki67, mTOR,  $\beta$ -Catenina, Zeb1, Zeb2 e Igf1 estão mais expressos nesses animais. Já nos animais LP de 21 DG o miR-127-3p, miR-298-5p, let-7a-5p, miR-181a-5p e o miR-181c-3p estão com sua expressão aumentada. Six2, Bax, Casp3, Col1, Gdnf, Tgfb1, Bcl2, Bcl6, c-Ret, Prdm1, Vegf, Mki67,  $\beta$ -Catenina, Zeb1, Zeb2, Notch1 e Igf1 estão mais expressos nos animais LP de 21 DG. Enquanto que Pcn, c-Myc estão com sua expressão reduzida. A expressão do miR-181a-5p está maior nos animais LP com 7 DPN e a expressão de let-7a-5p está reduzida. mTOR está regulada negativamente nos animais LP de 7 DPN, e Bax, Bim, Casp3, Col1, Gdnf, Tgfb1, Bcl2, Bcl6, Ciclina A, Map2k2, Prdm1, Vegf,  $\beta$ -Catenina, Zeb1, Zeb2, Notch1 e Igf1 estão regulados positivamente. Em conclusão, este estudo indicou que a redução do número de néfrons (28%) induzida por restrição proteica gestacional é determinada, pelo menos em parte, pela redução na população de células tronco progenitoras (28%) e de mitose no 17º dia gestacional. A restrição proteica gestacional altera a expressão de miRNAs e genes-alvos que estão associados com processos de apoptose, proliferação e diferenciação celular que são essenciais durante o desenvolvimento renal.

*ABSTRACT*

## ABSTRACT

Both the protein-calorie malnutrition and hypertension represent global problems of public health. Epidemiologic studies in diverse populations, as well as experimental results indicate that intrauterine nutritional conditions "program" the development of hypertension and coronary heart disease in adults. The protein deprivation, during the active period of nephrogenesis, causes a reduction in the number of nephrons at birth. Thus, the predisposition to hypertension can be determined, at least in part, by abnormal kidney development. However, it is not known the mechanism that lead to undertakes the nephrogenesis process. Recent studies show that the number of stem cells present in the mesenchymal cap (CM), around the edge of the shoot of the ureter, determines the number of nephrons to be formed. We have demonstrated, in adult male offspring, from rats submitted to gestational protein restriction, a significant reduction (27%) of the nephron number. The aim of present study was investigated to verify the area, cell death and proliferation index, gene and miRNA expression, number of cells positive for cell cycle control proteins and markers of progenitor stem cells in metanephro male offspring of rats submitted to gestational protein restriction, compared to their controls, in different periods of renal ontogenesis. Wistar rats were fed during pregnancy with normal-protein (NP 17% casein) or low-protein (LP 6% casein) diet. In the 17<sup>th</sup> and 21<sup>th</sup> gestational day (DG) and 7<sup>th</sup> day of life (DPN) the kidneys were processed to immunolocalization, Next Sequencing Generation (NGS), and RT-qPCR. A big number of differentially expressed miRNAs was obtained among them, miR-127-3p, let-7a-5p, miR-199a-5p, miR-298-5p, miR-144-3p, miR-181a-5p and miR-181c-5p, these were validated by RT-qPCR. LP animals, with 17 DG, presented reduction of the total renal area, the nephrogenic area and cells proliferating were reduced. LP animals, with 21DG, also presented a reduction of the nephrogenic area, as well as a lower weight of the kidney. miR-127-3p, miR-144-3p and miR-199a-5p were downregulated in the 17DG-LP animals, while miR-181a-5p, miR-181c-3p and let-7a- 5p were upregulated. Six2, was decreased in 17 DG-LP animals, as well as c-Myc, Vegf and Notch1. Bax, Tgfb1, Bcl6, c-Ret, Map2k2, Mki67, mTOR,  $\beta$ -Catenin, Zeb1, Zeb2 and Igf1 were upregulated in these animals. In the 21 DG-LP animals, miR-127-3p, miR-298-5p, let-7a-5p, miR-181a-

5p and miR-181c-3p were increased expression. Six2, Bax, Casp3, Col1, Gdnf, Tgfb1, Bcl2, Bcl6, c-Ret, Prdm1, Vegf, Mki67,  $\beta$ -Catenina, Zeb1, Zeb2, Notch1 e Igf1 were more expressed in 21DG-LP animals. Whereas PcnA, c-Myc are reduced in expression. Expression of miR-181a-5p was higher in LP animals with 7 DPN and let-7a-5p expression was reduced. mTOR was downregulated in the LP animals of 7 DPN, and Bax, Bim, Casp3, Col1, Gdnf, Tgfb1, Bcl2, Bcl6, Cyclin A, Map2k2, Prdm1, Vegf,  $\beta$ -Catenin, Zeb1, Zeb2, Notch1 and Igf1 are regulated positively. In conclusion, this study indicated that the nephron number reduction (28%) induced by gestational protein restriction is determined, at least in part, by reduction in mitosis and kidney mesenchymal stem/progenitor cell population (28%) at 17th gestational day. Gestational protein restriction alters the expression of miRNAs and target genes that are associated with proliferation, cell differentiation and apoptosis processes that are essential during renal development.

## Lista de Abreviaturas

**BCL6** – *B-cell lymphoma 6*.

**BU** – Broto do ureter

**CEMIB** – Centro de Bioterismo da UNICAMP.

**CEUA** – Comissão de Ética no Uso de Animais.

**CM** – Cap mesenquimal.

**Col 1** – Colágeno tipo 1.

**DAG** – Distância anogenital.

**DE** – Diferencialmente expressos.

**DEX** - Dexametasona

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico.

**EMT** – Transição epitélio mesenquimal.

**FAO** – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura.

**GDNF** – *Glial cell neurotrophic fator*.

**IGF1** – *Insulin-like growth factor 1*.

**IUGR (*intrauterine growth restriction*)** – restrição do crescimento intrauterino.

**LP (*low protein*)** – animais submetidos a restrição proteica.

**MAP2K2** – *Mitogen activated protein kinase kinase 2*.

**MET** – Transição mesênquima epitelial.

**MI** – Mesoderma intermediário.

**miRNAs, miRs** – microRNAs.

**MKI67** – *Marker of proliferation ki-67*.

**MM** – Mesênquima metanefrogênico

**mRNA** – Ácido ribonucleico mensageiro.

**MTOR** – *Mechanistic target of rapamycin*.

**MYC** – *Myelocytomatosis oncogene*.

**NGS** – Sequenciamento de nova geração

**NP (*normal protein*)** – animais submetidos a quantidade normal de proteínas.

**PCNA** – Proliferation cell nuclear antigen.

**PCR** – Reação em cadeia da polimerase.

**PRDM1** – *PR/SET domain 1*.

**RNA** – Ácido ribonucleico.

**RET** – *Ret proto-oncogene*.

**RT-qPCR** – Reação em cadeia da polimerase em tempo real após transcrição reversa.

**SIX2** – *SIX homeobox 2*

**TGF $\beta$ -1** – *Transforming growth factor beta 1*.

**VEGF** – *Vascular endothelial growth factor*.

**WT1** – *Wilms' tumor 1*.

**ZEB1** – *Zinc finger E-box-binding homeobox 1*.

**ZEB2** – *Zinc finger E-box-binding homeobox 2*.

**11 $\beta$ -HSD2** – 11- $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase do tipo 2.

**17 DG** – 17 dias gestacionais (c).

**21 DG** – 21 dias gestacionais (a).

**7 DPN** – 7 dias pós-natal (b).

## Lista de Figuras

- Figura 1** – Esquema da influência do ambiente materno adverso.....p. 31
- Figura 2** – Representação esquemática do desenvolvimento renal.....p. 37
- Figura 3** - Representação esquemática do rim embrionário.....p. 38
- Figura 4** – Biogênese dos microRNAs.....p. 45
- Figura 5** – Distância anogenital.....p. 52
- Figura 6** – Eletroforese em gel de Agarose indicando a presença ou ausência da banda referente ao gene Sry.....p. 53
- Figura 7** – Esquema das etapas do preparo da biblioteca.....p. 57
- Figura 8** – Imagem do gel usado para purificação da biblioteca.....p. 58
- Figura 9** – Peso dos fetos com 17DG (A), 21DG (B) e 7 DPN (C).....p. 64
- Figura 10** - Volcano plot da expressão de miRNAs no metanefro dos animais de 17 DG.....p. 66
- Figura 11** - Volcano plot da expressão de miRNAs no metanefro dos animais de 21 DG.....p. 67
- Figura 12** - Volcano plot da expressão de miRNAs no metanefro dos animais de 7 DPN.....p. 68
- Figura 13** – Análise Hierárquica dos Clusters (HCA).....p. 69
- Figura 14** - Visão tridimensional da Análise dos Componentes Principais (PCA).....p. 70
- Figura 15** – miRNAs eleitos para o estudo de alvos baseando-se nas respostas biológicas.....p. 70
- Figura 16**– Diagrama de Venn representando os miRNAs mais diferencialmente expressos entre NP e LP aos 17 e 21 dias gestacionais e 7 dias de vida.....p. 71
- Figura 17** – Nível de expressão dos miRNAs.....p.73

<b>Figura 18</b> – Nível de expressão dos genes .....	p.76
<b>Figura 19</b> – Curva de expressão de relação entre os miRNAs e os genes alvos.....	p.77
<b>Figura 19A</b> – Curva de expressão dos mRNAs .....	p.78
<b>Figura 20</b> – Rins de fetos de 17 DG dos grupos NP (A) e LP (B).....	p. 78
<b>Figura 21</b> – Quantificações das áreas renais dos fetos de 17 DG dos grupos NP e LP.....	p. 79
<b>Figura 22</b> – O gráfico representa a área renal dos animais de 17DG.....	p. 79
<b>Figura 23</b> – Os gráficos representam os resultados das quantificações dos cap e das vesículas em forma de vírgula.....	p. 79
<b>Figura 24</b> – Os gráficos representam resultados das quantificações ( $\times 10^3$ ) no 17 DG.....	p. 80
<b>Figura 25</b> – Os gráficos representam as áreas renais dos animais de 17 DG.....	p. 80
<b>Figura 26</b> – Os gráficos representam as áreas renais de 21 DG e o peso do rim.....	p. 81
<b>Figura 27</b> – Os gráficos representam a área renal de 7 DPN.....	p. 81
<b>Figura 28</b> – Imunoflorescência de Six2.....	p. 83
<b>Figura 29</b> – Imunoflorescência de Six2 para 17DG. A relação entre o número de células positivas para Six2 e a área do cap mesenquimal.....	p. 83
<b>Figura 30</b> - Imunoperoxidase para Six2 com 21 DG.....	p. 84
<b>Figura 31</b> - Imunoperoxidase para Ki67 com 17 DG.....	p. 84
<b>Figura 32</b> - Imunoperoxidase para Ki67 com 21 DG e 7 DPN.....	p. 85
<b>Figura 33</b> – Expressão de c-myc no broto do ureter de maior calibre, em vesículas na forma de vírgula, com 17 DG.....	p. 86
<b>Figura 34</b> – Imunoperoxidase para c-myc com 21 DG e 7 DPN.....	p. 87

- Figura 35** – Imunoperoxidase para TGF $\beta$ -1 com 17 DG, 21 DG e 7 DPN.....p. 88
- Figura 36** – Imunoperoxidase para ciclina A com 17 DG, 21 DG e 7 DPN.....p. 89
- Figura 37** – Imunoperoxidase para Bcl2 com 17 DG, 21 DG e 7 DPN.....p. 90
- Figura 38** – Imunoperoxidase para Casp3 com 17 DG, 21 DG e 7 DPN.....p. 91
- Figura 39** – Imunoperoxidase para  $\beta$ -catenina com 17 DG, 21 DG e 7 DPN...p. 92
- Figura 40** – Imunoperoxidase para VEGF com 17 DG, 21 DG e 7 DPN.....p. 93
- Figura 41** – Imunoperoxidase para Zeb1 com 17 DG, 21 DG e 7 DPN.....p. 94
- Figura 42** – Imunoperoxidase para Zeb2 com 17 DG, 21 DG e 7 DPN.....p. 95
- Figura 43** – Imunoperoxidase para WT1 com 17 DG, 21 DG e 7 DPN.....p. 96
- Figura 44** – Esquemas regulação gênica no 17 DG.....p.104
- Figura 45** – Esquemas regulação gênica no 21 DG .....p. 105
- Figura 46** – Esquemas regulação gênica no 7 DPN.....p. 116

## Lista de Tabelas

- Tabela 1** – Itens contidos em 1kg da dieta.....p. 51
- Tabela 2** – Anticorpos primários.....p. 55
- Tabela 3** - Sequência dos primers utilizados para RT-qPCR.....p. 62
- Tabela 4** – Número de miRNAs e de famílias de miRNAs diferencialmente expressos em diferentes comparações.....p. 65
- Tabela 5** – Conjunto de listas de miRNAs diferencialmente expressos em diferentes comparações.....p. 139
- Tabela 6** – Funções e redes envolvidas nos miRNAs diferencialmente expressos da comparação entre controle a vs controle b.....p. 146
- Tabela 7** – Funções e redes envolvidas nos miRNAs diferencialmente expressos da comparação entre controle a vs tratado a.....p. 146
- Tabela 8** – Funções e redes envolvidas nos miRNAs diferencialmente expressos da comparação entre controle a vs controle c.....p. 147
- Tabela 9** – Funções e redes envolvidas nos miRNAs diferencialmente expressos da comparação entre controle b vs controle c.....p.147
- Tabela 10** – Funções e redes envolvidas nos miRNAs diferencialmente expressos da comparação entre controle b vs tratado b.....p.148
- Tabela 11** – Funções e redes envolvidas nos miRNAs diferencialmente expressos da comparação entre controle c vs tratado c.....p. 148
- Tabela 12** – Comparação entre os valores do sequenciamento e do RT-qPCR.....p. 74
- Tabela 13** – Lista dos microRNAs e mRNA que serão validados.....p. 156

## SUMÁRIO

I.	INTRODUÇÃO.....	24
	PROGRAMAÇÃO FETAL E RIM.....	30
	PROGRAMAÇÃO FETAL E NEFROGÊNESE.....	34
	NEFROGÊNESE E MICRORNAS.....	41
II.	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	46
III.	METODOLOGIA.....	48
IV.	RESULTADOS.....	63
V.	DISCUSSÃO.....	97
VI.	CONCLUSÃO.....	117
VII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120
VIII.	ANEXO.....	137

## INTRODUÇÃO

## I. INTRODUÇÃO

O estado nutricional adequado é resultado do equilíbrio entre a ingestão balanceada de alimentos e o consumo de energia necessário para manter as funções diárias do organismo. Assim, a desnutrição não se caracteriza apenas pela ingestão insuficiente de nutrientes, mas engloba a alimentação desbalanceada e excessiva, que resulta na carência de nutrientes específicos (CARVALHO & SALES, 1992; VALENTE, 2003). A desnutrição ainda é um grande problema de saúde pública mundial (MARTINS, 2011). O número de pessoas desnutridas no Brasil, em 2014, foi estimado em 3,4 milhões. Em 2015, no mundo, 795 milhões de pessoas estavam na lista das pessoas que não comem o suficiente diariamente, para levarem uma vida ativa e saudável (FAO, 2014 e 2015).

Em países em desenvolvimento, as gestantes têm alimentação inadequada, além de não terem assistência médica satisfatória. Após o nascimento, as crianças nascidas dessas mães ficam expostas às dietas de alta densidade energética que desencadeiam a transição nutricional, juntamente ao elevado consumo de alimentos industrializados e sedentarismo, aumentando consideravelmente o risco de desenvolverem doenças metabólicas (LOPEZ-JARAMILLO *et al.*, 2015).

O desenvolvimento embriofetal é altamente sensível a perturbações no ambiente materno. Assim, estímulos ambientais adversos alteram os processos de proliferação, diferenciação, morte e migração celular, alterando as vias do desenvolvimento normal necessárias para maturação de órgãos e tecidos (LANGLEY-EVANS & MCMULLEN, 2010). Portanto, o ambiente adverso durante a vida embriofetal e/ou na infância está relacionado ao aumento do risco de

desenvolver doenças na idade adulta (BARKER, 2004). Esse processo é denominado programação fetal, no qual o ambiente encontrado antes do nascimento ou na infância, molda a longo prazo, o controle da fisiologia dos tecidos e órgãos e da homeostase corporal (LANGLEY-EVANS, 2004).

Essa hipótese foi proposta como o mecanismo de associação entre o baixo peso ao nascer, o crescimento infantil e as doenças subsequentes, e descreve o processo pelo qual um estímulo ou injúria durante períodos críticos do crescimento e desenvolvimento podem alterar permanentemente estruturas e funções teciduais (LUCAS, 1991). Desta forma, a programação fetal exerce efeito importante na fase intrauterina, determinando o perfil de saúde de um indivíduo, bem como de doenças que poderão ser desenvolvidas na vida adulta.

As primeiras evidências de programação fetal datam de 1964, através de um estudo, onde se notou alto risco de isquemia cardíaca em indivíduos cujos irmãos foram abortados ou morreram na infância (ROSE, 1964). Fordshal (1967) percebeu que regiões da Noruega com alto nível de mortalidade infantil apresentavam também índices elevados de morte por doenças cardiovasculares. A década de 1980 é rica em estudos epidemiológicos associando mortalidade cardiovascular à eventos ocorridos na primeira fase da infância. No entanto, o termo foi usado pela primeira vez em 1991, por Alan Lucas, que definiu programação como “a resposta permanente de um organismo a um estímulo ou insulto durante um período crítico do desenvolvimento”.

A observação da relação inversa entre peso ao nascer e doenças coronarianas levou os ambientes embrionário e fetal a serem interpretados como novo componente na etiologia das doenças cardiovasculares (BARKER *et al.*, 1989). Assim, o ambiente intrauterino é considerado um fator-chave para a

etiologia de doenças cardiovasculares na vida adulta. Estudos indicam que condições sociais precárias atuam como estímulo adverso durante a infância e a adolescência, aumentando o risco de doenças cardiovasculares (FORSDAHL, 2002). As alterações moleculares e fisiológicas resultantes do desequilíbrio nutricional materno permitem a sobrevivência da prole, embora seus efeitos, em longo prazo, promovam alterações na estrutura cardiovascular, renal, respiratória, endócrina e em componentes do sistema nervoso central (BARKER, 1995; FOWDEN *et al.*, 2006).

Ratas prenhes alimentadas com dieta com baixo conteúdo proteico, por exemplo, originam prole com pressão arterial elevada ao longo da vida (LANGLEY-EVANS *et al.*, 1996a), além de alterações no metabolismo da glicose (DESAI *et al.*, 1996). Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que animais submetidos à restrição proteica gestacional nascem com peso cerca de 8% menor e, ao longo da vida, apresentam maiores valores pressóricos (ANDREO *et al.*, dados não publicados), além de formação de cerca de 30% a menos de néfrons (MESQUITA *et al.*, 2009).

Estudos apontam ainda que as implicações da manipulação do ambiente fetal podem não estar limitadas à primeira geração, prolongando os efeitos da programação pelas gerações subsequentes (DRAKE & WALKER, 2004).

A evidência mais contundente para apoiar a ligação entre a nutrição materna e doenças na idade adulta, vem de estudos com descendentes de um período da 2ª Guerra Mundial, conhecido como Fome Holandesa. Um bloqueio nazista à parte ocidental da Holanda resultou em fome generalizada por um período de seis meses. Indivíduos que estavam no útero no momento da fome, posteriormente apresentaram maior risco de obesidade e intolerância à glicose,

do que os nascidos antes e depois do período da fome. O risco para desenvolvimento de hipertensão, doença coronária e disfunção renal também foi aumentado pela exposição à desnutrição materna (RAVELLI, et al., 1976; ROSEBOOM, et al., 2001; PAINTER et al., 2005). Embora alguns efeitos nutricionais sejam consequência direta da alteração na disponibilidade de substrato, parte desses resultados se deve à mediação hormonal, que pode alterar o desenvolvimento de tecidos fetais específicos em períodos críticos do desenvolvimento, levar a mudanças permanentes na secreção hormonal ou à sensibilidade tecidual a hormônios (BARKER, 1998).

Os glicocorticoides são os principais hormônios relacionados à homeostase em condições de estresse físico, psicológico ou nutricional. Muitas características da exposição excessiva a glicocorticoides sugerem seu possível papel na gênese da programação que acarreta desordens metabólicas e cardiovasculares. Os receptores de glicocorticoides são altamente expressos em quase todos – senão em todos – os tecidos fetais durante a segunda metade da gestação ou antes (DIAZ *et al.*, 1997; COLE *et al.*, 1995), assim como na placenta e nas membranas fetais.

Os glicocorticoides sintéticos são amplamente utilizados na prática obstétrica em casos de parto prematuro devido à sua capacidade de promover rápida maturação celular, sobretudo de células pulmonares (ROBERTS & DALZIEL, 2006). Entretanto, esta maturação ocorre em detrimento da proliferação celular. Desta forma é plausível supor que a exposição prematura aos glicocorticoides maternos poderia reduzir o número de células tronco do CM, em fase inicial da nefrogênese, acarretando na redução expressiva de néfrons como observado em nosso modelo de restrição proteica gestacional. O tratamento de

ratas prenhes com baixas doses de dexametasona, um glicocorticoide sintético usado na prática da obstetrícia, reduz o peso ao nascer e eleva a pressão arterial na prole adulta (BENEDIKTSSON *et al.*, 1993).

Embora os glicocorticoides sejam em sua maioria lipofílicos e atravessem rapidamente a placenta, normalmente o feto apresenta concentração muito menor de glicocorticoides do que sua progenitora (BEITENS *et al.*, 1973; CAMPBELL & MURPHY, 1977). Essa diferença é garantida pela enzima 11- $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2 (11 $\beta$ -HSD2), que catalisa o rápido metabolismo do cortisol e da corticosterona para inativá-las nas formas 11-keto (cortisona e 11-desidroxicorticosterona, respectivamente) (MURPHY *et al.*, 1974; LOPEZ-BERNAL *et al.*, 1980). Essa barreira enzimática placentária garante que a maioria, mas nem todos os glicocorticoides maternos sejam inativados, de forma que o cortisol fetal circulante seja, em teoria, apenas aquele derivado das adrenais do feto (BENEDIKTSSON *et al.*, 1997). No entanto, a eficiência da 11 $\beta$ -HSD2 placentária varia consideravelmente tanto em humanos quanto em ratos (BENEDIKTSSON *et al.*, 1993; STEWART *et al.*, 1995). Tem sido demonstrado que nos modelos de programação fetal, a deficiência relativa de 11 $\beta$ -HSD2 placentária, permite a exposição do feto a glicocorticoides maternos, promovendo retardo no crescimento da prole, sendo este um mecanismo modulador sobre a programação relacionada à manifestação futura de doenças (EDWARDS *et al.*, 2005).

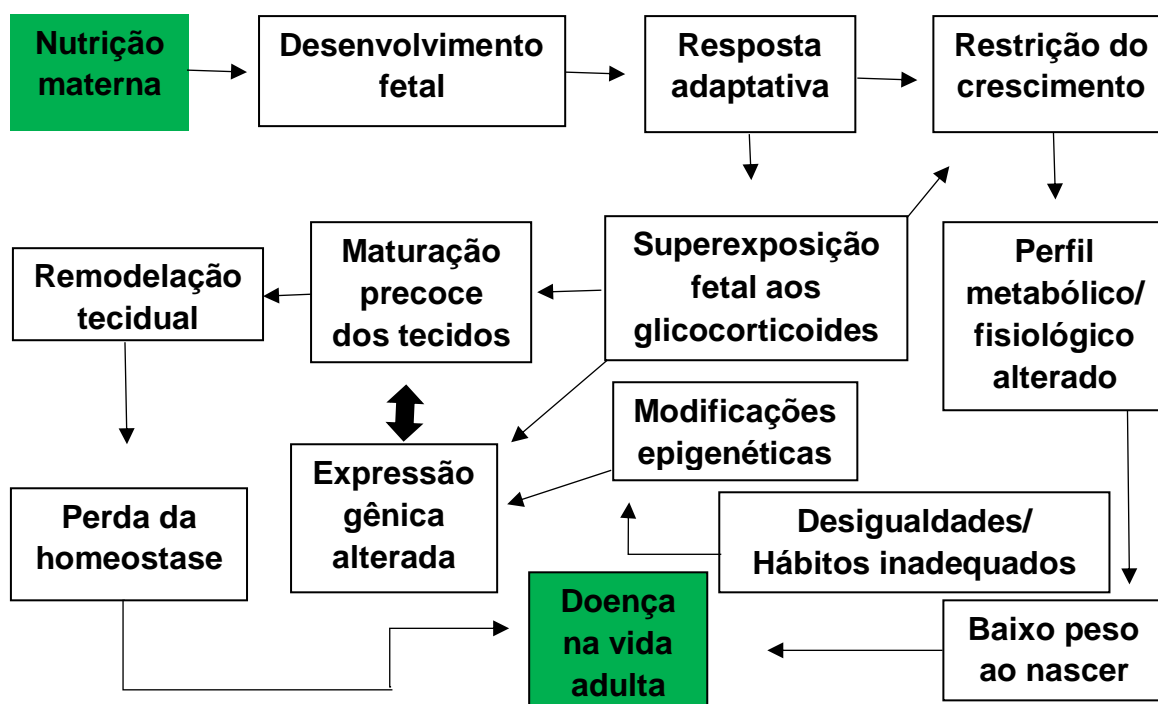
Associação similar entre peso ao nascer e 11 $\beta$ -HSD2 placentária foi confirmada em humanos (STEWART *et al.*, 1995), embora outros estudos não relataram essa associação (ROGERSON *et al.*, 1997). No entanto, mutações no gene da 11 $\beta$ -HSD2 em humanos foram associadas ao baixo peso ao nascer

(DAVE-SHARMA *et al.*, 1998). Além disso, marcadores bioquímicos de exposição fetal a glicocorticoides estão relacionados com a função da 11 $\beta$ -HSD2 placentária próximo ao nascimento (BENEDIKTSSON *et al.*, 1995).

De forma intrigante, a restrição proteica durante a gestação atenua seletivamente a 11 $\beta$ -HSD2, mas não outras enzimas da placenta (LANGLEY-EVANS *et al.*, 1996b), e promove hipertensão e hiperglicemia na prole, entre outros efeitos. Assim, exposição a glicocorticoides parece ser parte integrante de uma série de mecanismos comuns ligando os fatores ambientais maternos ao crescimento e programação (Figura 1).

- **Programação fetal e rim**

Há muito tempo tem sido estabelecida a participação do rim na patogênese da hipertensão arterial, embora alguns estudos desafiem a hegemonia renal e atribuam papel relevante às células vasculares (CROWLEY *et al.*, 2005; MENDELSON, 2005). No entanto, nos últimos anos esta participação fisiopatológica renal tem sido ampliada incluindo o conceito de que a hipertensão arterial na idade adulta bem como disfunção renal a ela associada estejam relacionadas a eventos que ocorrem durante o período pré-natal. Esta relação



**Figura 1:** Esquema da influência do ambiente materno adverso. Adaptada de Langley-Evans, 2009 e Lopez-Jaramillo *et al.*, 2015.

entre a programação fetal e doenças renais envolve mecanismos através dos quais o prejuízo na nefrogênese pode predispor à hipertensão na vida adulta. (Zandi-Nejad *et al.*, 2006).

O rim dos mamíferos é essencial para a manutenção da homeostase corpórea, pois controla o equilíbrio hidro-eletrolítico, excretando água e sais minerais ao longo da vida. Sendo assim, esse órgão está diretamente relacionado ao desenvolvimento de hipertensão arterial, devido ao balanço de fluidos nos diferentes compartimentos corporais. Esta importância renal pode ser claramente demonstrada em modelos de transplantes renais cruzados onde, se o doador é hipertenso o receptor torna-se hipertenso (RETTIG *et al.*, 1990; GUIDI *et al.*,

1996).

A função excretória, do rim, depende do número de unidades de filtração disponíveis, os néfrons, que é determinado durante o desenvolvimento renal. O menor número de néfrons tem se mostrado um fator de risco chave para a hipertensão e doenças renais crônicas na vida adulta (LUYCKY *et al.*, 2013). Zeman (1968) foi o primeiro a relatar que a prole de ratas que sofreram restrição proteica (6% de caseína) durante a gestação apresentava menor número de glomérulos quando comparadas à prole de ratas que receberam dieta normal (24% de caseína) (ZEMAN, 1968). Portanto, a nefrogênese requer um equilíbrio delicado entre diversos fatores que podem ser alterados pela restrição no crescimento intrauterino, levando a diminuição no número de néfrons (SCHREUDER *et al.*, 2006).

Nosso grupo verificou, dentre outros resultados, que em ratos de 16 semanas de vida cujas mães receberam dieta hipoproteica (6%) durante a gestação, a expressão renal dos receptores tipo 1 e 2 (AT1R e AT2R, respectivamente) de angiotensina II e de proteínas envolvidas na sua via de sinalização é reduzida (MESQUITA *et al.*, 2010a). Verificou-se ainda, que embora estes animais apresentem o número de néfrons reduzido (27%), a filtração glomerular não é alterada. Entretanto, estes animais apresentam proteinúria associada à simplificação podocitária o que sugere sobrecarga hemodinâmica e funcional glomerular. Esta sobrecarga acarretará desgaste precoce podocitário e perda de néfrons, agravando o quadro hipertensivo e predispondo a progressão da nefropatia crônica e fibrose.

Em outro estudo, o nosso grupo verificou que a prole de machos cujas mães foram submetidas à restrição proteica gestacional apresentam a expressão

renal de AT1R e AT2R reduzida desde o 12<sup>o</sup> dia de vida, período no qual a nefrogênese é finalizada em ratos. Estes animais apresentaram redução no número de néfrons (28,4%) e aumento no volume dos tufo glomerulares (24%), quando comparados com a prole de ratas que receberam dieta normal durante a gestação (MESQUITA *et al.*, 2010b). A redução no número de néfrons corrobora os achados de outros grupos em modelos experimentais e diferentes idades dos animais (ROSTAND, 2003; KRIZ & LEHIR, 2005; LUYCKX & BRENNER, 2005; HOPPE *et al.*, 2007).

Foi demonstrado também que a restrição proteica materna afeta o perfil de expressão gênica no rim. Os genes alterados estão envolvidos em diversas funções biológicas, tais como citoproteção, síntese de vitamina D, homeostase de proteínas, regulação de enzimas antioxidantes e senescência celular, dentre outras (CHEN *et al.*, 2010).

Com base em glomérulos isolados de ratos machos com 16 semanas de vida que foram submetidos à restrição proteica gestacional, foi detectada a diminuição da expressão dos miRs da família miR-200 e aumento na expressão de TGF- $\beta$ 1 e ZEB2, que estão relacionados com a transição epitélio mesenquimal (EMT) e fibrose (SENE *et al.*, 2013). E quando analisamos o tecido renal total, obtivemos aumento na expressão de alguns membros da família miR-200 (miR-141, miR-200c e miR-429) e do miR-192. Além disso, a expressão do TGF- $\beta$ 1, ZEB1, fibronectina e colágeno foi aumentada, enquanto a expressão de e-caderina foi reduzida (SENE *et al.*, dados não publicados). Estes resultados indicaram a dissociação entre as análises do tecido renal glomerular e do tecido renal total e que na vida adulta a expressão miRNAs renais é alterada. Mas estes efeitos provavelmente estão mais relacionados à consequência da programação

gestacional do que com a sua gênese. Assim, no caminho da elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na gênese da programação, estamos investigando os efeitos da restrição de proteína gestacional na nefrogênese.

- **Programação fetal e nefrogênese**

A falta de nutrientes e/ou falta ou excesso de sinais chave durante estágios do desenvolvimento podem ter consequências irreversíveis (LANGLEY-EVANS, 2006). Assim a mudança do número de células ou do tipo celular presente em um tecido, no caso do rim, por exemplo, além de alterar a sua função, pode alterar o perfil de expressão gênica, as vias de sinalização e a produção de hormônios entre outros (BERTRAM *et al.*, 2001). Portanto, a nefrogênese é um processo complexo que envolve um rígido controle da expressão de vários genes e constante remodelação. Esse equilíbrio pode ser alterado, por exemplo, pela desnutrição e afetar adversamente o desenvolvimento do rim, com consequente restrição no crescimento intrauterino e diminuição no número de néfrons (SCHREUDER *et al.*, 2006; ZANDI-NEJAD *et al.*, 2006).

Em humanos, o desenvolvimento do rim começa por volta da 8ª semana de gestação e continua até a 36ª semana. Em ratos, o estágio morfológicamente correspondente, começa aproximadamente entre o 12º e 13º dia gestacional, quando o órgão consiste simplesmente do epitélio do broto do ureter, um ramo do ducto mesonefrico, envolto por células mesenquimais renais que resultam da condensação a partir do mesoderma intermediário e termina por volta do 12º dia pós-natal (WELHAM *et al.*, 2005; ZANDI-NEJAD *et al.*, 2006).

O precursor do rim adulto dos mamíferos é chamado de metanefro. O rim

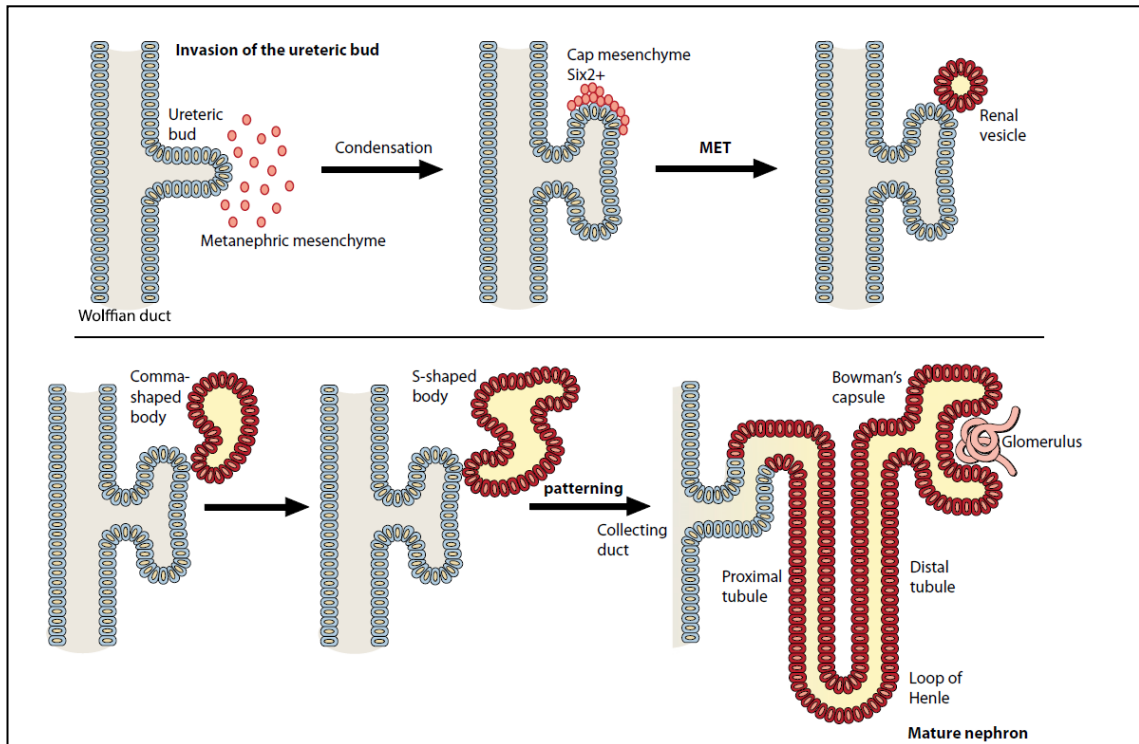
metanéfrico desenvolve-se a partir do mesoderma intermediário (MI). Esta estrutura origina três tipos celulares e estruturas que formarão o rim: o ducto de Wolffian, as células mesenquimais que originarão os néfrons e as células que darão origem as células estromais (CONSTANTINI & KOPAN, 2010; LI *et al.*, 2014). O desenvolvimento do rim começa quando o ducto de Wolffian invade o MI (Figura 2). Esse processo de invasão desencadeia interações recíprocas entre dois tecidos, o broto do ureter (BU) e o mesênquima metanefrogênico (MM) (GROBSTEIN, 1955; SAXEN, 1987). O BU é induzido por sinais do MM para dar origem ao sistema coletor do rim. Por sua vez, o MM é induzido pelo BU, que sofre alongamento e ramificações, para formar um “cap” mesenquimal (CM), que é formado por células progenitoras de néfrons, resultantes do condensamento de MM, ao redor de cada BU (PHUA *et al.*, 2015).

As células progenitoras de néfrons são encapsuladas por uma população de células estromais (Figura 3). Estas células estão estrategicamente posicionadas para influenciar o destino das progenitoras de néfrons, que expressam Six2, um fator de transcrição, presente apenas nas células progenitoras de néfrons. Six2 é um fator chave dentro do mesênquima renal, já que atua diretamente na auto-renovação das células progenitoras de néfrons, na supressão da diferenciação epitelial, além de promover a manutenção do mesênquima metanefrogênico (MM). Assim Six2 é essencial para a manutenção do estado progenitor do mesênquima (SELF *et al.*, 2006; KOBAYASHI *et al.*, 2008; REIDY & ROSENBLUM, 2009) e a perda de sua expressão provoca rápida exaustão das células progenitoras e epitelização ectópica (SELF *et al.*, 2006). Os néfrons se desenvolvem por um balanço delicado e contínuo entre mitose e diferenciação de suas células progenitoras, que é controlado no sentido de

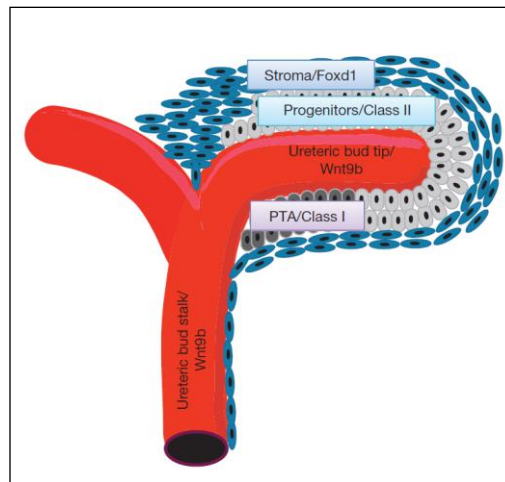
produzir novas ramificações do BU (NISHINAKAMURA *et al.*,2011). A formação definitiva do rim inicia-se no 13º dia embrionário em ratos (MORITZ & WINTOUR, 1999; ORTIZ *et al.*, 2001).

Durante a organogênese, em resposta a sinais do BU e do estroma, as células tronco progenitoras mais próximas à extremidade do BU, darão origem ao agregado pré-tubular ou vesícula renal, uma estrutura epitelial (HERZLINGER *et al.*, 1992; SARIOLA,2002; NISHINAKAMURA & OSAFUNE, 2006; BOYLE *et al.*, 2008; KARNER *et al.*, 2011). Então, as células deste agregado sofrem sucessivas mitoses e transição mesênquima epitelial (MET), que levará à formação consecutiva de corpos tubulares primordiais em forma de vírgula, de S até o néfron funcional, que é um túbulo vascularizado que participa da manutenção do equilíbrio hidroeletrolítico do sangue (Figura 2) (HOHENSTEIN *et al.*, 2015).

Uma etapa essencial no desenvolvimento renal é o estabelecimento do balanço entre a expansão e a diferenciação da população de células progenitoras de néfron. Qualquer desequilíbrio nestes processos resulta na redução de néfrons, que pode levar a consequências drásticas, como hipoplasia renal, hipertensão crônica, falência renal e formação de câncer pelas células progenitoras (tumor de Wilms) (KELLER *et al.*, 2003; KOESTERS *et al.*, 2003; KOESTERS *et al.*, 1999; LI *et al.*, 2004).



**Figura 2.** Representação esquemática do desenvolvimento renal. O broto do ureter (cinza) se estende a partir do ducto de Wolffian, e ao entrar em contato com o mesênquima metanefrogênico (vermelho), sinalizações recíprocas entre o BU e o MM, induzem a bifurcação do broto e a condensação do mesênquima para formar o cap mesenquimal. Células progenitoras de néfrons, próximas ao BU, sofrerão sucessivas mitoses e MET para gerar a vesícula renal, corpos tubulares em forma de vírgula, de S até o néfron funcional (HOHENSTEIN *et al.*, 2015).



**Figura 3.** Representação esquemática do broto do ureter se bifurcando e, na sua extremidade, o cap de células progenitoras circundadas por células do estroma (DAS *et al.*, 2013).

A formação dos brotos laterais (isto é, brotos que crescem do tronco principal) é seguida pelo brotamento bífido terminal, bifurcação de um ramo em dois ramos filhos. Esta árvore uretérica consistente de dois segmentos. O primeiro é a extremidade terminal, ou pontas do brotamento, chamada “ampola”, que aparece como bulbos terminais. O segundo segmento é o “caule” do brotamento, conhecido como túbulo. Esta parte permanece após o crescimento da ampola, avançando para a periferia do metanéfro. As ampolas têm duas opções: 1) podem permanecer únicas e avançar para a periferia, ou 2) dividir-se produzindo duas novas ampolas, cada uma formando um novo túbulo (CONSTANTINI, 2006).

Durante a morfogênese por brotamento cada ampola atua como um centro indutivo, apto a iniciar a nefrogênese se existirem células tronco progenitoras no CM. Estudos do nosso grupo em colaboração com o Prof. John Bertram (Monash University, Australia) revelaram redução no número de ramificações do broto uretérico em cultura de metanéfrons de animais submetidos à restrição proteica

gestacional. Entretanto, recentemente, Wood-Bradley *et al.* (2011) verificou que a redução no número de néfrons, neste modelo, não é resultado apenas da diminuição no número de ramificações do BU mas também da redução durante a formação dos néfrons na extremidade metanéfrica das ramificações.

Hendry *et al.* (2011) reviram os possíveis fatores que podem estar envolvidos na cessação da nefrogênese. Dentre eles é descrito o mecanismo de exaustão passiva no qual a sub-população de células tronco auto-renováveis do CM poderiam ser exauridas precocemente. Durante a nefrogênese normal parte destas células se diferencia e parte permanece em divisões sucessivas mantendo o número necessário de células tronco suficientes para completar a nefrogênese.

Assim, o número de células tronco progenitoras em proliferação é diretamente relacionado ao número de néfrons originados ao término da nefrogênese. No 11.5<sup>o</sup> dia gestacional de camundongos o CM é constituído por cerca de 6.000 células em cada extremidade do BU e este número vai reduzindo sendo que no 19.5<sup>o</sup> dia o CM é constituído por 120 células (KOBAYASHI *et al.*, 2008). Por isso a importância de identificar modificadores genéticos relacionados a manutenção das células progenitoras de néfrons durante o desenvolvimento renal (KANN *et al.*, 2015).

Couillard e Trudel (2009) demonstraram que a deleção de *c-myc* no MM de camundongos no início da nefrogênese (11.5<sup>o</sup> dia) leva à hipoplasia renal (redução de cerca de 25% dos néfrons) que persiste na idade adulta. O protooncogene *c-myc* é um membro da família *myc* que codifica fatores de transcrição. As proteínas *myc* estão envolvidas na proliferação, crescimento, apoptose e diferenciação celular. Os membros da família *myc* são altamente expressos durante a organogênese e a expressão destes vai reduzindo até o final

do desenvolvimento, sendo assim, concluem que *c-myc* é um modulador essencial do desenvolvimento renal controlando o número de células tronco progenitoras que são fundamentais para que ocorra o brotamento final do BU.

Por outro lado, somente as células tronco progenitoras, dentre os outros tipos celulares do CM, expressam *six 2* e *cited 1* (HERZLINGER *et al.*, 1992; SARIOLA, 2002; NISHINAKAMURA and OSAFUNE, 2006; BOYLE *et al.*, 2008) sendo estes considerados marcadores destas células progenitoras (COUILLARD e TRUDEL, 2009). Ambos genes são expressos no CM ao redor da extremidade do BU bem como *c-myc* (SCHMID *et al.*, 1989; MUGRAUER & EKBLUM, 1991; STANTON *et al.*, 1992) mas não são expressos pelas demais células epiteliais derivadas do MM.

Gabet *et al.* (2011) usando cultura primária de osteoblastos verificaram que a DEX inibe a progressão do ciclo celular via repressão da transcrição de ciclina A. Assim, esta inibição não esteve associada à repressão de *c-myc*. Por outro lado, Singht *et al.* (2007) submeteram metanefrons em cultura (14.5º dia) à exposição de DEX ( $10^{-5}$ M) durante 2 dias e verificaram diminuição nas ramificações do BU paralelamente à redução na expressão de fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF) e aumento de proteína morfogênica óssea 4 (BMP-4) e do fator de crescimento e transformação  $\beta 1$  (TGF-  $\beta 1$ ). Estes autores hipotetizaram que a DEX poderia causar redução na população de células mesenquimais, entretanto, são necessários estudos adicionais para comprovar as vias pelas quais ocorrem estas alterações na organogênese renal.

- **Nefrogênese e microRNAs**

microRNAs (miRNAs) são RNAs de fita simples com aproximadamente 22 nucleotídeos de comprimento, que são gerados a partir de transcritos endógenos “hairpin” (KIM, 2005). Lee (1993) descobriu os miRNAs em um nematóide (*Caenorhabditis elegans*). As funções dos pequenos RNAs variam desde a formação de heterocromatina para desestabilização do mRNA e controle da tradução (CHU & RANA, 2007; FILIPOWICZ *et al.*, 2008), até a participação em quase todos os processos biológicos, incluindo diferenciação, proliferação e morte celular, controle metabólico, silenciamento de transposons e defesa antiviral (KIM *et al.*, 2009). A descoberta e caracterização dos miRNAs está revolucionando a compreensão da regulação gênica, diferenciação celular, proliferação, apoptose, metabolismo e fisiopatologia de muitas doenças, incluindo as doenças renais (Li *et al.*, 2010).

Estes RNAs não codificantes, são transcritos como um miRNA primário, clivados em pré-miRNA pela Drosha, uma RNase III, e um cofator chamado DGCR8 (LEE *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2004; HAN *et al.*, 2004; GREGORY *et al.*, 2004). Os pré-miRNAs são transportados do núcleo para o citoplasma, pela Exportina-5. Uma vez no citoplasma, são clivados em sua forma madura com 20-22 nucleotídeos pela Dicer, outra RNase III (YI *et al.*, 2003; HUTVÁGNER *et al.*, 2001). Depois de clivado, o miRNA duplex é desenrolado e a fita funcional é carregada pelo complexo RISC. O miRNA maduro guia o complexo RISC para uma sequência complementar, geralmente na região 3' (UTR) de um alvo de mRNA (DU & ZAMORE, 2005). Esta ligação reduz o nível de expressão da proteína alvo via inibição ou degradação do mRNA (FIGURA 4).

Cada miRNA pode regular a tradução de um grande número de diferentes mRNAs e cada mRNA pode ter múltiplos sítios de ligação para um único ou muitos miRNAs diferentes, isso porque a especificidade do miRNA é determinada, principalmente, por pareamento de bases (Watson e Crick) na região 5' do miRNA (BENTWICH *et al.*, 2005). Atualmente, mais de 28.000 miRNAs de 223 espécies estão registrados no banco de dados miRBase – versão 21 (<http://www.mirbase.org>).

No contexto de desenvolvimento renal e doenças, vários grupos tem mostrado que os miRNAs são indispensáveis para o desenvolvimento do rim (HARVEY *et al.* 2008; SHI *et al.* 2008; SEQUEIRA-LOPEZ *et al.* 2010; WEI *et al.* 2010; HO *et al.* 2011; NAGALAKSHMI *et al.* 2011; ZHDANOVA *et al.* 2011; CHU *et al.* 2014; MARRONE *et al.* 2014; PHUA & HO 2015). Alguns dos miRNAs expressos nas células progenitoras renais são: miR-10a, miR-106b e miR-17-5p. Estes têm como alvo a proteína pró-apoptótica Bim. Durante o desenvolvimento renal, a perda de miRNAs nas células progenitoras resulta em perda prematura desta população de células e como consequência, diminuição do número de néfrons (HO *et al.*, 2011; NAGALAKSHMI *et al.*, 2011). Isto é acompanhado pelo aumento da apoptose e elevada expressão da proteína Bim, nas células progenitoras (HO *et al.*, 2011). Assim os miRNAs modulam o balanço entre a apoptose e a sobrevivência destas células progenitoras (HO & KREIDBERG, 2012).

Estudos tem demonstrado que o miR-199a-5p tem um papel importante na proliferação celular no câncer, na fibrose, na hipertrofia cardíaca e angiogênese (MONASTYRSKAYA *et al.*, 2013; XU *et al.*, 2012; SAKURAI *et al.*, 2011; SHEN *et al.*, 2010; RANE *et al.*, 2010). E a inibição do miR-199a-5p também reduz a

proliferação de células cística e induz a apoptose, além de controlar o ciclo celular (Sun *et al.*, 2015).

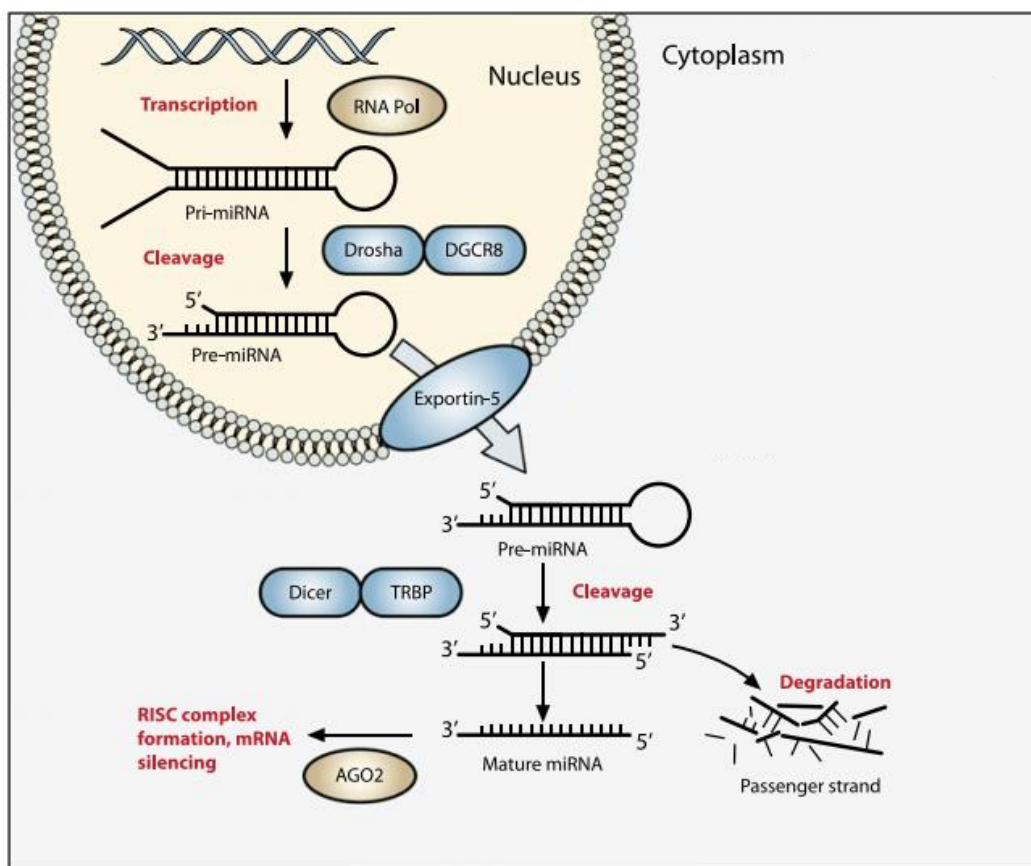
O papel da família do miRNA let-7, na promoção da diferenciação celular tem sido amplamente estudado em vários órgãos (AMBROS, 2011; BAO *et al.*, 2013; BUSSING *et al.*, 2008; COPLEY & EAVES, 2013; MEZA-SOSA *et al.*, 2014; ROUSH & SLACK, 2008; SOKOL, 2012). Uma função que é bem conservada dessa família de miRNAs é participar da supressão dos reguladores de destino celular iniciais e promover a diferenciação celular à medida que o desenvolvimento continua (NAGALAKSHMI *et al.*, 2014).

O miR-127 tem como um de seus alvos o proto-oncogene Bcl6 (SAITO *et al.*, 2006). Em células do fígado, quando o miR-127 estava menos expresso foi observado aumento da proliferação celular, e quando estavam superexpressos a proliferação estava inibida (PAN *et al.*, 2012). Essas observações sugerem um importante papel do miR-127 na proliferação, diferenciação e desenvolvimento (CHEN *et al.*, 2013). O grupo de CHEN (2013) classificaram esse miRNA como um novo regulador de senescência celular, via Bcl6.

A família do miR-181 é formada por 4 membros altamente conservados, o miR-181a, miR-181b, miR-181c e o miR-181d. Em um estudo *in vitro*, com células do mesênquima metanefrogênico, foi observado que o miR-181b tem como alvo Six2 e inibiu parcialmente a proliferação nessas células (IYU *et al.*, 2013); quando analisaram o miR-181c, encontraram resultados similares, o miR-181c estava atenuando a proliferação e promovendo a apoptose, contribuindo para a perda parcial do fenótipo progenitor, via redução de Six2 (LV *et al.*, 2014). O miR-181a regula a apoptose, e dentre inúmeros alvos, está Bcl2 (LI *et al.*, 2016).

Em estudo em vitro, com célula de carcinoma renal, o miR-144 atuou inibindo a proliferação celular, via mTOR (XIANG *et al.*, 2016). Sabe-se que o miR-298 está envolvido na regulação da resposta a insulina e, em processos como, sobrevivência e proliferação (WHITE, 2002). Em um estudo com cultura de células  $\alpha$  do pâncreas, foi observado que quando a expressão do miR-298 estava reduzida, a expressão dos genes alvos (IGF1R $\beta$  e TNF $\alpha$ ) desse miRNA estava aumentada, ativando vias de sinalizações correspondentes. O IGF1R é conhecido por promover resistência à apoptose (BARBAGALLO *et al.*, 2013).

Embora existam vários modelos de camundongos transgênicos que identificaram, com sucesso, os genes implicados em anomalias congênitas do rim e do trato urinário, o papel da regulação pós-transcricional dos miRNAs durante o desenvolvimento renal permanece pouco compreendido (PHUA *et al.*, 2015).



**Figura 4.** Esquema representando a biogênese dos microRNAs. Os genes de miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II em miRNA primário (pri-miRNA). Esses por sua vez, são processados pelo complexo DGCR8/Drosha, em pré-miRNAs, que são exportados do núcleo para o citoplasma através da Exportina-5. Os pré-miRNAs são clivados pela Dicer, para remover a estrutura em hairpin, originando os miRNAs maduros (~22 nucleotídeos). Então a fita, 3' ou 5', é carregada pelo complexo RISC para uma sequência complementar de um mRNA alvo. Esta ligação reduz o nível de expressão da proteína alvo, por inibição da tradução ou pela degradação do mRNA alvo (Adaptado de HOHEINSTEIN *et al.*, 2015).

## JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

## II. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Sabendo-se que:

- a programação fetal (por dieta hipoprotéica) leva à hipertensão e redução no número de néfrons;
- a exposição aumentada aos glicocorticóides maternos está envolvida na gênese da programação fetal;
- Não são conhecidos os mecanismos envolvidos na cessação da nefrogênese neste modelo;
- o número de células tronco auto-renováveis do CM é um fator que controla o número final de néfrons;
- a supressão de *c-myc* leva à redução no número de células tronco do CM e do número de néfrons;
- os miRNAs tem grande influência na ontogênese renal;
- não existem trabalhos estabelecendo a expressão de miRNAs durante a nefrogênese em animais submetidos à restrição proteica gestacional.

O objetivo deste estudo foi verificar a área, o índice de morte e proliferação celular, a expressão gênica e de miRNAs, número de células positivas para proteínas controladoras do ciclo celular e marcadoras de células tronco progenitoras em metanefros de machos da prole de ratas submetidas à restrição proteica gestacional, comparativamente aos seus controles, em diferentes períodos da ontogênese renal.

## METODOLOGIA

### III. METODOLOGIA

#### *Animais*

Foram utilizados ratos Wistar, de ambos os sexos, procedentes do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB), em idade reprodutiva. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura de 23-25 °C, umidade relativa do ar 50-60%, e ciclo claro - escuro definido por luzes acesas das 19h00 às 07h00.

#### *Acasalamento*

Os procedimentos experimentais foram realizados inicialmente no laboratório de Programação Fetal do Departamento de Morfologia e posteriormente no laboratório de Desreguladores Endócrinos e Carcinogênicos, do mesmo departamento, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp Botucatu. Tais procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética Experimental em Pesquisa do IB-UNESP (446-CEEA), estando em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal.

O protocolo de acasalamento foi executado durante o ciclo escuro, a partir das 08h00. Para tanto, cada macho foi colocado em uma caixa durante aproximadamente 15 minutos, a fim de reconhecimento e marcação do território. Após este período, uma fêmea foi colocada em cada caixa contendo um macho. Este protocolo permite visualizar, em pouco tempo, se a fêmea está em seu período reprodutivo (estro) e, portanto, receptiva ao macho. As fêmeas que não mostraram receptividade foram imediatamente retiradas da caixa e substituídas por uma nova fêmea. As fêmeas receptivas permaneceram com os machos por

aproximadamente duas horas. Para a confirmação da prenhes, foi feito um lavado vaginal para a observação microscópica de espermatozoides.

### *Grupos*

Após a confirmação da prenhes, as ratas foram separadas em caixas individuais e tiveram seu peso mensurado a cada dois dias durante o período gestacional. Durante esta etapa, as rações ofertadas variavam de acordo com o grupo aos quais as fêmeas pertenciam: controle - **NP** (normal protein) as ratas receberam 30g de ração normoproteica (17% de caseína) por dia, durante toda a gestação e tratado - **LP** (low protein) receberam 30g de ração hipoproteica (6% de caseína) diariamente por todo o período gestacional. Ambas as dietas eram isocalóricas e normossódicas. As dietas normo e hipoproteica foram obtidas da empresa PRAG Soluções (Jaú-SP) e possuem os seguintes itens (Tabela 1).

As progenitoras, que foram selecionadas para o grupo de 7 dias pós-natal, voltaram a ser alimentadas com ração padrão comercial, após o nascimento da prole. Todas as ratas tiveram suas ninhadas reduzidas, por eutanásia, para 8 filhotes, afim de que todos os filhotes tivessem a mesma disponibilidade de acesso às mamas. Quando necessário foi feito reimplante de ninhada, entre os mesmos grupos.

**Tabela 1:** Itens contidos em 1kg da dieta.

<b>INGREDIENTES</b>	<b>NP-17% (AIN 93 G)</b>	<b>LP-6% (AIN 93 G)</b>
<b>Amido de milho</b>	410,1 g	484,8 g
<b>Caseína</b>	188,9 g	66,7 g
<b>Amido dextrinizado</b>	130,5 g	159 g
<b>Sacarose</b>	100 g	121 g
<b>Óleo de soja</b>	70 g	70 g
<b>Fibra</b>	50 g	50 g
<b>L-cistina</b>	3 g	1 g
<b>B. colina</b>	2,5 g	2,5 g
<b>BHT</b>	0,014 g	0,014 g
<b>Mix mineral</b>	35 g	35 g
<b>Mix vitamínico</b>	10 g	10 g

### *Coleta*

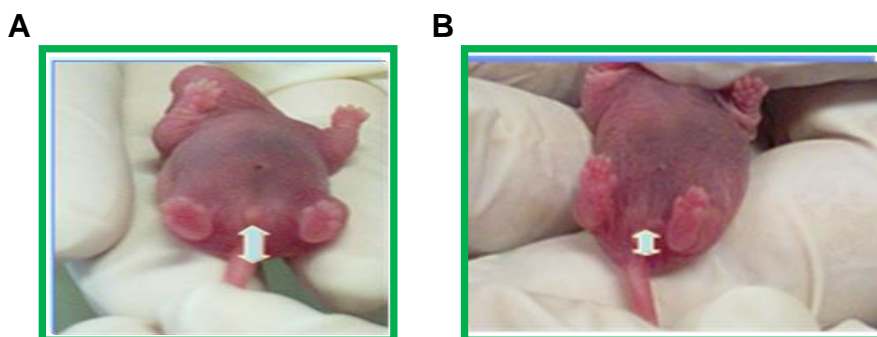
Os rins dos animais foram coletados no 17<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias gestacionais e no 7<sup>o</sup> dia de vida. Para realização da eutanásia as fêmeas foram anestesiadas com injeção intramuscular de cloridrato de cetamina (75mg/kg) e cloridrato de xilazina (10mg/kg), o útero foi exposto e os fetos foram retirados e imediatamente, foi realizada eutanásia por decapitação nos animais de 17 e 21 DG. Nos animais de 7 DPN, após a anestesia foi feita perfusão, com solução salina heparinizada, e posteriormente com paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4.

No nosso modelo experimental utilizamos apenas os machos da prole e como no 17<sup>o</sup> DG não conseguimos saber o sexo somente pela morfologia

macroscópica, coletamos amostras (cauda e membros superiores e/ou inferiores) que foram congeladas e armazenadas para realizar a sexagem por meio de PCR.

Nas coletas com 21 DG e com 7 DPN o sexo foi verificado através da distância ano genital (DAG), nos machos o valor maior, e em fêmeas menor, que 2 mm (Figura 5).

Os rins foram coletados para as seguintes técnicas: sequenciamento de nova geração (NGS), RT-qPCR e imunohistoquímica.



**Figura 5:** Distância ano-genital. A imagem (A) representa um macho (maior que 2mm) e a imagem (B) representa uma fêmea (menor que 2 mm). As distâncias foram aferidas com um paquímetro digital.

#### *Sexagem dos animais de 17 dias gestacionais*

A extração do DNA genômico foi obtida pela digestão enzimática com proteinase K a uma concentração final de 200µg/mL contendo 2% de SDS, seguida da purificação com solventes orgânicos (fenol/clorofórmio) e precipitação com acetato de amônio 7,5M e etanol absoluto gelado. A concentração do DNA foi determinada em espectrofotômetro NanoVue Plus.

O sexo dos ratos foi determinado pela técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) convencional da sequência Sry, que é um gene específico de

machos, localizado no cromossomo Y (MIYAJIMA *et al.*, 2009). Para a reação foi utilizado o Master Mix Colorless – Promega, com as condições de ciclagem indicado pelo fabricante. Na figura 6, a presença de banda está representando a sequência Sry, indicando que o animal é macho. O primer foi sintetizado pela empresa Integrated DNA Technologies (IDT), com as seguintes sequências: Forward: 5'- TACAGCCTGAGGACATATTA -3' e Reverse: 5'- GCACTTTAACCTTCGATTAG -3'.



**Figura 6:** Eletroforese em gel de Agarose indicando a presença ou ausência da banda referente ao gene Sry. Os símbolos azuis indicam onde tem banda positiva e, portanto, macho, e os símbolos na cor vermelha representa ausência de banda e assim indicando que essa amostra corresponde a fêmea. Os símbolos brancos indicam os controles.

#### *Imunohistoquímica:*

As amostras foram removidas e fixadas em paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7.4, onde ficaram imersos por 4 horas (animais 17 DG), 2 horas (21 DG e 7 DPN). Depois foram lavados em água corrente por uma hora e então foram imersos em etanol 70% até serem processados. Os materiais foram

desidratados, diafanizados e incluídos em paraplast. Foram obtidos cortes com espessura de 5 $\mu$ m em micrótomo coletados em lâminas tratadas previamente com solução de *triethoxyl-silane* (Sigma-Aldrich®). Os cortes histológicos foram desparafinizados e processados para imunofluorescência e imunistoquímica, para detecção de proteínas. Para imunofluorescência, foram incubados com solução bloqueadora (Soro fetal bovino 8%, Albumina bovina 2,5% e leite em pó desnatado 2% em PBS). Posteriormente, incubados com o anticorpo primário (anti-Six2) diluído em PBS contendo 1% de leite desnatado, overnight, sob refrigeração. Após lavagem com PBS (4 vezes com intervalos de 5 minutos) os cortes foram incubados com anticorpo secundário específico, conjugado ao fluoróforo Alexa 488, diluído no mesmo tampão, contendo 1% de leite durante 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagens sucessivas com PBS, os cortes foram montados com lamínula, utilizando-se o meio de montagem para fluorescência Vectashield (Vector Laboratories, Inc. Burlingame) e a fluorescência no espécime foi detectada por microscopia confocal à laser. As imagens foram obtidas utilizando-se o sistema Focus Imagecorder Plus.

Para as proteínas c-myc, ki67, Bcl2, TGF $\beta$ -1,  $\beta$ -catenina, Zeb1, Zeb2, VEGF, Caspase 3 clivada, ciclina A e WT1, foi realizada imunistoquímica. Os cortes histológicos, aderidos em lâminas silanizadas, foram hidratados, e após serem lavados em PBS pH 7,2 por 5 minutos, foi feita a recuperação antigênica com tampão citrato pH 6,0, por 25 minutos na panela de pressão. As lâminas foram lavadas em PBS por 3 vezes (5 minutos cada). Posteriormente foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio e metanol, por 10 minutos, no escuro. Os cortes foram lavados em PBS por 3 vezes. Seguiu-se então o bloqueio de ligações inespecíficas e para tal as lâminas foram incubadas

com solução bloqueadora (leite em pó desnatado 5%, em PBS), por 1 hora. Os cortes foram circundados com caneta hidrofóbica, e então, incubados com o anticorpo primário (Tabela 2) diluído em BSA 1%, em câmara úmida, e ficaram overnight na geladeira. Após lavagem com PBS (3 vezes com intervalos de 5 minutos) os cortes foram expostos ao anticorpo secundário específico, diluído em BSA 1%, durante 2 horas à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas com PBS (3 vezes com intervalos de 5 minutos). Os cortes foram revelados com DAB, após lavagens sucessivas com água corrente, as lâminas foram contra coradas com hematoxilina, desidratadas e montadas com lamínula, utilizando-se permount. As imagens foram obtidas utilizando-se o microscópio de luz.

Os índices de proliferação, área nefrogênica, medular, do CM e do BU foram quantificados utilizando o software ImageJ.

**Tabela 2:** Diluição dos anticorpos utilizados na imunohistoquímica.

<b>Anticorpo</b>	<b>Diluição</b>	<b>Empresa</b>
Anti-Six2 (11562-1-AP)	1:50	Proteintech
Anti-c-myc (NBP1-19671)	1:150	Novus Biologicals
Anti-Ki67 (ab16667)	1:100	Abcam
Anti-Bcl2 (ab7973)	1:100	Abcam
Anti-TGF $\beta$ -1 (sc-146)	1:50	Santa Cruz
Anti-B-catenina (ab32572)	1:500	Abcam
Anti-Zeb1 (sc-10572)	1:50	Santa Cruz
Anti-Zeb2 (sc-48789)	1:50	Santa Cruz
Anti-VEGF (NB100-664)	1:50	Novus Biologicals
Anti-Caspase-3 clivada (9664)	1:200	Cell Signaling
Anti-Ciclina A (sc-31085)	1:50	Santa Cruz
Anti-WT1 (sc-192)	1:50	Santa Cruz

## *Avaliação da expressão gênica por Sequenciamento de nova geração (NGS):*

### *a. Extração do RNA total*

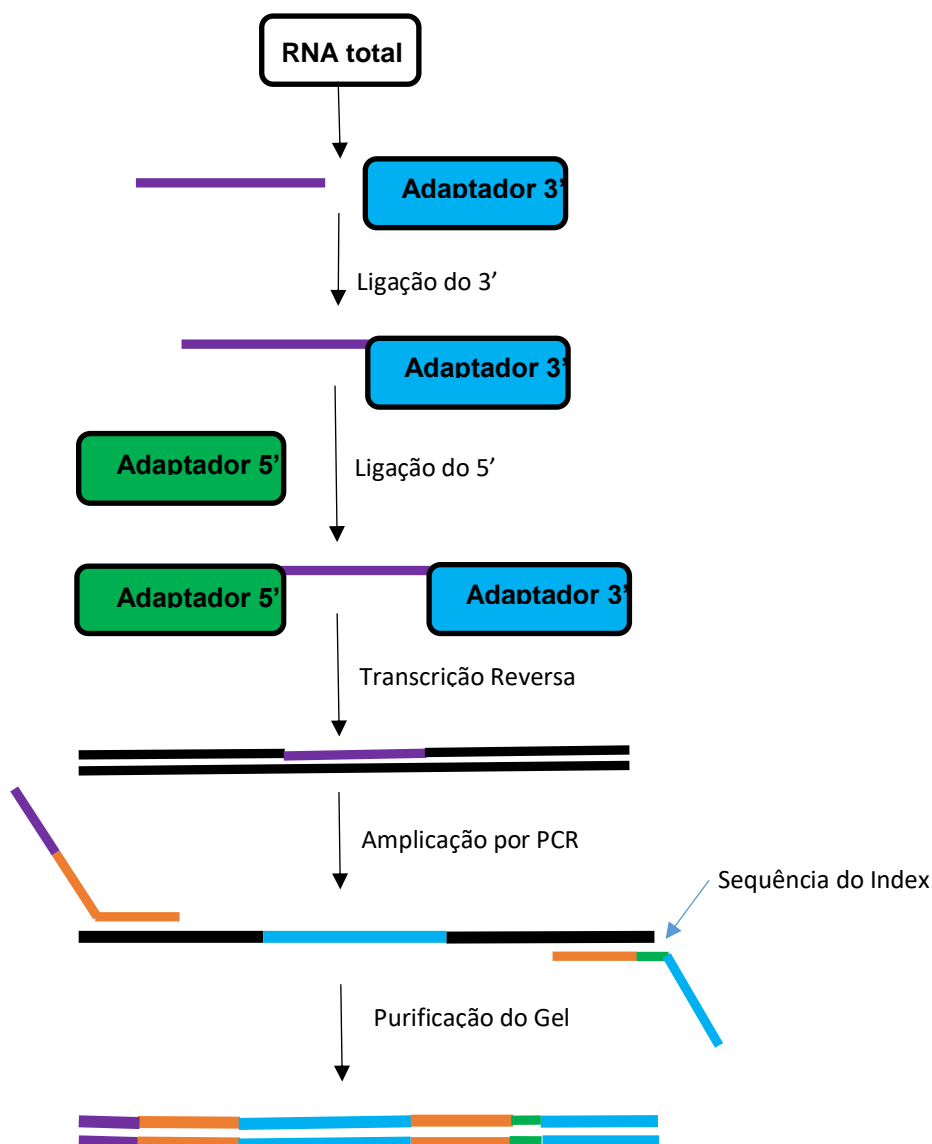
A extração do RNA foi realizada com o Trizol LS Reagent (Invitrogen – Life Technologies), segundo as instruções do fabricante. O sedimento de RNA foi diluído em 15 µL (17DG) ou 30 µL (21DG e 7DPN) de água ultrapura.

### *b. Análise da qualidade do RNA*

A quantidade de RNA total foi determinada pela absorbância de 260nm usando espectrofotômetro nanoVue (GE healthcare, USA) e a pureza do RNA foi avaliada pelas razões A260nm/A280nm e A260nm/A230nm (aceitável quando ambas as razões foram > 1,8). A integridade do RNA foi garantida pelo número da integridade do RNA (RNA Integrity Number, RIN), foram utilizadas as amostras quando > 8, através do sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Germany).

### *c. Sequenciamento de miRNA e análise dos dados*

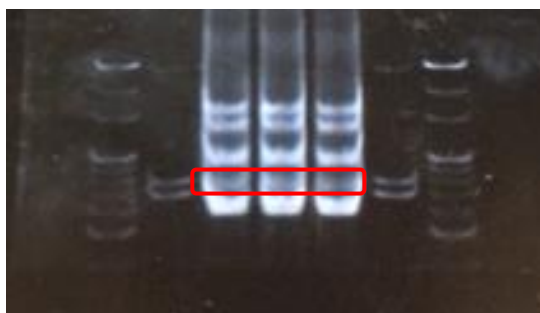
O sequenciamento foi realizado na plataforma MiSeq (Illumina), no laboratório da Prof. Dra. Íscia Cendes, na Unicamp. O protocolo utilizado seguiu as instruções do fabricante, disponível em ([http://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet\\_truseq\\_sample\\_prep\\_kits.pdf](http://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_truseq_sample_prep_kits.pdf)). Em resumo, o sequenciamento incluiu a construção de biblioteca para cada amostra, e para isso foi utilizado 500ng de RNA total. Nesta etapa são ligados os adaptadores, 3' e 5'. Os adaptadores são ligados em cada final da molécula de RNA (figura 7). Após a ligação dos adaptadores, uma reação de transcrição reversa foi realizada para criar cDNA (fitas simples).



**Figura 7:** Esquema das etapas de preparo da biblioteca (Adaptado do protocolo TruSeq, construção de bibliotecas, da Illumina).

Esse cDNA foi então amplificado por uma reação de PCR convencional, que usa os primers que contem uma sequência de index, para identificação das amostras. Esse cDNA foi purificado em gel de acrilamida, para subsequente geração de clusters (amplificação de fragmentos específicos).

Após correr o gel em uma eletroforese vertical, foi cortada a região que corresponde ao tamanho dos miRNAs (figura 8), com auxílio da luz ultravioleta. Após ter retirado apenas o pedaço do gel que corresponde a região que contém miRs, esse gel ficou eluindo *overnight* em um forno de hibridização a 30°C aproximadamente. No dia seguinte, o sobrenadante foi removido e o gel precipitado foi descartado. Após quantificação da biblioteca, a mesma foi normalizada a concentração de 2nM, usando Tris-HCl 10 nM, pH 8,5, e, posteriormente as amostras foram inseridas no sequenciador (MiSeq).



**Figura 8:** Imagem do gel usado para purificação da biblioteca. Em vermelho, regiões referentes aos miRNAs.

A análise e interpretação dos dados foram realizadas em colaboração com do Dr. Tao Chen, da Division of Genetic and Molecular Toxicological do FDA-Jefferson-AR. Os dados do NGS dos miRNAs foram gerados em arquivos de textos com formato FASTAQ, que foram extraídos e importados para o BaseSpace (<http://www.basespace.illumina.com>), um software desenvolvido pelo fabricante Illumina. A qualidade dos dados e o número de reads foram avaliados pelo site acima, e foram extraídos e pré-processados, as bases foram nomeadas (base-calling) utilizando o software CASAVA, desenvolvido pelo fabricante (Illumina). As análises de dados inicia com a remoção do adaptador 3', utilizando o software

localizado no BaseSpace chamado “miRNA Analysis” (Universidade de Torino, Canadá). Esta etapa remove as bases extras, já que a primeira base sequenciada começa depois da sequência do adaptador 5', e continua aproximadamente até 36 pares de base (pb), e como o miR tem aproximadamente 25 pb, então o restante das sequências são do adaptador 3'. Este software, miRNA Analysis, pode ser utilizado para a análise de miRNA tanto de amostras de humano quanto de rato. Então, após a remoção do adaptador 3' é gerado um novo arquivo de dados FASTAQ para cada amostra.

A próxima etapa é o mapeamento das sequências para os diferentes miRNAs, esse passo foi realizado utilizando o Small RNA (Illumina, USA) que pode ser aplicado para genoma de rato. Este software suporta o kit de preparo de amostras de pequenos RNAs – TruSeq, que foi utilizado na construção das bibliotecas, e então se assume que os reads, referentes aos adaptadores, já foram devidamente trimados. Esse software alinha os reads contra 4 bases de dados de referência, e identifica miRNAs e famílias de miRNAs diferencialmente expressos. Através desse software foi obtida uma lista de todos miRNAs que foram sequenciados e a comparação dos diferentes grupos. Usando como critério,  $p < 0.05$ , foi gerado um conjunto de lista de miRNAs diferencialmente expressos e com isso foi finalizada a análise do perfil de expressão dos miRNAs. Depois de obter os dados, foi realizada a análise de classificação. Análises de Hierarquia de Clusters (Hierarchical of Cluster Analysis - HCA) e Análises do Componente Principal (Principal Component Analysis - PCA) foram usadas para classificar cada amostra de acordo com a expressão de miRNAs. Estas análises foram realizadas no software Array Track (National Center for Toxicological Research, USA). Para explorar a função dos miRNAs diferencialmente expressos, estes

foram analisados usando o software *on line* Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity, USA). As funções, vias e redes envolvidas com os miRNAs diferencialmente expressos foram identificadas e após análise, as vias que mais nos interessaram neste momento estão sendo estudadas e tanto os miRNAs relacionados, bem como seus alvos serão validados por RT-qPCR.

*Validação da expressão de miRNAs e gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR).*

*a. Reação de Transcrição Reversa*

O RNA total foi extraído como descrito anteriormente (item a).

A transcrição reversa dos mRNAs dos rins de 17 e 21 DG e 7 DPN foi realizada utilizando o kit *High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix* (Life Technologies, EUA), seguindo as orientações do fabricante. E a transcrição reversa do miRNAs dos rins de 17 e 21 DG e 7DPN foi realizada com o kit *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription* (Life Technologies, EUA), de acordo com as orientações do fabricante.

*b. PCR quantitativo em Tempo Real*

Para a análise do nível de expressão do gene Bax, Bim, Caspase-3, Colágeno 1, GDNF, PCNA, TGF $\beta$ -1, Bcl-2, Bcl-6, c-myc, c-ret, ciclina A, Map2k2, PRDM1, Six-2, VEGF, Ki67, mTOR,  $\beta$ -catenina, ZEB1, ZEB2, NOTCH1 e IGF1, o RNA foi transcrito reversamente, como citado acima. O RT-qPCR foi realizado com SYBR green Master Mix (Life Technologies, EUA), utilizando primers específicos para cada gene (Tabela 3). As reações foram feitas em um volume total de 20  $\mu$ L, usando 2  $\mu$ L de cDNA (diluído 1:30), 10  $\mu$ L SYBER green Master

Mix (Life Technologies, EUA) e 4  $\mu$ L de cada primer específico (5 nM) e realizadas no sistema StepOnePlus PCR em tempo real (Applied Biosystems™).

Para a análise dos microRNAs, miR-127-3p, miR-144-3p, miR-298-5p, let-7a-5p, miR-181a-5p, miR-181c-3p e miR-199a-5p foi utilizado *TaqMan MicroRNA Assays* (Life Technologies, EUA), e para cada reação foram utilizados 10  $\mu$ L de *TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG* (2x), 1  $\mu$ L de *TaqMan MicroRNA Assays*, 2  $\mu$ L do produto da reação de transcrição reversa e o volume final ajustado para 20  $\mu$ L com água livre de nucleases. As reações foram utilizadas no sistema StepOnePlus PCR em tempo real (Applied Biosystems™).

#### c. Análises da expressão

O nível de expressão dos mRNA ou dos miRNAs foram comparados com seu respectivo grupo controle. A expressão dos mRNAs foi normalizada utilizando a expressão do gene GAPDH, já a expressão dos miRNAs foi normalizada usando a expressão dos genes de referência snRNA U6 e snRNA U87.

A expressão gênica relativa foi avaliada através do método de quantificação comparativo (PFAFFL, 2001). Todas as quantificações relativas foram avaliadas usando o software DataAssist, v 3.0, utilizando o método  $\Delta\Delta$ CT.

#### *Estatística*

Foi usado teste t e os valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão, n=4.  $P \leq 0.05$  foi considerado significativo. Foi utilizado o software GraphPad Prisma v .01 (GraphPad Software, Inc., USA) para análise estatística e construção dos gráficos.

**Tabela 3:** Sequência dos primers utilizados para RT-qPCR, desenhados pela empresa IDT.

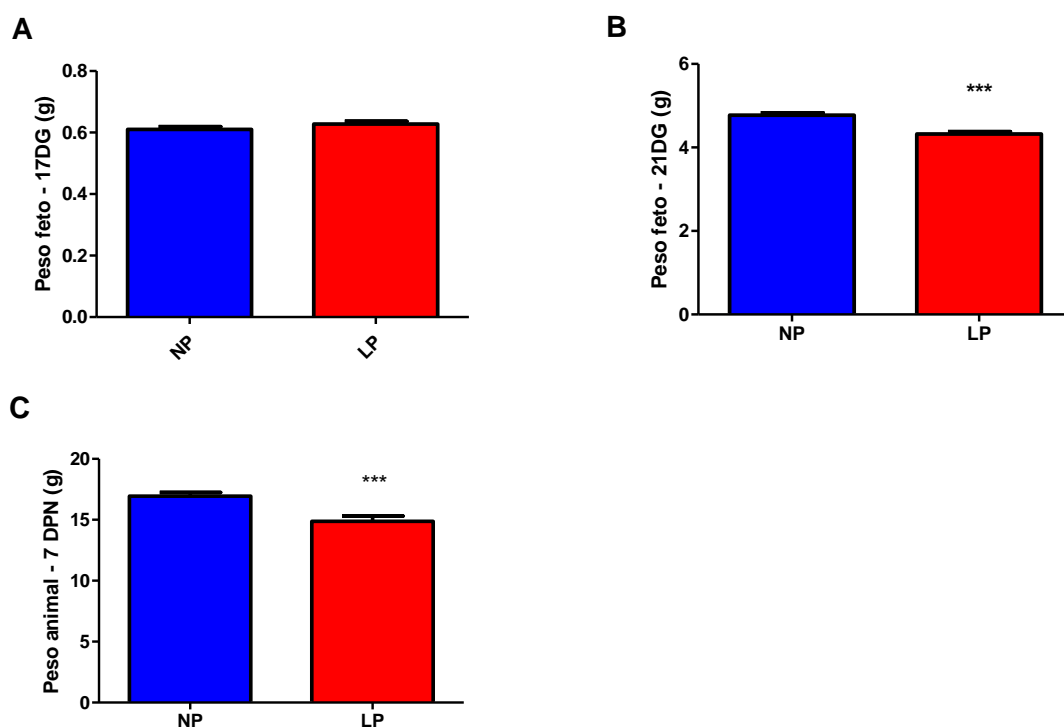
<b>GENE</b>	<b>SEQUÊNCIA FORWARD</b>	<b>SEQUÊNCIA REVERSE</b>
<b>Six2</b>	5'-GCCGAGGCCAAGGAAAGGGAG-3'	5'-GAGTGGTCTGGCGTCCCCGA-3'
<b>c-myc</b>	5'-AGCGTCCGAGTGCATCGACC-3'	5'-ACGTTCCAAGACGTTGTGTG-3'
<b>c-ret</b>	5'-GTTTCCCTGATGAGAAGAAGTG-3'	5'-GTGGACAGCAGGACAGATA-3'
<b>Bcl-2</b>	5'-ACGGTGGTGGAGAACTCTT-3'	5'-GTCATCCACAGAGCGATGTTG-3'
<b>Col-1</b>	5'-ACCTGTGTGTTCCCCACT-3'	5'-CTTCTCCTTGGGTTTGGGC-3'
<b>TGFB-1</b>	5'-GGACTCTCCACCTGCAAGAC-3'	5'-GACTGGCGAGCCTTAGTTTG-3'
<b>Ciclina A</b>	5'-GCC TTCACCATTCATGTGGAT-3'	5'-TTGCTGCGGGTAAAGAGACAG-3'
<b>Bax</b>	5'-TTCAGTGAGACAGGAGCTGG-3'	5'-GCATCTTCCTTGCCTGTGAT-3'
<b>Bim</b>	5'-CAATGAGACTTACACGAGGAGG-3'	5'CCAGACCAGACGGAAGATGAA-3'
<b>Casp 3</b>	5'-ACGGGACTTGAAAGCATC-3'	5'-TAAGGAAGCCTGGAGCACAG-3'
<b>GDNF</b>	5'-CAGAGGGAAAGGTCGCAGAG-3'	5'-TCGTAGCCCAAACCCAAGTC-3'
<b>Ki67</b>	5'-GTCTCTTGGCACTCACAG-3'	5'-TGGTGGAGTTACTCCAGGAGAC-3'
<b>mTOR</b>	5'-ACGCCTGCCATACTTGAGTC-3'	5'-TGGATCTCCAGCTCTCCGAA-3'
<b>VEGF</b>	5'-CGGGCCTCTGAAACCATGAA-3'	5'-GCTTTCTGCTCCCCTTCTGT-3'
<b>GAPDH</b>	5'-CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3'	5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3'
<b>B-catenina</b>	5'-AGTCCTTTATGAGTGGGAGCAA-3'	5'-GTTTCAGCATCTGTGACGGTTC-3'
<b>Map2K2</b>	5'-ACCGGCACTCACTATCAACC-3'	5'-TTGAGCTCACCGACCTTAGC-3'
<b>Bcl-6</b>	5'-CCAACCTGAAGACCCACACTC-3'	5'-GCGCAGATGGCTCTTCAGAGTC-3'
<b>PCNA</b>	5'-TTTGAGGCACGCCTGATCC-3'	5'-GGAGACGTGAGACGAGTCCAT-3'
<b>PRDM1</b>	5'-CTTGTGTGGTATTGTCGGGAC-3'	5'-CACGCTGTACTCTCTCTTGG-3'
<b>NOTCH1</b>	5'-ACTGCCCTCTGCCCTATAACA-3'	5'-GACACGGGCTTTTCACACAC-3'
<b>IGF1</b>	5'-AAGCCTACAAAGTCAGCTCG-3'	5'-GGTCTTGTTTCTGCACTTC-3'
<b>ZEB1</b>	5'-CATTTGATTGAGCACATGCG-3'	5'-AGCGGTGATTCATGTGTTGAG-3'
<b>ZEB2</b>	5'-CCCTTCTGCGACATAAATACGA-3'	5'-TGTGATTCATGTGCTGCGAGT-3'

## RESULTADOS

## IV. RESULTADOS

### *Peso e Morfometria*

Os fetos com 17DG não apresentaram diferença de peso corpóreo, quando comparados os grupos. Já os fetos com 21DG e os animais com 7DPN, do grupo tratado (LP), apresentaram redução significativa no peso (Figura 9).



**Figura 9.** Peso dos animais com 17DG (A), 21DG (B) e 7DPN (C).

### *Expressão de miRNAs e gênica*

Na tabela 4 temos o número de miRNAs diferencialmente expressos (DEM) e de famílias diferencialmente expressas (DEMF), nos diferentes períodos analisados. Na tabela 5 (Anexo 2), está demonstrado o perfil global de expressão de miRNAs, em diferentes comparações, obtido pelo software BaseSpace. O

gráfico de Volcano Plot dos animais de 17 DG, 21 DG e 7 DPN mostra os miRNAs do grupo LP diferencialmente expressos em relação ao grupo NP (Figura 10-12).

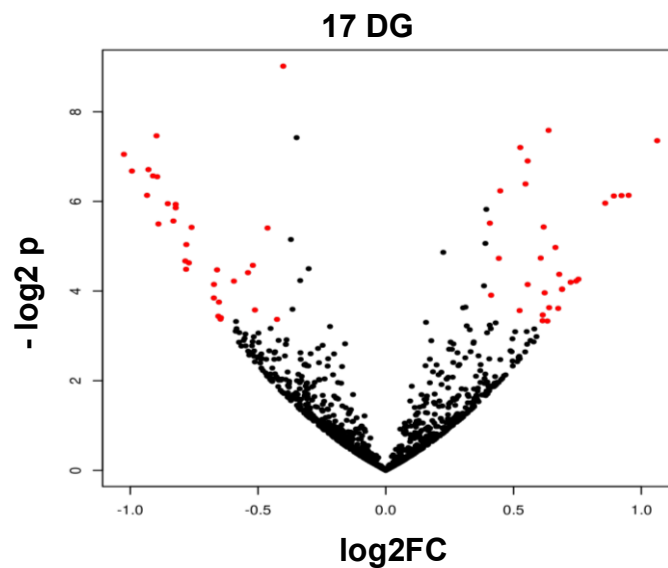
A classificação dos grupos, realizada pelo software Array Track, está demonstrada nas figuras 13 (HCA) e 14 (PCA).

As funções, vias e redes envolvidas com os miRNAs diferencialmente expressos foram identificadas e listadas nas tabelas 6, 7, 8, 9, 10 e 11 (Anexo 3). Todas as redes, obtidas pelo software Ingenuity através dos miRNAs diferencialmente expressos, estão em anexo, como anexo 4 (17 DG), anexo 5 (21 DG) e anexo 6 (7 DPN).

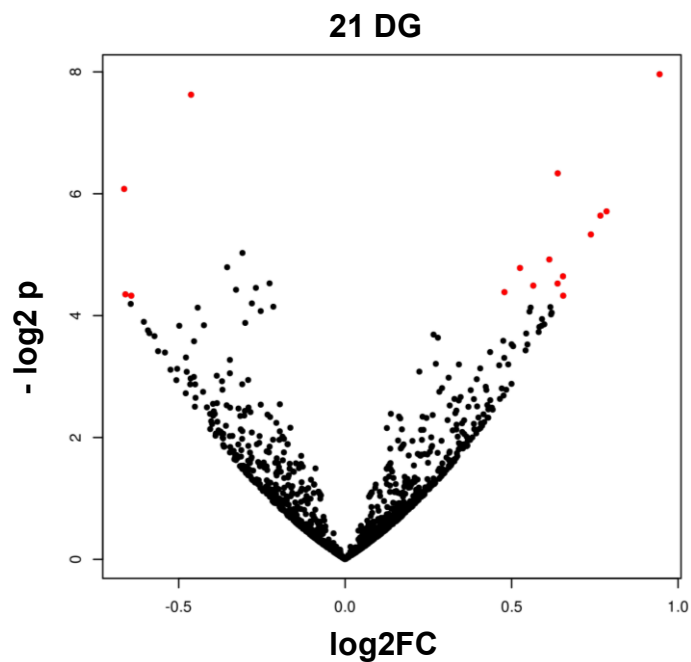
Para a validação dos miRNAs, optou-se por validar aqueles sabidamente relacionados aos processos de proliferação, diferenciação celular e apoptose que ocorrem durante o desenvolvimento renal (Figura 15). No diagrama de Venn, temos os miRNAs mais expressos em cada idade e os que foram selecionados para a validação (Figura 16). Seus respectivos alvos, de acordo com as redes obtidas pelo Ingenuity, também foram validados por RT-qPCR.

**Tabela 4:** Número de miRNAs e de famílias de miRNAs diferencialmente expressos em diferentes comparações.

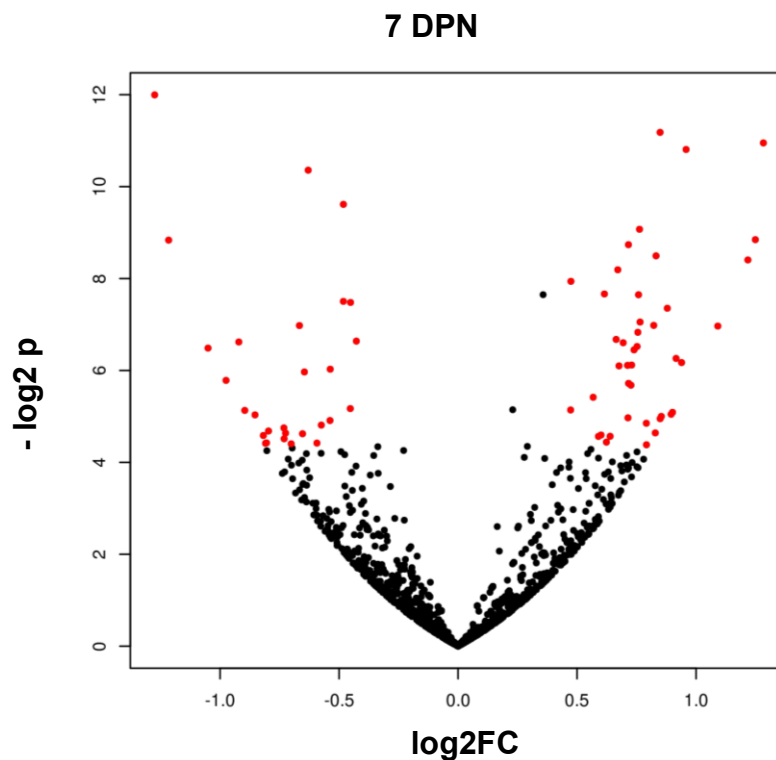
Comparações	Família de miRNA (Total 218)	miRNA (Total 1557)
	p< 0.05	p< 0.05
NP (17 DG) vs. NP (21 DG)	71	317
NP (17 DG) vs. NP (7 DPN)	86	439
NP (21 DG) vs. NP (7 DPN)	53	296
NP (17 DG) vs. LP (17 DG)	12	44
NP (21 DG) vs. LP (21 DG)	9	21
NP (7 DPN) vs LP (7 DPN)	23	74



**Figura 10.** Volcano plot da expressão de miRNAs no metanefro dos animais de 17 DG. Cada ponto representa o valor de p associado à expressão de um dos miRNAs avaliados comparada à expressão do grupo NP. Os pontos vermelhos, a direita do zero, representa os miRNAs que estão regulados positivamente. Os pontos vermelhos, a esquerda de zero, está representando os miRNAs que estão regulados negativamente, considerando  $p < 0,05$ .

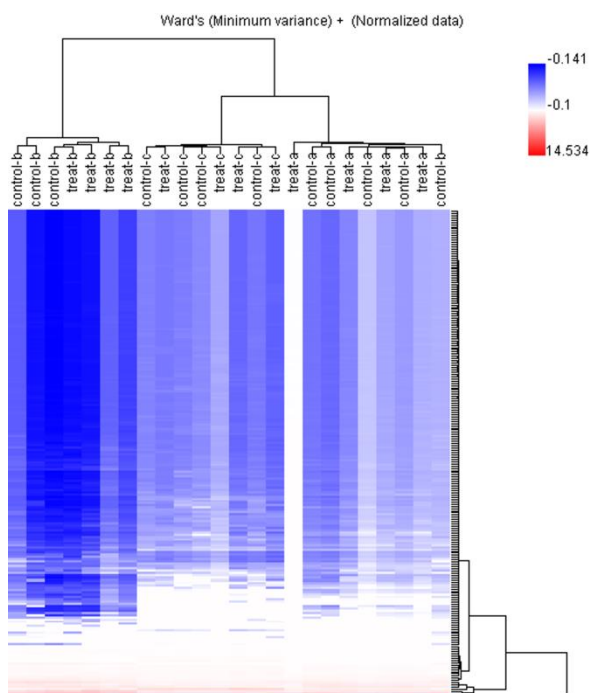


**Figura 11.** Volcano plot da expressão de miRNAs no metanefro dos animais de 21 DG. Cada ponto representa o valor de  $p$  associado à expressão de um dos miRNAs avaliados comparada à expressão do grupo NP. Os pontos vermelhos, a direita do zero, representa os miRNAs que estão regulados positivamente. Os pontos vermelhos, a esquerda de zero, está representando os miRNAs que estão regulados negativamente, considerando  $p < 0,05$ .

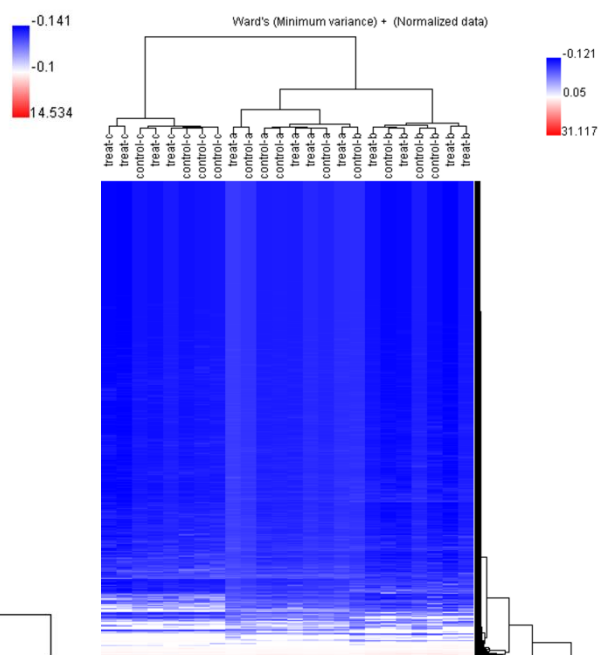


**Figura 12.** Volcano plot da expressão de miRNAs no metanefro dos animais de 7 DPN. Cada ponto representa o valor de  $p$  associado à expressão de um dos miRNAs avaliados comparada à expressão do grupo NP. Os pontos vermelhos, a direita do zero, representa os miRNAs que estão regulados positivamente. Os pontos vermelhos, a esquerda de zero, está representando os miRNAs que estão regulados negativamente, considerando  $p < 0,05$ .

### HCA (Família de miRNAs)

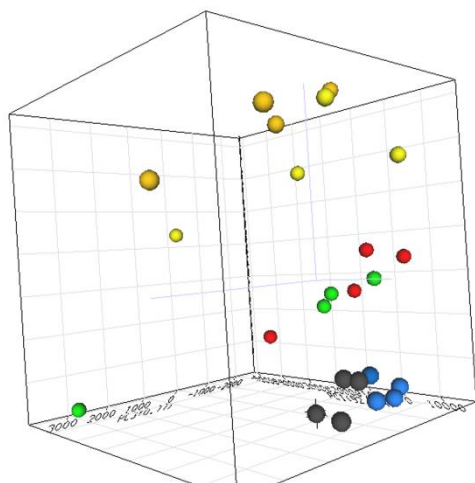


### HCA (miRNA)

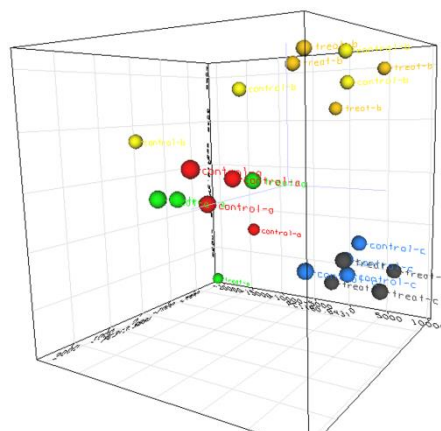


**Figura 13:** Análise Hierárquica de Clusters (HCA) das amostras de acordo com o nível de expressão das famílias de miRNAs (painel esquerdo) e miRNAs totais (painel direito). O “controle” indica as amostras dos grupos que não receberam restrição proteica, enquanto que “tratado” representa os grupos que sofreram restrição proteica gestacional. As letras “a”, “b” e “c” indicam 21 DG, 7 DPN e 17 DG, respectivamente. HCA mostrou que as amostras são agrupadas principalmente de acordo com diferentes períodos do desenvolvimento.

## PCA (Família de miRNAs)



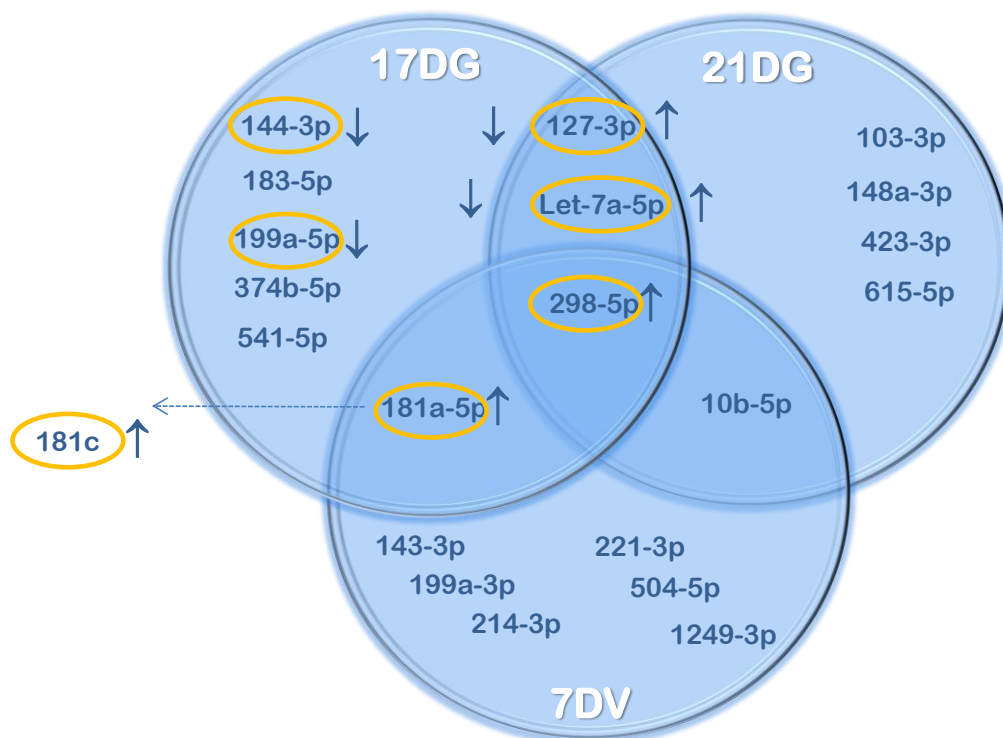
## PCA (miRNAs)



**Figura 14:** Visão tridimensional da Análise dos Componentes Principais (PCA). As amostras estão bem separadas nos diferentes tempos do desenvolvimento, levando em conta os níveis de expressão das famílias dos miRNAs (painel esquerdo) e miRNAs totais (painel direito). As cores nas figuras indicam os diferentes tempos, como: vermelho = controle a (21 DG); verde = tratado a (21 DG); amarelo = controle b (7 DPN); dourado = tratado b (7 DPN); azul = controle c (21 DG) e cinza = tratado c (17 DG).



**Figura 15.** miRNAs eleitos para o estudo de alvos baseando-se nas respostas biológicas descritas, em consequência de aumento ou redução na expressão.

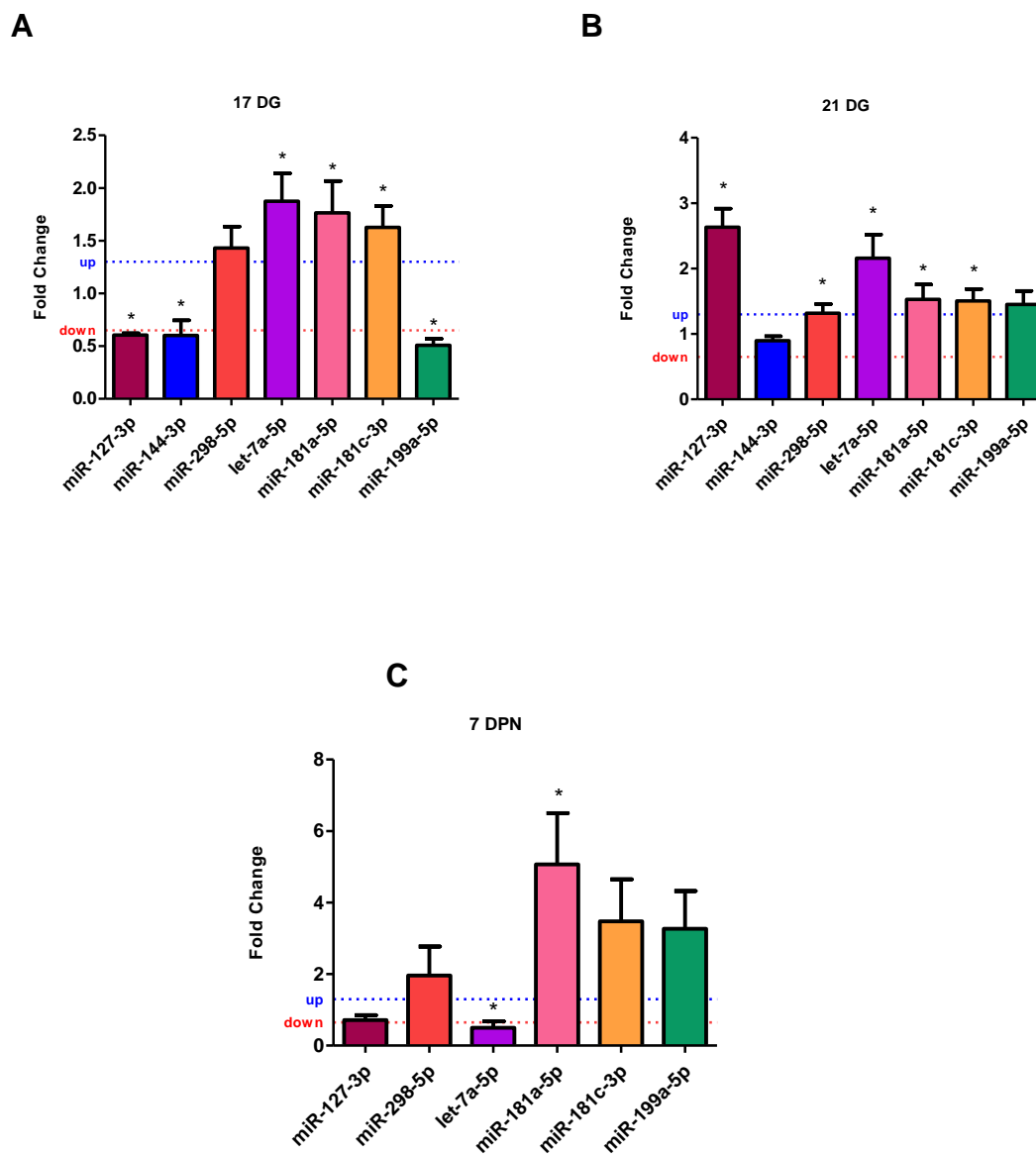


**Figura 16.** Diagrama de Venn representando os miRNAs mais diferencialmente expressos entre NP e LP aos 17 e 21 dias gestacionais e 7 dias de vida. Em amarelo estão circundados os eleitos para investigação dos alvos.

Pela técnica de RT-qPCR foram validado os seguintes miRNAs: miR-127-3p, miR-144-3p, miR-298-5p, let-7a-5p, miR-181a-5p, miR-181c-3p e o miR-199a-5p. Os animais do grupo LP, com 17 DG, estavam com uma maior expressão de let-7a-5p, miR-181a-5p, miR-181c-3p, já o miR-127-3p, miR-144-3p e o miR-199a-5p estavam menos expressos nesses animais em relação aos seus controles. O miR-298, apesar de estar com sua expressão aumentada, em relação ao controle, não teve diferença significativa (Figura 17-A). Os animais com 21 DG, do grupo LP, apresentaram uma maior expressão, do miR-127-3p, miR-298-5p, let-7a-5p, miR-181a-5p e do miR-181c-3p. Enquanto que o miR-144-3p e o miR-199a-5p não mostraram diferença significativa em sua expressão em relação ao grupo

controle (Figura 17-B). Nos animais LP, com 7 DPN, apenas 2 miRNAs mostram diferença de expressão, o miR-181a-5p que estava mais expresso nesses animais do que nos controles, e o let-7a-5p que estava menos expresso. Os demais (miR-127-3p, miR-298-5p, miR-181c-3p e o miR-199a-5p) não apresentaram diferença significativa. E interessante o miR-144-3p não foi expresso nessa idade (Figura 17-C).

A tabela 12 mostra a comparação dos resultados obtidos pelo sequenciamento dos miRNAs com os dados da validação. Na tabela 13 (Anexo 7) está representado os genes alvos preditos para os miRNAs validados.



**Figura 17:** Expressão dos miRNAs, miR-127-3p, miR-298-5p, let-7a-5p, miR-181a-5p, miR-181c-3p e miR-199a-5p estimados por TaqMan em rim de ratos de 17 dias gestacionais (A), 21 dias gestacionais (B) e 7 dias pós-natal (C). A expressão de cada miRNA foi normalizada com U6 e U87. Os dados estão expressos como fold change (média  $\pm$ SD, n=4) em relação ao grupo controle.

\* Significativamente diferente do grupo controle ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 12:** Comparação entre os valores obtidos no sequenciamento e o da validação por RT-qPCR.

miRNA (17 DG)	log FC Sequenciamento	Fold Change	<i>p-value</i>	miRNA (17 DG)	Fold Change	log FC qPCR	<i>p-value</i>
miR-127-3p	-0.911189177	0.5317	0.01053498	miR-127-3p	0.6045	-0.7262	1.97E-08
miR-144-3p	-1.024909088	0.4914	0.00754482	miR-144-3p	0.6014	-0.7335	0.0321508
miR-298-5p	0.555324736	1.4695	0.0083628	miR-298-5p	1.4317	0.5177	0.0648687
let-7a-5p				let-7a-5p	1.8747	0.9067	0.0106146
miR-181a-5p	0.637181521	1.5553	0.00520696	miR-181a-5p	1.7645	0.8193	0.0354613
miR-181c-3p	0.40731742	1.3262	0.02187935	miR-181c-3p	1.6265	0.7018	0.0273168
miR-199a-5p	-0.401388293	0.7571	0.00193047	miR-199a-5p	0.5086	-0.9755	4.551E-05

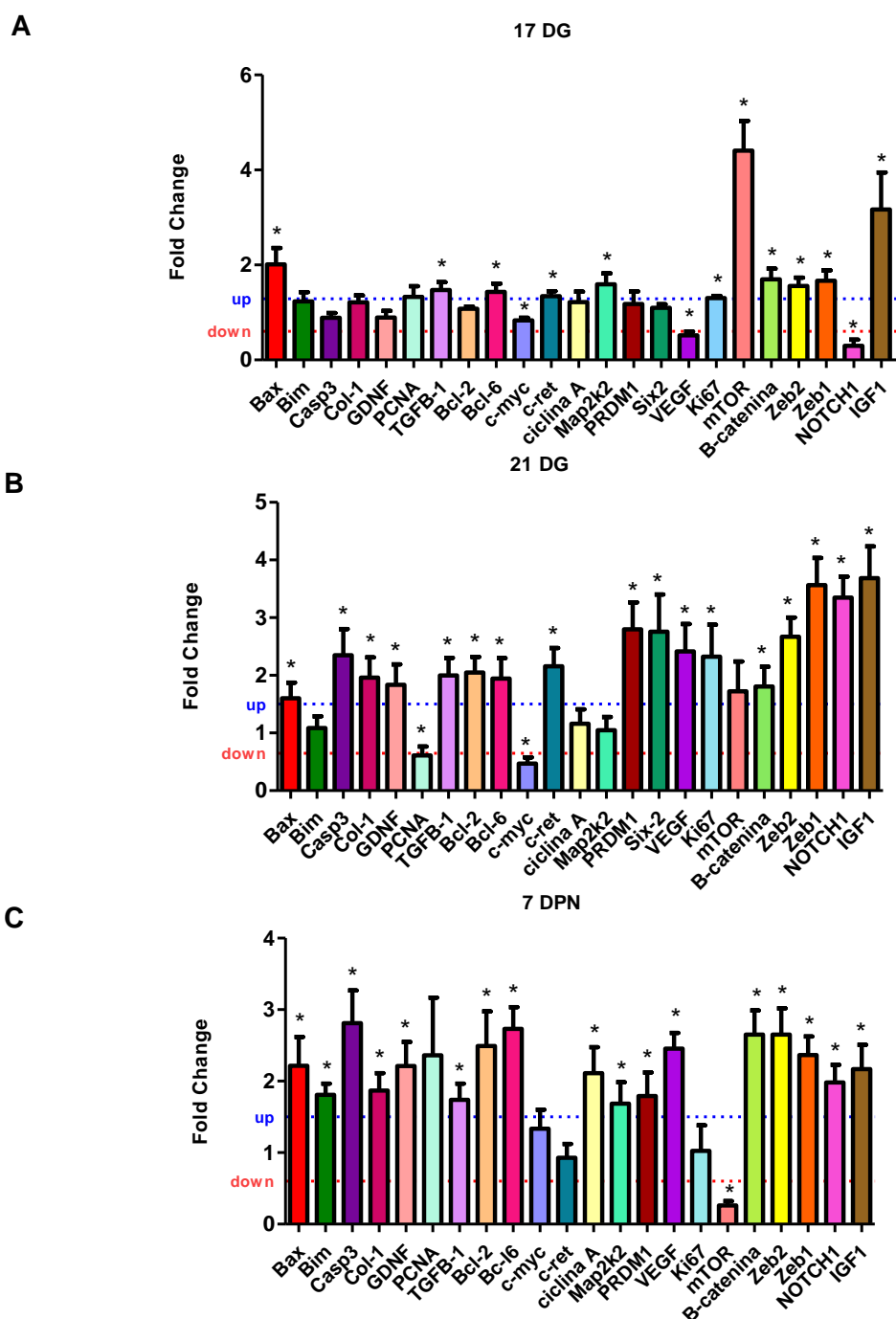
miRNA (21 DG)	RNA-Seq logFC	Fold Change	<i>p-value</i>	miRNA (21 DG)	Fold Change	qPCR logFC	<i>p-value</i>
miR-127-3p	0.565173065	1.4796	0.04442707	miR-127-3p	2.6333	1.3969	6.02E-03
miR-144-3p				miR-144-3p	0.8974	-0.1562	0.1723848
miR-298-5p	0.613353841	1.5298	0.03299593	miR-298-5p	1.3170	0.3972	0.0402289
let-7a-5p				let-7a-5p	2.1660	1.1150	0.0059875
miR-181a-5p				miR-181a-5p	1.5286	0.6122	0.0421524
miR-181c-3p				miR-181c-3p	1.5058	0.5906	0.0228443
miR-199a-5p				miR-199a-5p	1.4513	0.5373	0.0604275

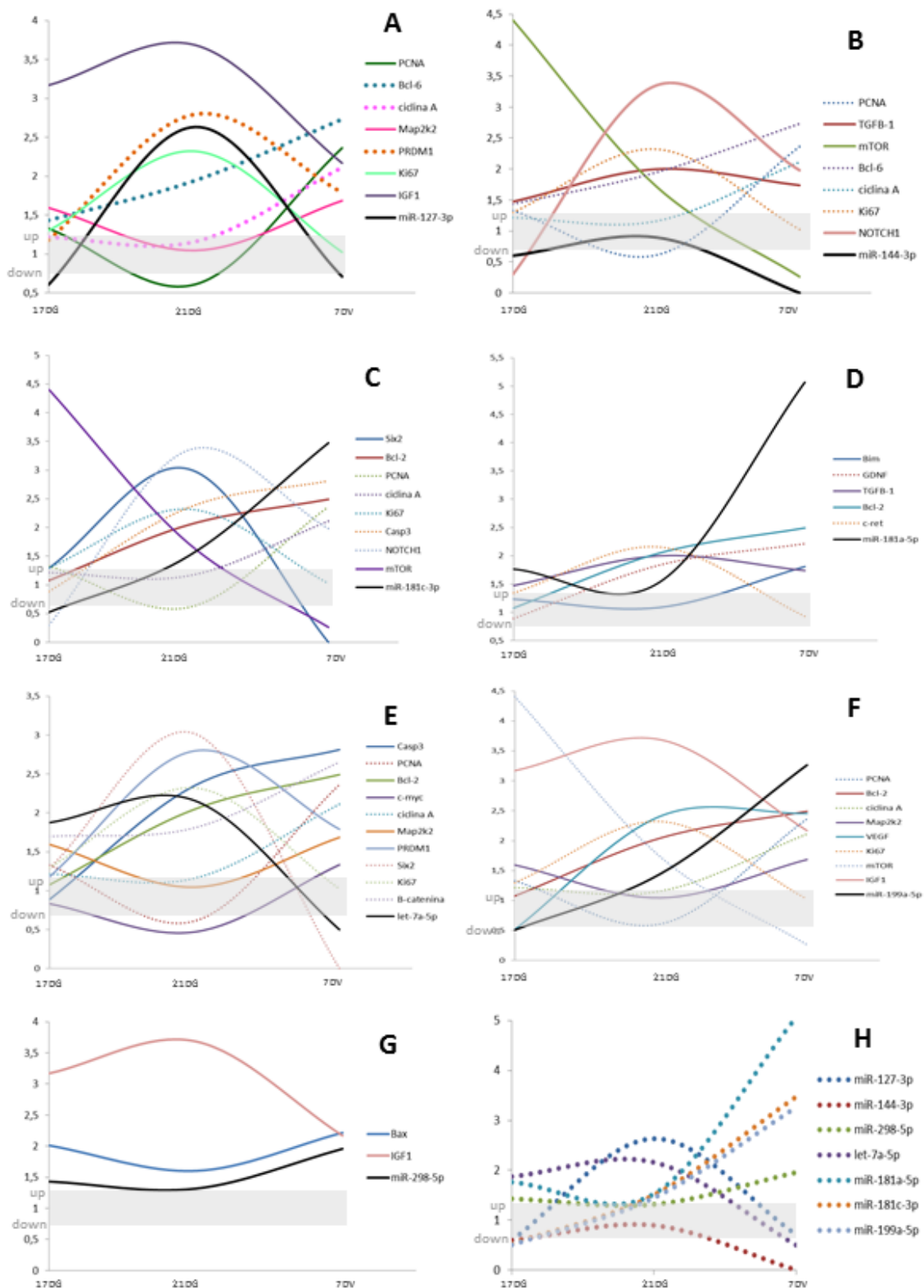
miRNA (7 DPN)	RNA-Seq logFC	Fold Change	<i>p-value</i>	miRNA (7 DPN)	Fold Change	qPCR logFC	<i>p-value</i>
miR-127-3p				miR-127-3p	0.730578	-0.4529	6.01E-02
miR-144-3p				miR-144-3p	não expressa		
miR-298-5p	0.958238445	1.9429	0.00055761	miR-298-5p	1.9583	0.9696	0.3025506
let-7a-5p	-0.537048101	0.6892	0.01533047	let-7a-5p	0.4997	-1.0008	0.0269524
miR-181a-5p	0.357437752	1.2811	0.00498333	miR-181a-5p	5.0680	2.3414	0.0217739
miR-181c-3p				miR-181c-3p	3.4746	1.7968	0.0731242
miR-199a-5p				miR-199a-5p	3.2639	1.7066	0.0858642

O RT-qPCR também foi utilizado para validar a expressão dos seguintes genes: Bax, Bim, Caspase-3, Colágeno 1, GDNF, PCNA, TGF $\beta$ -1, Bcl-2, Bcl-6, c-myc, c-ret, ciclina A, Map2k2, PRDM1, Six-2, VEGF, Ki67, mTOR,  $\beta$ -catenina, ZEB1, ZEB2, NOTCH1 e IGF1. Foi observado que o nível de expressão de six-2, Bcl-2, PRDM1, ciclina A, PCNA, GDNF, Colágeno 1, Caspase 3 e Bim, nos animais LP de 17DG, não diferiram em relação aos controles, enquanto que Bax, TGF $\beta$ -1, Bcl-6, c-ret, Map2k2, Ki67, mTOR,  $\beta$ -catenina, ZEB1, ZEB2 e IGF1 estavam com a expressão aumentada em relação aos controles. Já c-myc, VEGF e NOTHC1 estavam regulados negativamente (Figura 18-A). Nos animais LP com 21DG, o nível de expressão de Bim, ciclina A, Map2k2 e mTOR não apresentaram diferença quando comparado aos controles, entretanto c-myc e PCNA tiveram a expressão reduzida, em comparação ao grupo controle. E a expressão de Bax, Caspase 3, Colágeno 1, GDNF, TGF $\beta$ -1, Bcl-2, Bcl-6, c-ret, PRDM1, Six2, VEGF, Ki67,  $\beta$ -catenina, ZEB1, ZEB2, NOTCH1 e IGF1 estava regulada positivamente nos animais LP (Figura 18-B). Os animais com 7 dias de vida pós-natal, apresentaram o nível de expressão aumentado para Bax, Bim, Caspase 3, Colágeno 1, GDNF, TGF $\beta$ -1, Bcl-2, Bcl-6, ciclina A, Map2k2, PRDM1, VEGF,  $\beta$ -catenina, ZEB1, ZEB2, NOTCH1 e IGF1, já mTOR estava regulado negativamente, e os demais genes (PCNA, c-myc, c-ret e Ki67) não mostraram diferença significativa quando comparados aos controles (Figura 18-C).

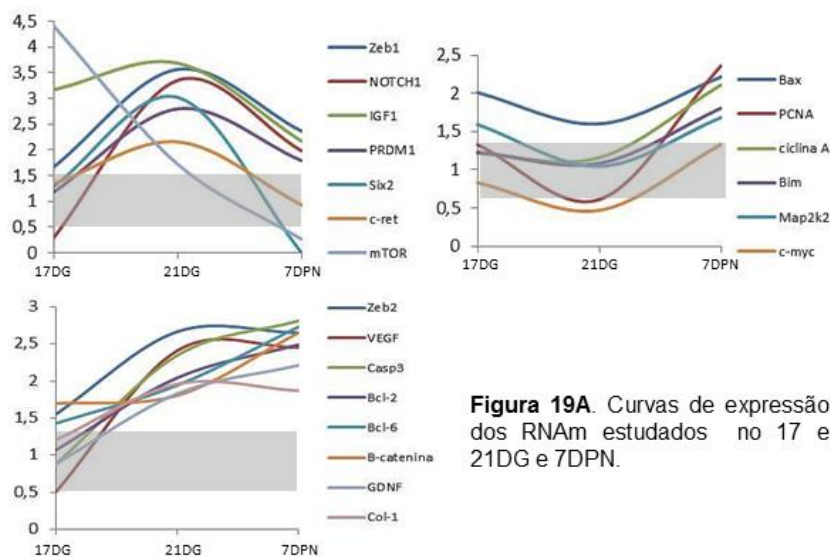
Na figura 19, está representado a expressão gênica, dos animais LP comparativamente aos NP, durante o desenvolvimento renal, juntamente com a expressão dos miRNAs.



**Figura 18:** Expressão de Bax, Bim, Caspase-3, Colágeno 1, GDNF, PCNA, TGF $\beta$ -1, Bcl-2, Bcl-6, c-myc, c-ret, ciclina A, Map2k2, PRDM1, Six-2, VEGF, Ki67, mTOR,  $\beta$ -catenina, ZEB1, ZEB2, NOTCH1 e IGF1 estimados por SyBR green RT-qPCR em rim de ratos de 17 dias gestacionais (A), 21 dias gestacionais (B) e 7 dias pós-natal (C). A expressão de cada mRNA foi normalizada com GAPDH. Os dados estão expressos como fold change (média  $\pm$ SD, n=4) em relação ao grupo controle. \* Significativamente diferente do grupo controle ( $p \leq 0,05$ ).

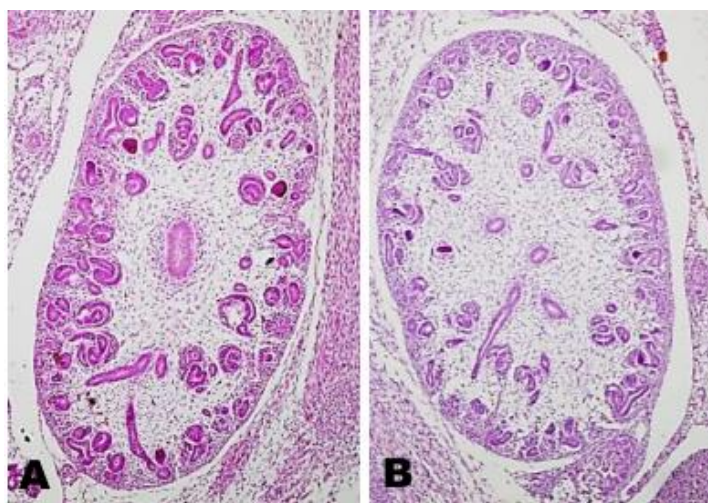


**Figura 19.** Curva de expressão dos RNAm em LP comparativamente à apresentada por NP durante o desenvolvimento renal. De A a G temos cada miRNA com seus alvos de predileção (linhas cheias) e outros possíveis alvos (linha pontilhada). Em H temos a expressão comparativa dos miRNAs estudados.

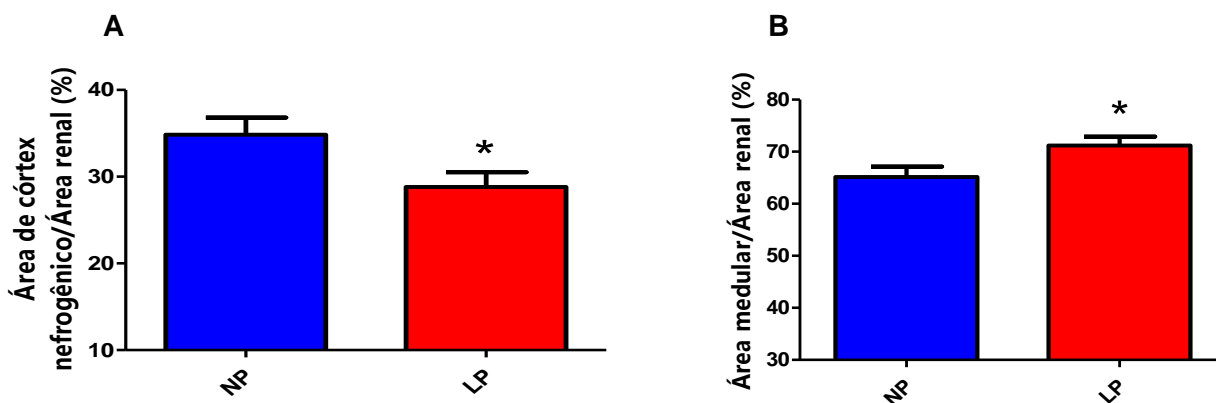


### Morfometria

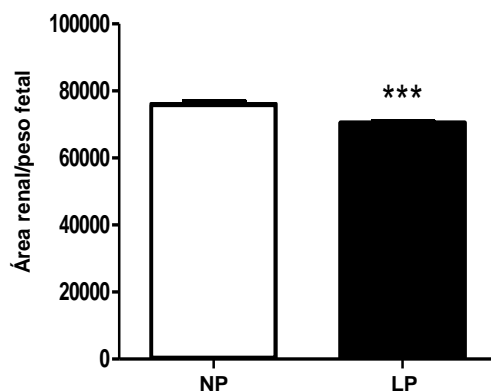
No 17<sup>o</sup> DG os rins dos fetos LP apresentaram redução significativa (7,6%) da área renal, e da área ocupada pelo córtex nefrogênico (30%). A área medular de LP foi 20% maior que a observada em NP (Figuras 20-24). As áreas ocupadas pelos cap e pelas vesículas em forma de vírgula foram significativamente menores nos animais do grupo LP (Figura 23). O número de células nos brotos do ureter (UB), nas vesículas em forma de vírgula e no MM foi significativamente maior nos animais do grupo LP (Figura 24).



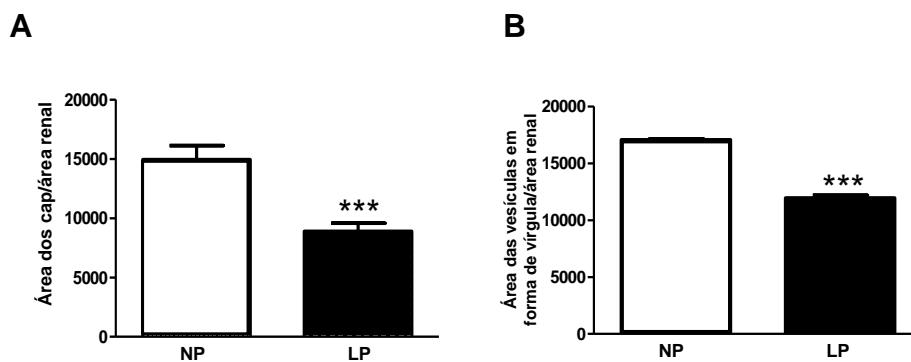
**Figura 20:** Rins de fetos de 17 DG dos grupos NP (A) e LP (B). HE, 100x.



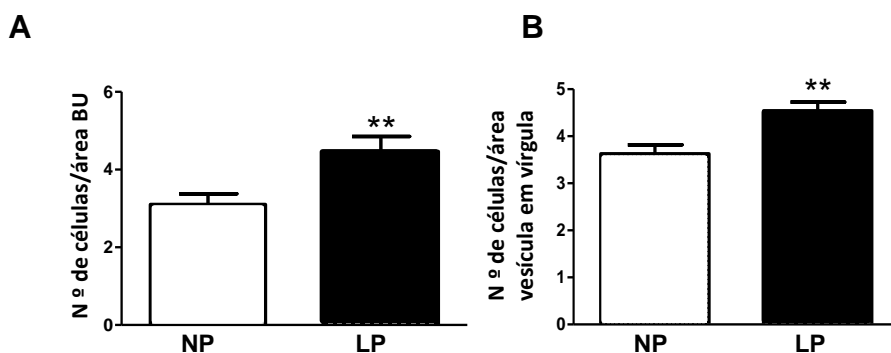
**Figura 21:** Quantificações das áreas renais dos fetos de 17 DG dos grupos NP e LP. HE, 100x. Em (A) porcentagem da área nefrogênica e em (B) porcentagem da área medular.



**Figura 22.** O gráfico representa a área renal dos fetos de 17DG.

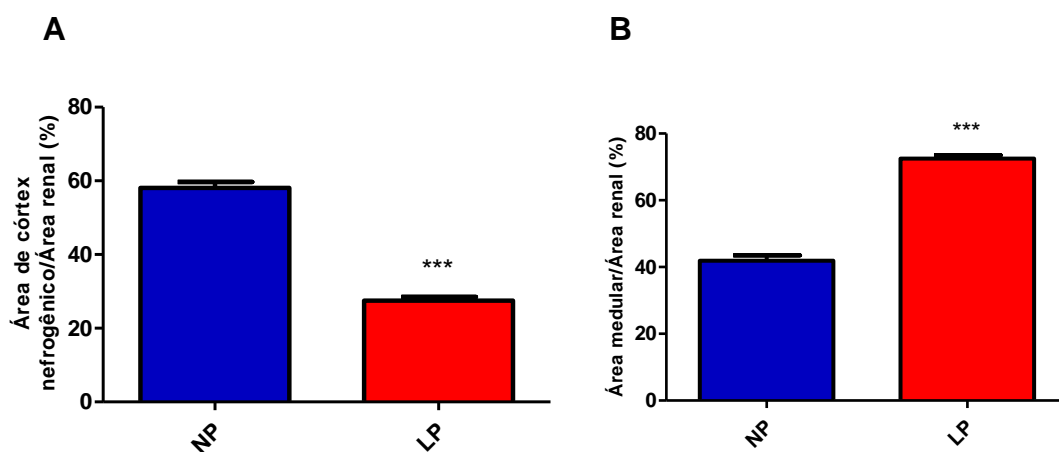


**Figura 23.** Os gráficos representam os resultados das quantificações da área dos cap (A) e das vesículas em forma de vírgula (B), nos animais de 17DG.

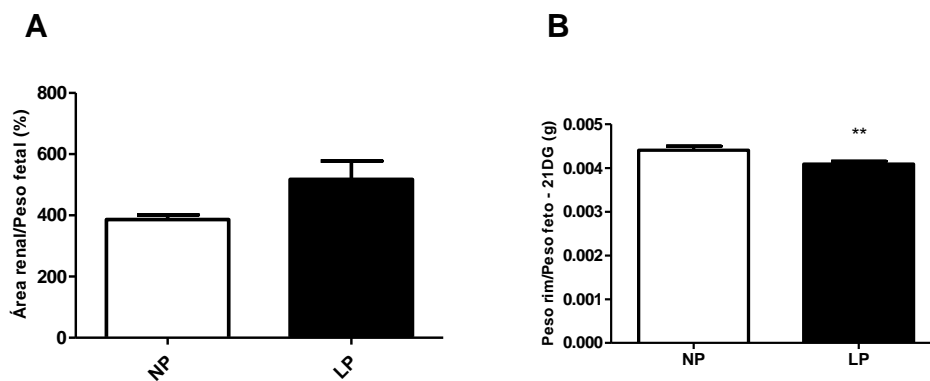


**Figura 24.** Os gráficos representam resultados das quantificações ( $\times 10^3$ ) nos fetos de 17DG.

Os animais do grupo LP, com 21DG, apresentaram redução significativa na área ocupada pelo córtex nefrogênico (31%). A área medular, desses mesmos animais, estava 34% maior do que a observada nos animais NP (Figura 25 e 26). Em relação a área renal não houve diferença significativa nos animais de 21DG (Figura 26-A), já o peso dos rins dos animais LP, com 21DG, estavam menores do que o grupo controle (Figura 26-B).

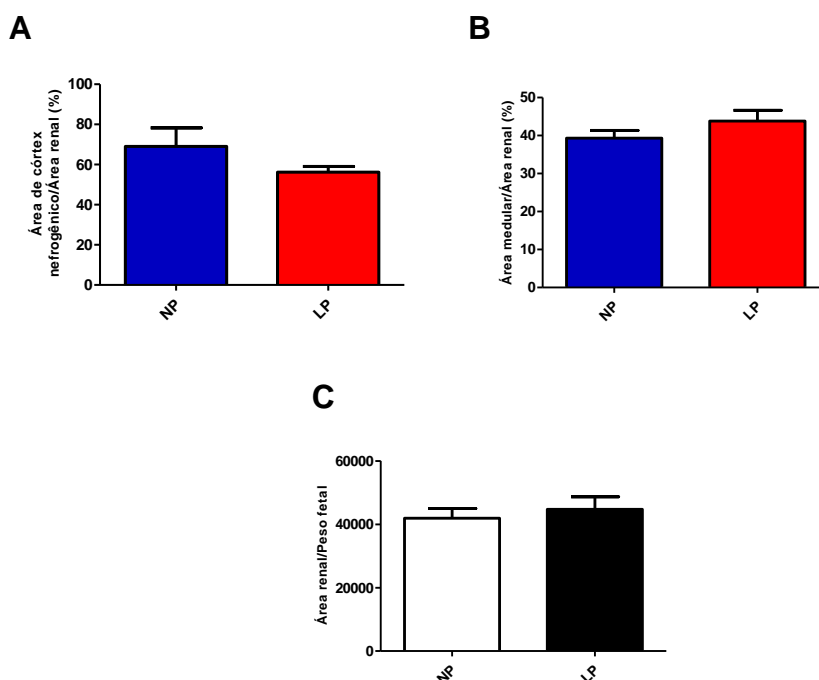


**Figura 25:** Quantificações das áreas renais dos fetos de 21DG dos grupos NP e LP. HE, 5x. Em (A) porcentagem da área nefrogênica e em (B) porcentagem da área medular.



**Figura 26:** O gráfico (A) representa a área renal dos animais de 21DG e o (B) indica o peso do rim direito dos animais de 21DG.

A área ocupada pelo córtex nefrogênico e pela medula não apresentou diferença entre os animais com 7DPN (Figura 27-A e B). A área renal também se manteve igual nesses animais (Figura 27-C).



**Figura 27:** Quantificações das áreas renais dos animais de 7DPN dos grupos NP e LP. HE, 1x. Em (A) porcentagem da área nefrogênica e em (B) porcentagem da área medular. (C) representa a área renal.

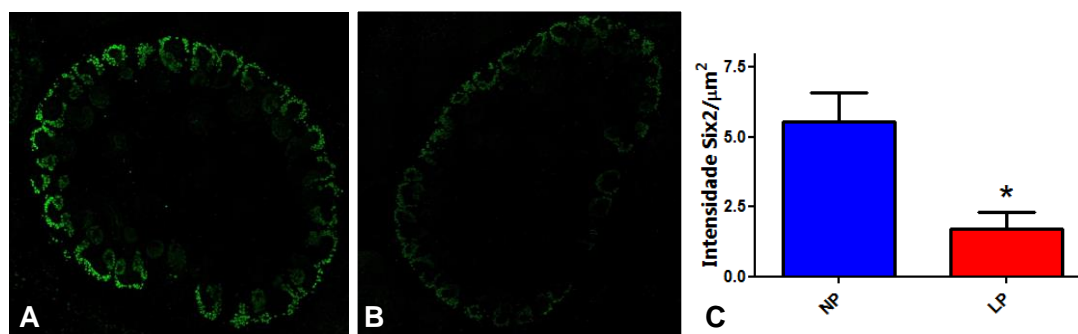
### *Imunohistoquímica*

A quantificação da imunoflorescência para Six2 indicou que os animais LP com 17 DG, apresentaram redução significativa tanto na intensidade da marcação (Figura 28) quanto no número de células positivas para Six2, no cap mesenquimal (Figura 29). A imunohistoquímica de Six2, dos animais de 21DG, indicou que os animais LP com 21 DG, apresentaram aumento significativo no número de células positivas para Six2, no cap mesenquimal e nas vesículas em forma de vírgula (Figura 30). E apesar da área do cap estar maior nos animais LP, esses cap apresentaram menor número de células (Figura 30C e 30E).

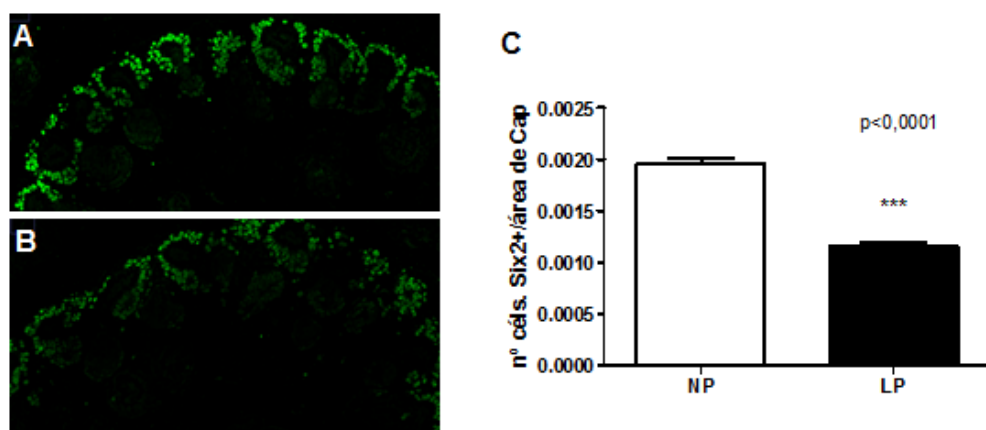
Pela imunolocalização de ki67, proteína que marca proliferação celular, foi possível verificar que os animais LP de 17DG apresentam diminuição, em relação aos controles (Figura 31). Já nos animais LP com 21 DG foi verificado aumento nas células marcadas com Ki67, em comparação ao controle. Nos animais de 7DPN tanto os LP quanto os NP tiveram níveis iguais de Ki67 (Figura 32).

A expressão de c-myc foi reduzida em todas as estruturas renais como nos cap, nos brotos do ureter e nas vesículas em forma de vírgula (Figura 33). Pela quantificação verificamos significativa redução no número de células positivas para o fator transcricional c-myc (Figura 33, C, F e I).

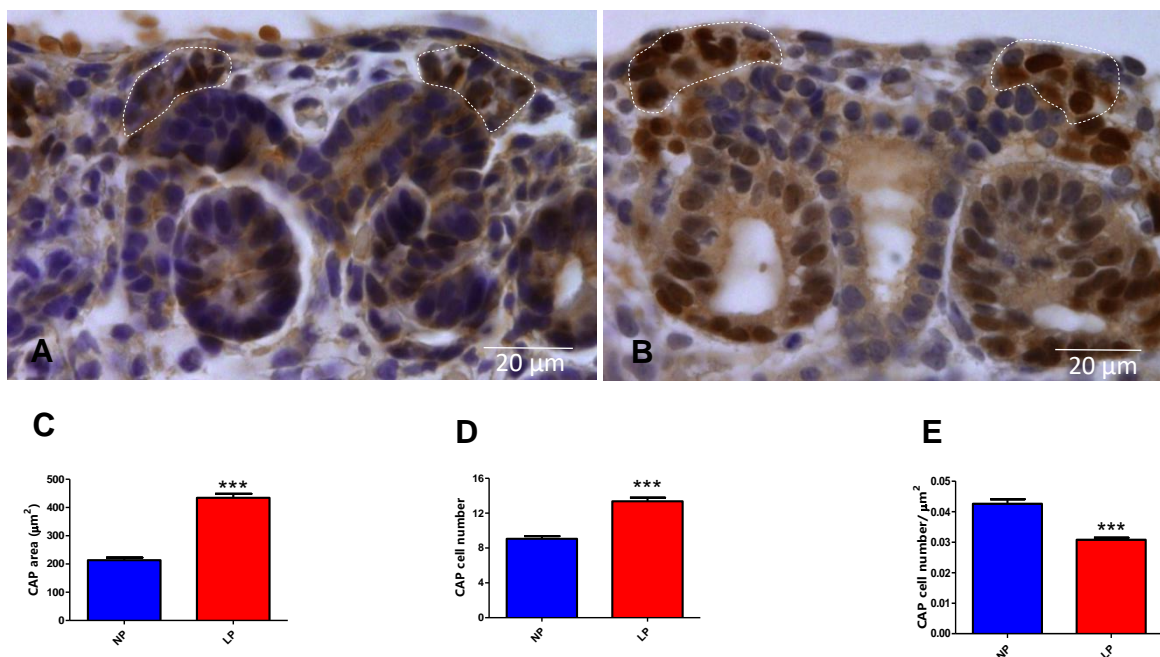
Nos animais LP com 21 DG, observou-se redução na imunorreatividade cortical e medular de c-myc tanto nos citosol quanto no núcleo das células. Já no 7DPN, as células estromais da cortical apresentaram marcação para c-myc nos animais NP e em LP esta marcação esteve ausente (Figura 34).



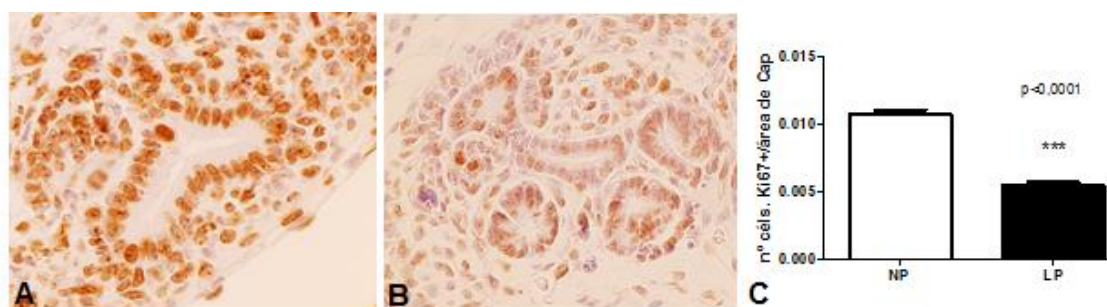
**Figura 28.** Imunoflorescência de para Six2. (A) Imunoreatividade de Six2 nos animais controles (NP) está significativamente maior quando comparada àquela observada nos animais que sofreram restrição proteica gestacional, com 17 dias gestacionais (B). Em C temos o resultado da quantificação da intensidade da marcação para Six2.



**Figura 29.** Imunoflorescência para Six2 no 17DG. O número de células positivas para Six2 por área de cap mesenquimal, foi significativamente menor nos animais do grupo LP (B) comparativamente a NP (B). O resultado da análise pode ser observado em C.



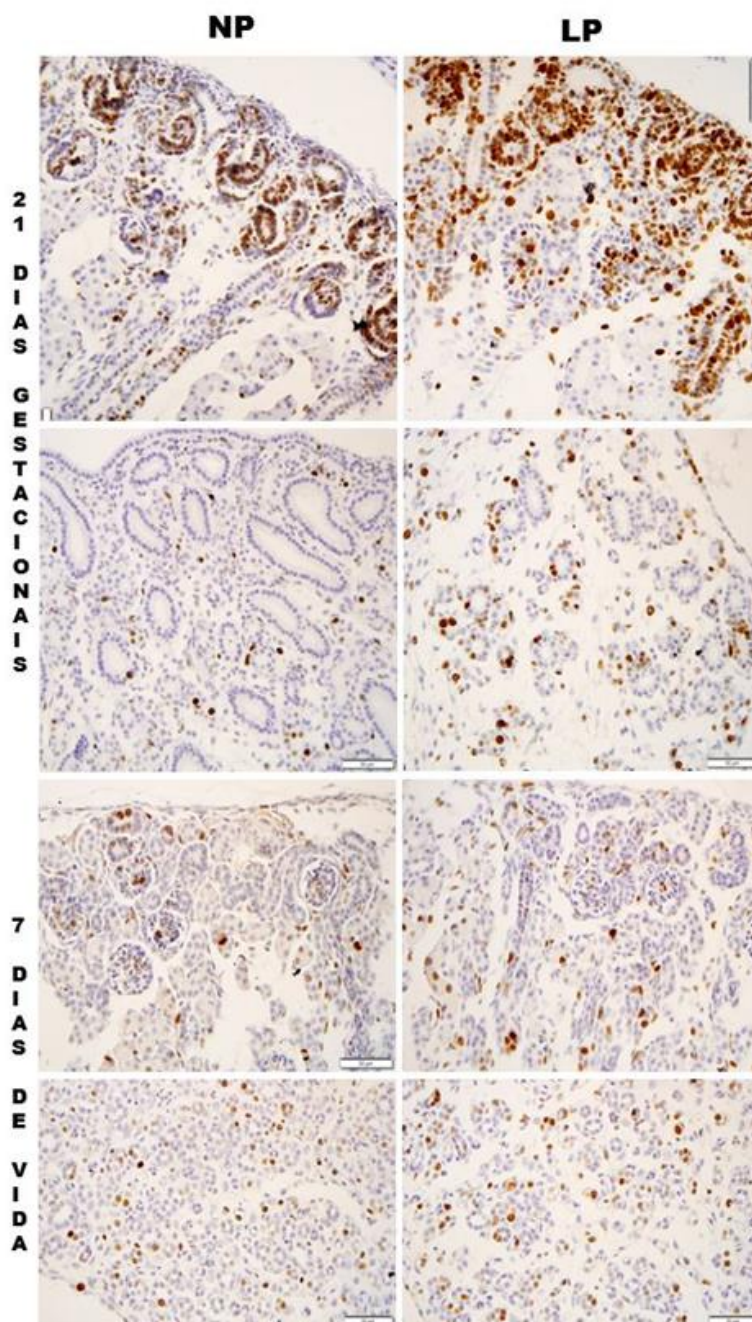
**Figura 30:** Imunohistoquímica para Six2 no 21 DG. O número de células positivas para Six2 por área de cap mesenquimal e vesícula renal, foi significativamente maior nos animais do grupo LP (B) comparativamente a NP. O resultado da análise pode ser observado em D. Apesar da área de cap mesenquimal (C) estar maior no grupo LP, o número de células do cap (E) foi menor nesse grupo.



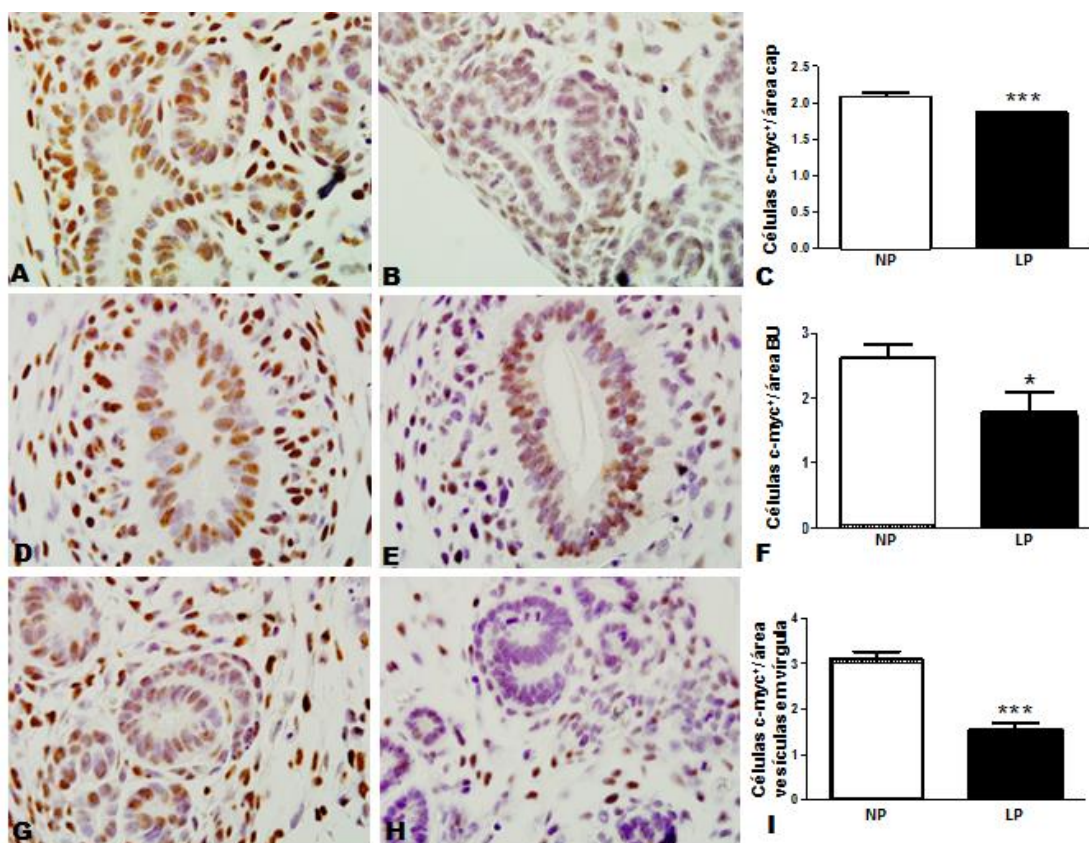
**Figura 31.** Imunoistoquímica para Ki67, mostrando redução significativa na proliferação das células progenitoras do cap mesenquimal no grupo LP (B), em relação aos NP (A). Em (C) está representada a relação entre o número de células positivas para Ki67 e a área do cap mesenquimal.

Encontrou-se aumento na expressão de TGF $\beta$ -1 no grupo LP comparativamente a NP, em todos os tempos estudados (Figura 35).

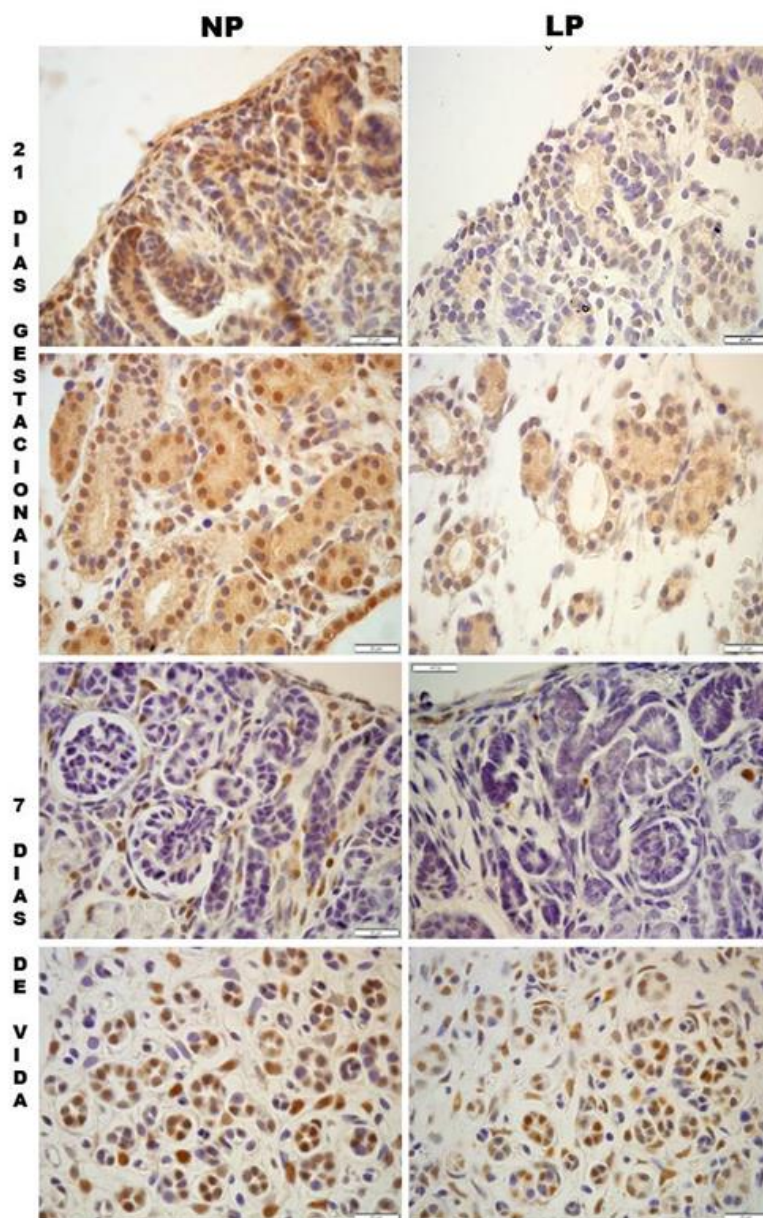
Não se observou diferença na expressão de ciclina A nos animais de 17 e 21DG, entretanto, no 7DPN sua expressão está aumentada tanto no córtex quanto na medula dos animais LP (Figura 36).



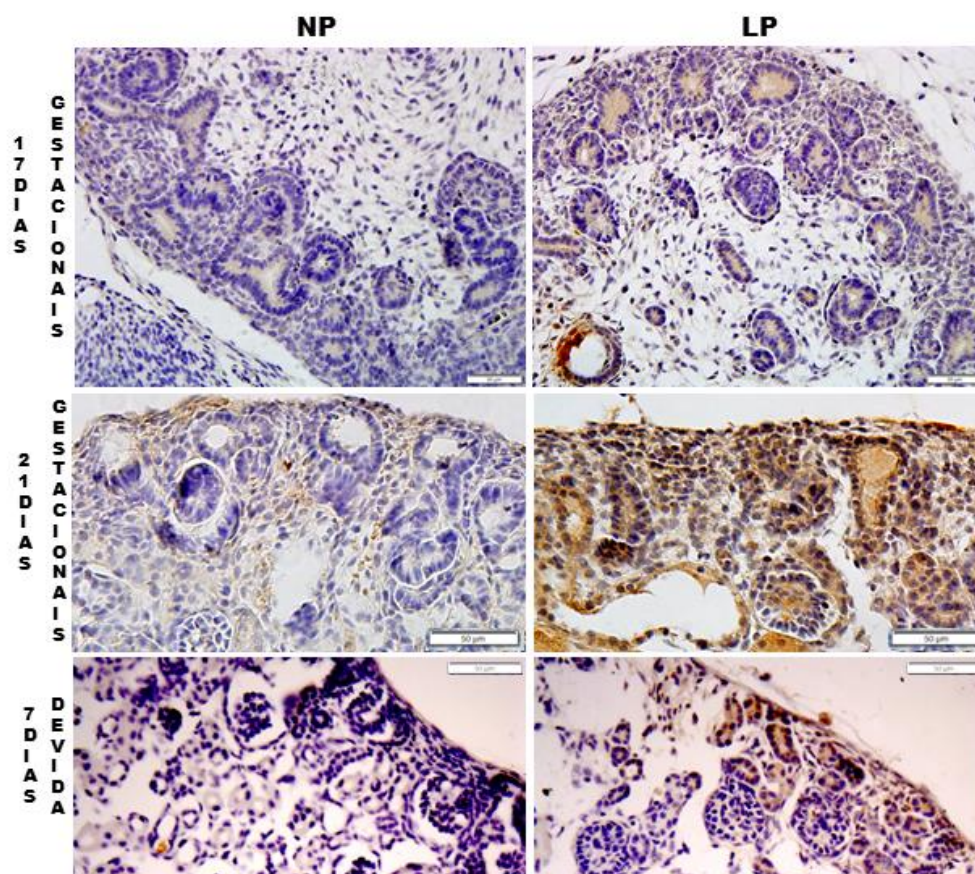
**Figura 32.** Imunoperoxidase para KI67 em animais de 21 DG e 7 DPN.



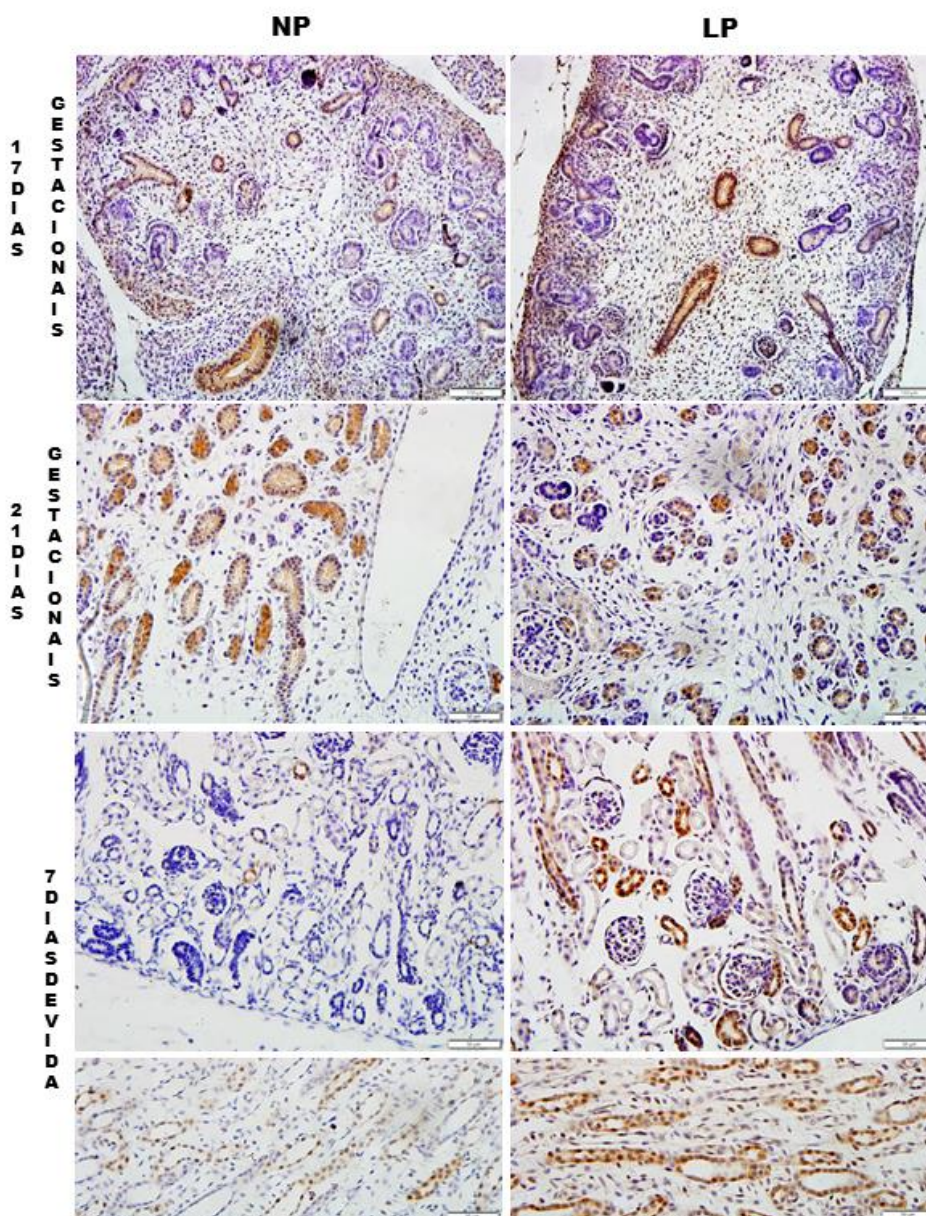
**Figura 33.** Expressão em rins de animais de 17 DG de c-myc no cap mesenquimal, no broto do ureter de maior calibre e em vesículas na forma de vírgula em NP (A, D e G) e LP (B, E e H) e. Em C, F e I estão representadas as quantificações das células positivas para c-myc pelas áreas das diferentes estruturas.



**Figura 34.** Imunoperoxidase para a proteína c-myc nos animais de 21 DG e 7 DPN.



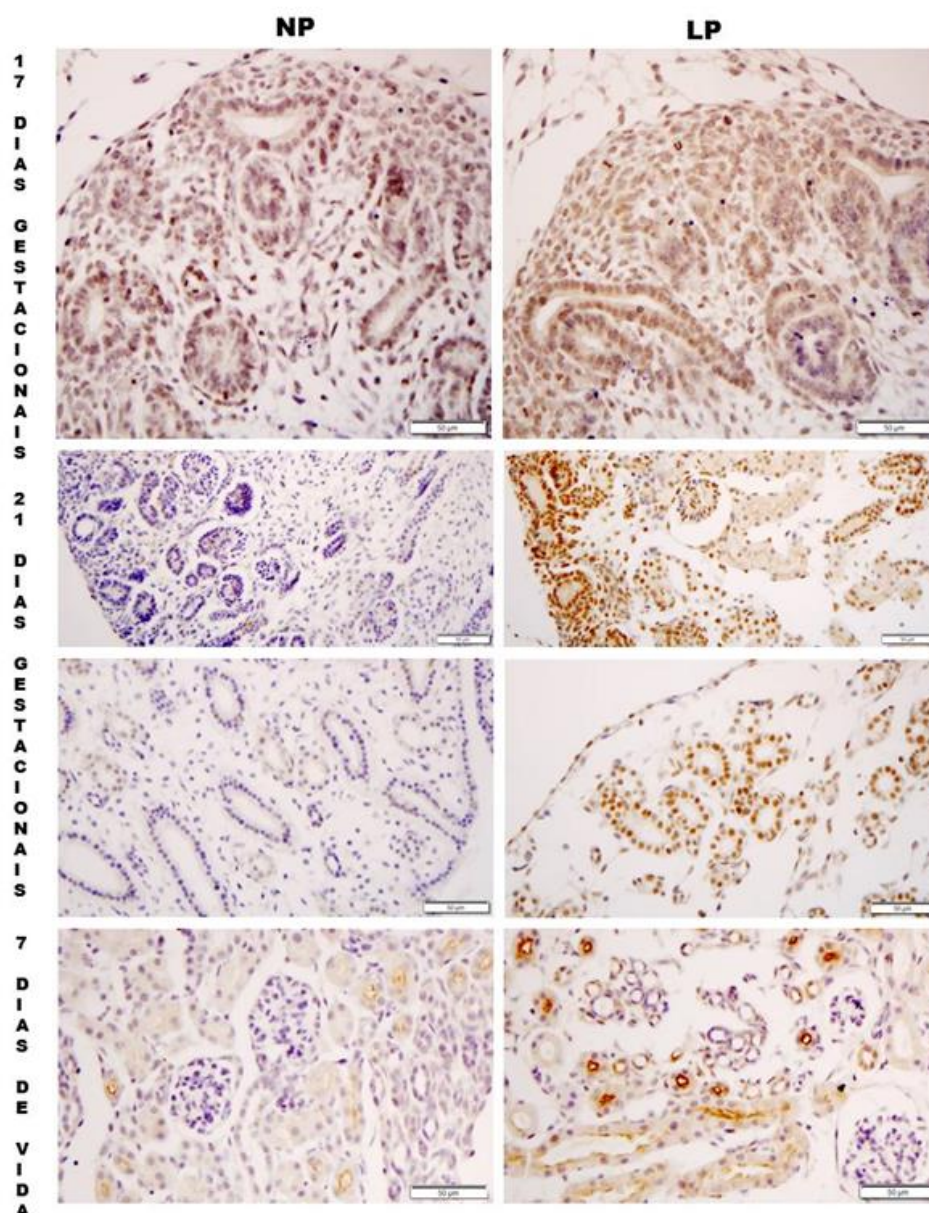
**Figura 35.** Imunoperoxidase para a proteína TGF $\beta$ -1 nos animais de 17 DG, 21 DG e 7 DPN.



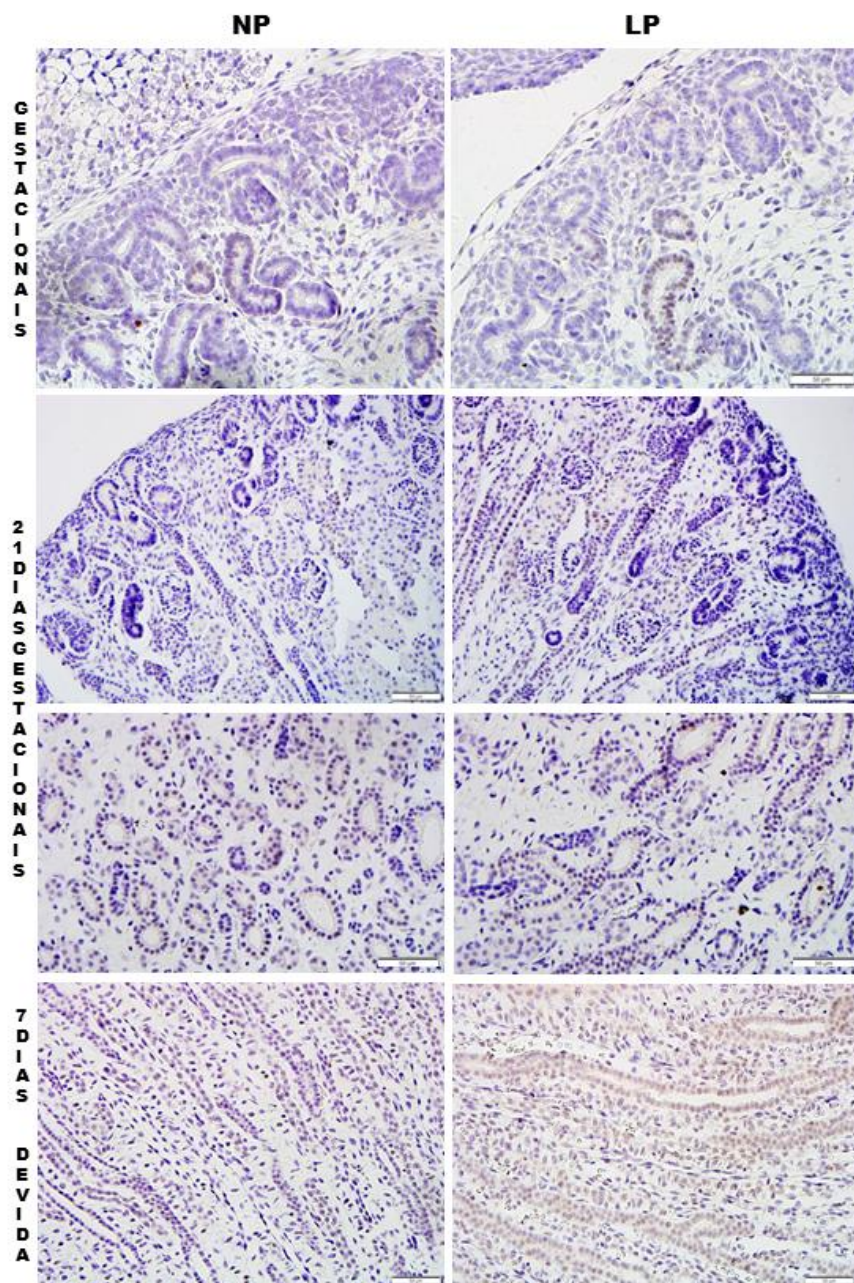
**Figura 36.** Imunoperoxidase para a proteína ciclina A nos animais de 17 DG, 21 DG e 7 DPN.

A expressão de Bcl2 e caspase 3 não foi alterada no 17 DG, contudo, apresentou aumento em LP tanto no 21DG quanto no 7DPN (Figuras 37 e 38). Nos três tempos estudados a expressão de  $\beta$ -catenina estava aumentada, sendo que no 17 e 21DG, este aumento foi mais intenso (Figura 39).

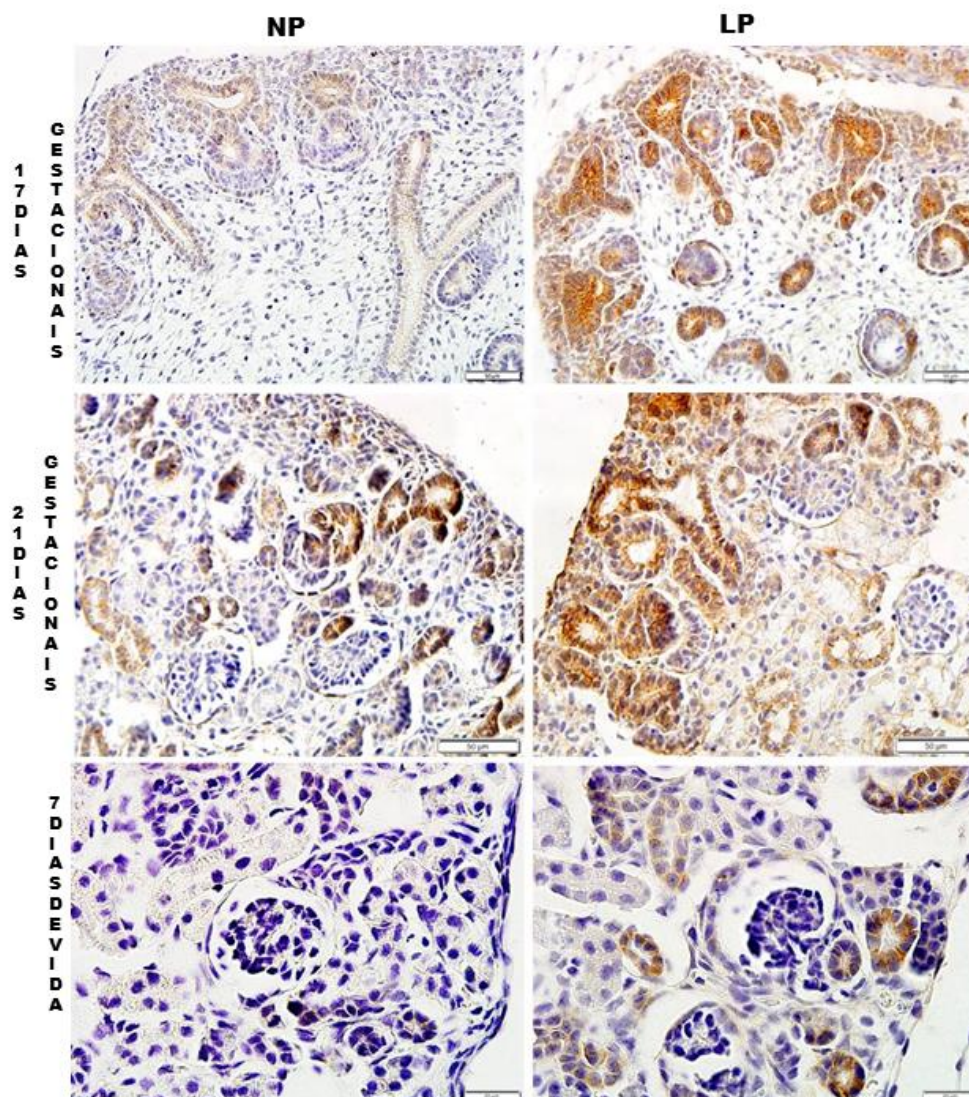
A expressão de VEGF no 17DG limita-se aos brotos do ureter principais de maior calibre e está reduzida nos animais LP. Já no 21DG sua expressão pode ser vista no parênquima tubular e no estroma sendo mais intensa em LP. A expressão de VEGF nos animais NP de 7DPN é quase que inexistente e nos LP localiza-se nos epitélios tubulares (Figura 40).



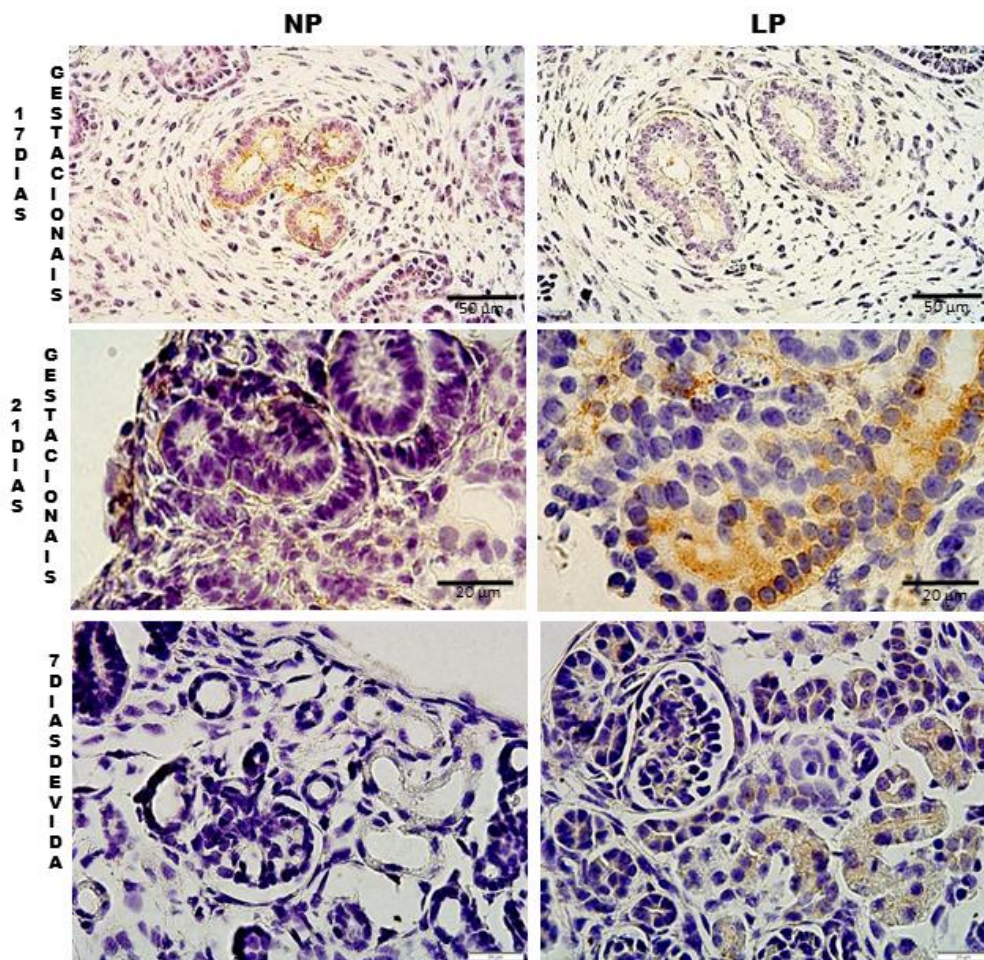
**Figura 37.** Imunoperoxidase para a proteína Bcl2 nos animais de 17 DG, 21 DG e 7 DPN.



**Figura 38.** Immunoperoxidase para a proteína caspase 3 nos animais de 17 DG, 21 DG e 7 DPN.

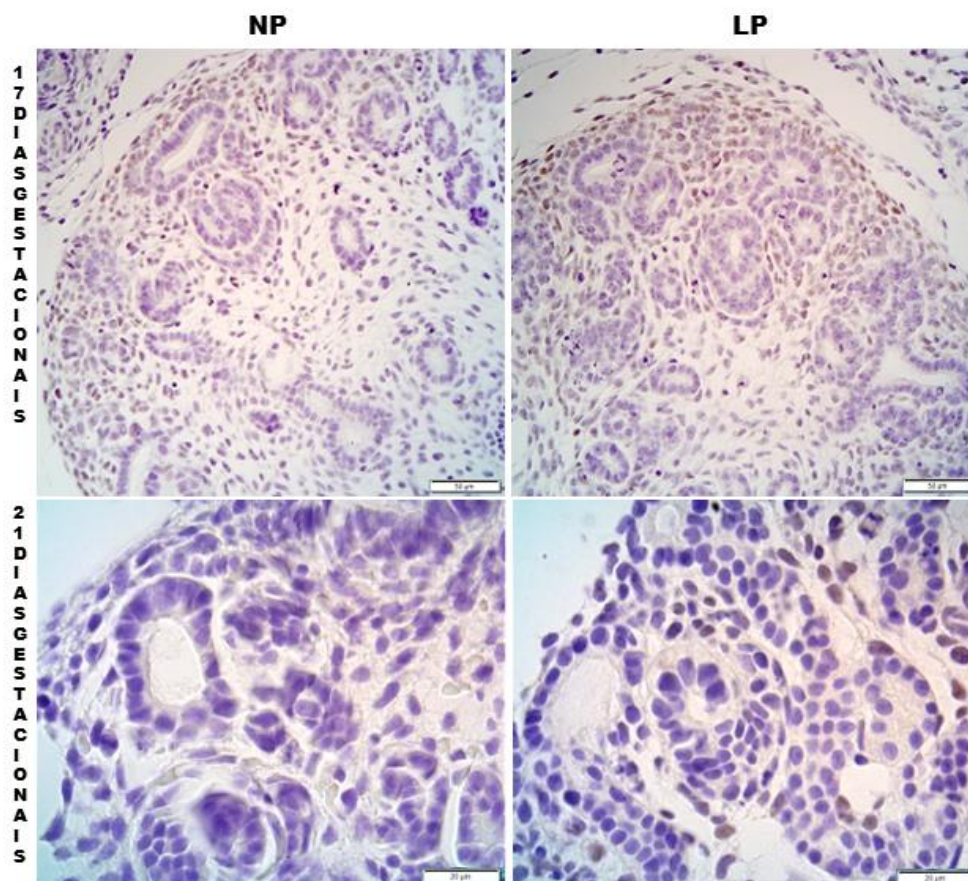


**Figura 39.** Imunoperoxidase para a proteína  $\beta$ -catenina nos animais de 17 DG, 21 DG e 7 DPN.

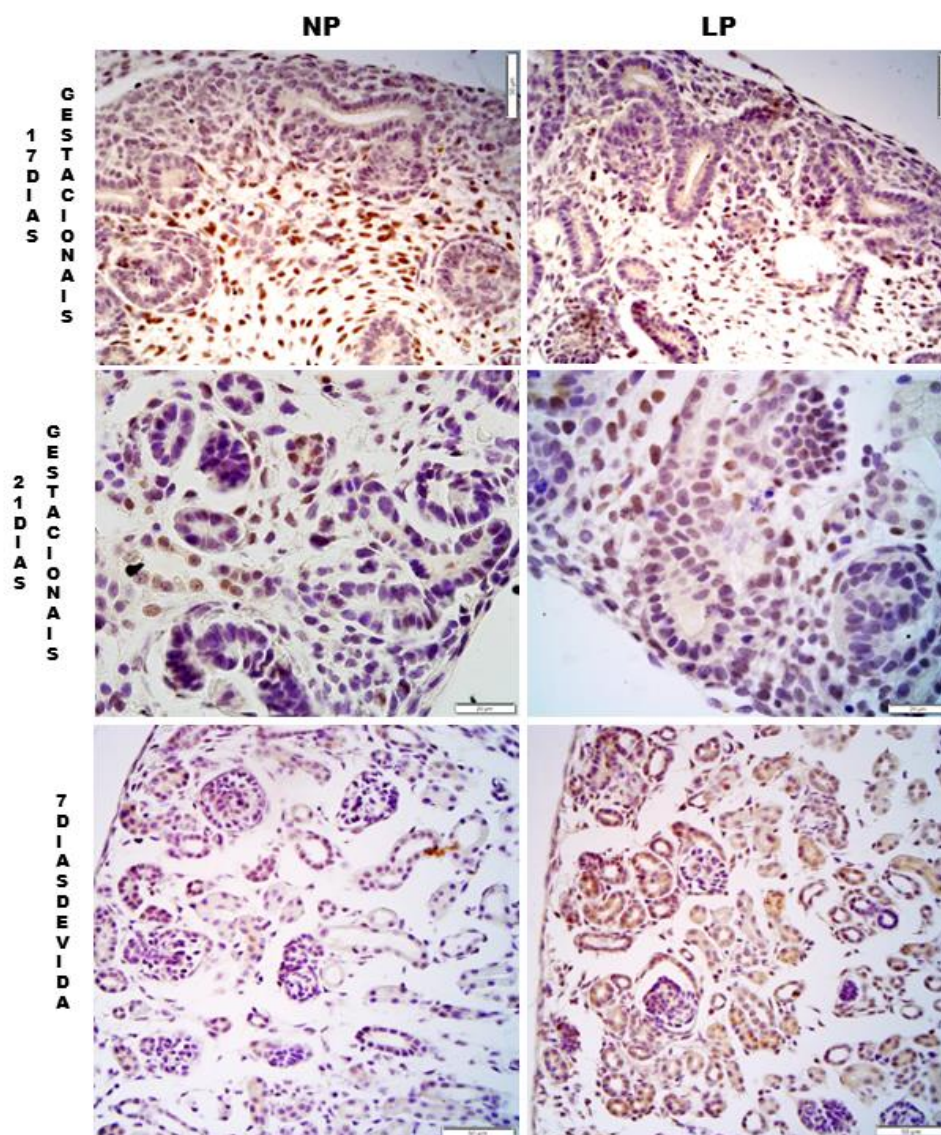


**Figura 40.** Imunoperoxidase para a proteína VEGF nos animais de 17 DG, 21 DG e 7 DPN.

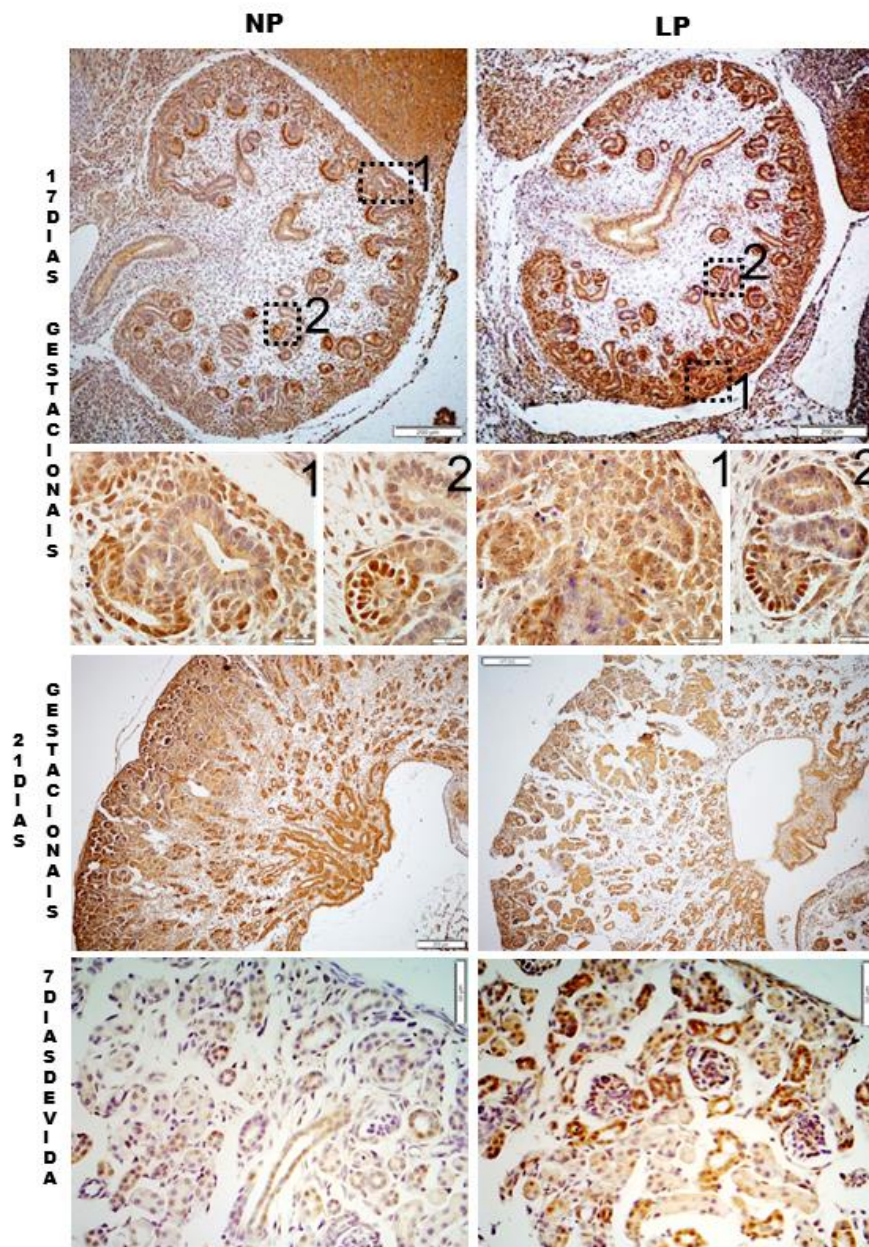
A expressão de ZEB 1 esteve aumentada no 17 e 21DG em LP e não foi evidente tanto em NP quanto em LP no 7DPN (Figura 41). ZEB 2 está presente nos núcleos das células mesenquimais dispersas e não observamos alteração na sua expressão no 17DG. Já no 21DG e 7DPN, esta proteína esteve presente em núcleos de células tubulares e intersticiais e sua expressão foi maior em animais LP (Figura 42). Aparentemente somente no 7 DPN existe maior expressão de WT1 (Figura 43).



**Figura 41.** Imunoperoxidase para a proteína ZEB1 nos animais de 17 e 21 DG.



**Figura 42.** Imunoperoxidase para a proteína ZEB2 nos animais de 17 DG, 21 DG e 7 DPN.



**Figura 43.** Imunoperoxidase para a proteína WT1 nos animais de 17 DG, 21 DG e 7 DPN.

## DISCUSSÃO

## V. DISCUSSÃO

Neste estudo foram investigados a morfologia, o perfil de expressão global de microRNAs e a expressão de mRNAs e proteínas alvo, em ratos submetidos a restrição proteica gestacional, em diferentes períodos da ontogênese renal. Evidências obtidas por estudos epidemiológicos, experimentais e clínicos mostraram que as origens de muitas doenças dos adultos começam no início da vida, de modo que o ambiente intrauterino regula não só a trajetória do crescimento fetal, mas também “programa” a saúde subsequente do indivíduo (REYNOLDS, 2013).

O baixo peso ao nascer, marcador de ambiente intrauterino adverso, sugere que indivíduos que sofreram alguma injúria durante períodos críticos do desenvolvimento, podem alterar permanentemente estruturas e funções teciduais, levando a resposta adaptativa, assim ocorre restrição do crescimento e consequente baixo peso ao nascer, além de terem maior probabilidade de desenvolver doenças na idade adulta (LUCAS, 1991; WOODALL *et al.*, 1996; BARKER, 1997; NWAGWU *et al.*, 2000; LANGLEY-EVANS, 2009). Nossos resultados demonstram que os animais com 21DG, que corresponde ao dia do nascimento, do grupo LP, tiveram menor peso em relação ao grupo controle, indicando que esses animais foram programados in utero.

Nos seres humanos, o baixo peso ao nascer ocorre mais frequentemente em comunidades desfavorecidas nas quais muitas vezes há alta incidência de algumas doenças no adulto, como por exemplo doença cardiovascular, hipertensão arterial, diabetes mellitus e doença renal (LUYCKX & BRENNER, 2005).

Todas as evidências sugerem que o peso ao nascimento deve ser utilizado como um marcador indireto para o risco de doenças no adulto. Embora a solução ideal para minimizar a morbidade seria erradicar o baixo peso ao nascer, enquanto isso não é possível, é imprescindível aumentar os cuidados quanto aos fatores de risco para doença cardiovascular e renal nesses indivíduos com baixo peso ao nascer (LUYCKX & BRENNER, 2005).

Além do baixo peso ao nascimento, diversos trabalhos demonstraram em modelos experimentais de diferentes idades, redução no número de néfrons (ROSTAND, 2003; KRIZ & LEHIR, 2005; LUYCKX & BRENNER, 2005; HOPPE *et al.*, 2007). A nefrogênese requer um equilíbrio delicado entre diversos fatores que podem ser alterados pela restrição no crescimento intrauterino (IUGR), levando a diminuição no número de néfrons (SCHREUDER *et al.*, 2006). Usando o mesmo modelo aqui descrito, nosso grupo verificou anteriormente que os machos da prole LP apresentam redução de 28,4% no número de nefrons no 12º dia de vida e, na vida adulta, redução de 27%. Usando cultura de metanefro, observamos que a restrição proteica durante os primeiros 14,5 dias gestacionais reduz em 28,3% as ramificações do broto uretérico em LP quando comparado ao controle (MESQUITA *et al.*, 2010b).

O entendimento dos mecanismos moleculares e celulares que controlam a nefrogênese tem crescido rapidamente nos últimos anos (COSTANTINI & KOPAN, 2010; HENDRY *et al.*, 2011; KOPAN *et al.*, 2014; LITTLE & MCMAHON, 2012). Entretanto ainda não são conhecidos todos os fatores causais nem tampouco os componentes e processos envolvidos nas alterações da gênese renal. Nos casos de programação fetal as alterações na organogênese renal são mediadas por fatores epigenéticos que interferem na expressão gênica. Sabemos

que os microRNAs são reguladores importantes da expressão gênica exercendo papel crucial nos processos de desenvolvimento em muitos tecidos, incluindo o tecido renal (WEI, *et al.*, 2014; TÜFEKCI *et al.*, 2014). Através do NGS, nós determinamos todos os miRs que estavam diferencialmente expressos no nosso modelo e também durante a diferenciação renal em animais controles. Tanto os miRNAs quanto as redes de regulação obtidas nos forneceram possibilidades quase que infindáveis de investigação. Então considerando os achados morfológicos e morfométricos observados no 17DG, que são de alta relevância no sentido de elucidar a gênese da redução no número de néfrons em nosso modelo, selecionamos os miRNAs e seus alvos, que estão envolvidos nos processos de proliferação, diferenciação e apoptose para aprofundarmos os estudos.

O papel da família do miRNA let-7, na promoção da diferenciação celular tem sido amplamente estudado em vários órgãos (AMBROS, 2011; BAO *et al.*, 2013; BUSSING *et al.*, 2008; COPLEY & EAVES, 2013; MEZA-SOSA *et al.*, 2014; ROUSH & SLACK, 2008; SOKOL, 2012). Uma função que é bem conservada dessa família de miRNAs é participar da supressão dos reguladores iniciais de destino celular e promover a diferenciação celular à medida que o desenvolvimento continua (NAGALAKSHMI *et al.*, 2014). Em LP observamos aumento de let-7a-5p no 17 e 21 DG, paralelamente a redução na expressão de c-Myc que é um dos seus alvos. Já no 7 DPN ocorre redução de let-7a-5p em LP e a expressão de c-Myc volta aos níveis observados em NP. Estudos tem mostrado o papel das proteínas MYC na proliferação, crescimento, apoptose e diferenciação celular, eventos cruciais durante a organogênese renal (COUILLARD & TRUDEL, 2009). Couillard & Trudel (2009) foram os primeiros a evidenciar que c-Myc tem papel essencial neste processo sendo crucial na fase

final da ramificação do BU, pois modula a renovação das células progenitoras mesenquimais promovendo a proliferação dessas células. Nos animais de 17 DG, foi observado diferença na expressão gênica e proteica de c-myc, ambas estavam reduzidas no grupo LP. Nos animais de 21DG do grupo LP observamos que a expressão gênica e proteica de c-myc ainda estava reduzida, enquanto que nos animais com 7DPN não observamos diferença no mRNA, entretanto, a expressão proteica cortical foi menor em LP. Segundo Couillard & Trudel (2009), alterações na expressão de c-myc não afetam estágios iniciais do desenvolvimento renal, mas causam redução no tamanho do rim. Considerando o papel de c-myc como ativador da proliferação, no 17 DG observamos redução de KI-67 no CM. Assim, podemos supor que o aumento de let-7a-5p paralelamente a redução de c-Myc estão envolvidos na redução no número de células six2<sup>+</sup> nos CMs.

No 7 DPN, let-7a-5p está reduzido, c-Myc passa a se expressar de forma compatível com NP e a expressão de Ciclina A e PcnA estão aumentadas. Entretanto a expressão de Mki67 está similar à observada em NP. Como PcnA é expressa nas fases G<sub>1</sub> e S do ciclo celular, Ciclina A nas fases S e G<sub>2</sub> e Mki67 nas fases G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> e mitose, não conseguimos explicar a discrepância entre eles no 7DPN. Com relação a participação do let-7a-5p na regulação da apoptose não encontramos correlação entre as variações em seu conteúdo e a expressão de Casp 3 e Bcl2, sabidamente envolvidos no processo de apoptose (Figura 46).

Recentemente foi demonstrado que Igf1 suprime a expressão de Bim em mieloma (BRUYNE *et al.*, 2010), entretanto, nós não observamos alterações em Bim moduladas por ele (Figuras 44-46).

Bim é uma proteína pró-apoptótica que se liga à Bcl2 que é anti-apoptótico, promovendo a liberação de Bax que atua na: 1) formação de poro,

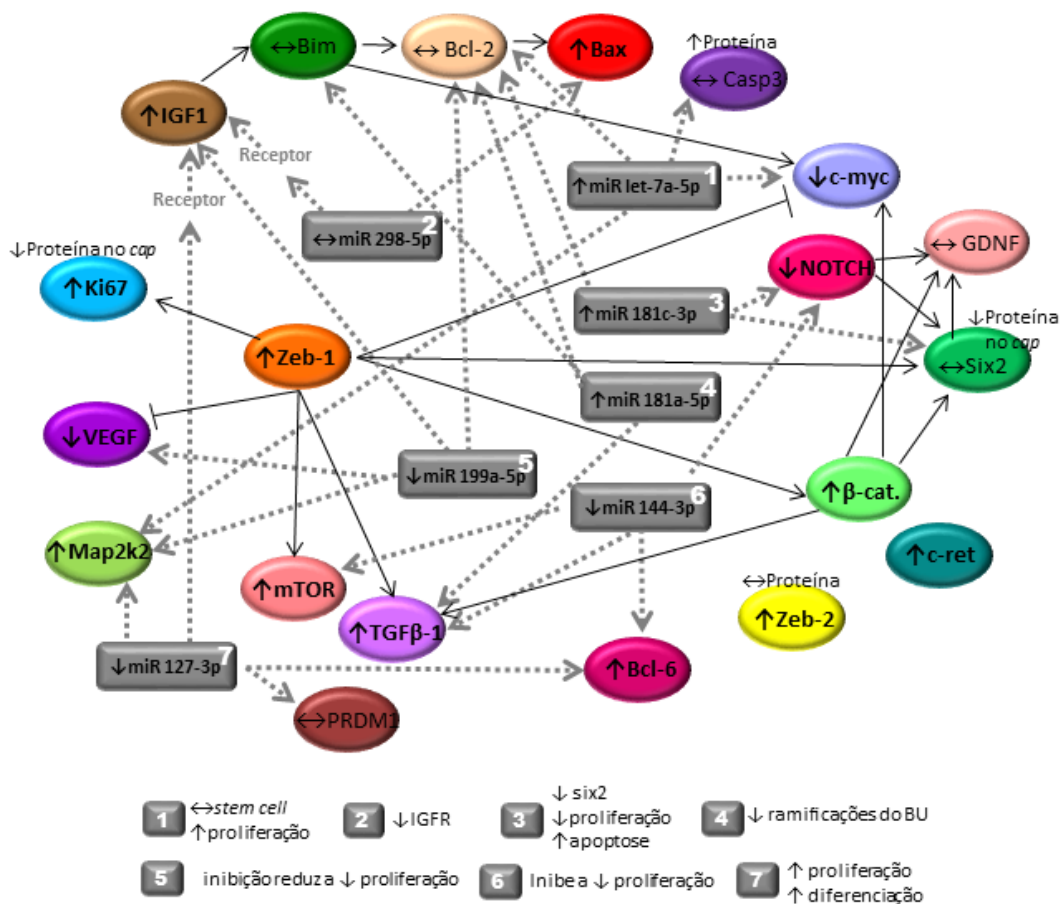
permeabilizando a membrana externa mitocondrial, 2) liberação de citocromo c e 3) ativação de caspases levando a apoptose (EWINGS *et al.*, 2007). Somente no 7 DPN temos a ativação da via toda com aumento do mRNA para Bim, entretanto não parece ter sido modulada pelo miR-181a-5p, já que sua expressão já estava aumentada em LP (17 e 21 DG) sem que houvesse alteração em Bim. De qualquer forma, o aumento neste miRNA regulou positivamente a expressão de Bim. Bim também pode induzir a apoptose via c-myc. Um crescente corpo de evidências apoia um papel central para a família de proteínas da família BCL2 na mediação da apoptose induzido por MYC (MURPHY & MUTHALAGU, 2015).

Quanto as divergências entre os resultados obtidos após a análise da expressão gênica e os resultados esperados, baseado na análise de expressão dos miRNAs correspondentes, podemos considerar diversos fatores. Primeiramente, alguns estudos sugerem que, em determinadas circunstâncias, os miRNAs podem atuar como reguladores positivos da transcrição gênica (JOPLING *et al.*, 2005; VASUDEVAN *et al.*, 2007, OROM *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2014). Além disso, é evidente na literatura que mesmo os algoritmos melhores avaliados falham na identificação de parcela das interações ente o miRNAs e genes preditos (RECZKO *et al.*, 2012). A predição de alvos para os miRNAs consegue identificar aproximadamente 60% de todos os alvos disponíveis, sendo que a cada três alvos preditos, apenas um alvo é validado (VLACHOS & HATZIGEORGIOU, 2013). E, finalmente, os miRNAs integram uma complexa rede de regulação da expressão gênica e apresentam potencial de regulação de grande parte do transcriptoma (ZHAO & SRIVASTAVA, 2008). Assim, cada miRNA pode regular a expressão de diversos mRNAs alvos e a expressão de

cada mRNA pode ser potencialmente regulada por diversos miRNAs (ENRIGHT *et al.*, 2003; VAN ROOIJ *et al.*, 2008).

A família do miR-181 é formada por 4 membros altamente conservados, o miR-181a, miR-181b, miR-181c e o miR-181d. miR-181a pertence à família dos miR-181 e a sua sequência gênica é altamente conservada (YAMASHITA *et al.*, 2009). No glioma, miR-181a desempenha papel de gene supressor de tumor, inibindo a proliferação e migração de células tumorais e induzindo apoptose celular (ZHU *et al.*, 2010). Estudos anteriores indicaram que o miR-181a está intimamente relacionado com a apoptose das células cancerosas (HUANG *et al.*, 2015; CARRIERI *et al.*, 2015). Embora miR-181a tenha muitos genes alvos (FELICES *et al.*, 2011; YU *et al.*, 2011) e como os genes-alvo associados com apoptose em nosso modelo não estão bem claros, então através de predição bioinformática, e dentre os elegidos, temos Bim e Bcl2, que são genes alvos potenciais de miR-181a (LI *et al.*, 2016). LI *et al.* (2016), em um modelo de lesão pulmonar aguda, encontrou que quando miR-181a está superexpresso, o nível da proteína Bcl2 está diminuído. E o inverso é verdadeiro, a inibição do miR-181a aumentou os níveis de Bcl2. Bcl2 é um gene anti-apoptótico, que pertence à família BCL. Esta família de proteínas é subdividida em anticorpos antiapoptóticos (BCL2, BCLXL, MCL1 e A1), e pro-apoptóticos (BIM, BID, BAD, PUMA e NOXA) e proteínas efetoras, BAX e BAK (MURPHY & MUTHALAGU, 2015). As proteínas da família BCL desempenham um papel importante no processo de apoptose celular. BCL-2 pode prevenir a liberação de citocromo C de mitocôndrias, e, em seguida, inibir a ativação de Casp 3 para inibir a apoptose celular (KORSMEYER & SCORRANO, 2003). Nossos resultados mostraram aumento na expressão do miR-181a-5p nos três tempos estudados, e aumento, tanto gênico quanto

proteico, de Bcl2 nos animais LP de 21 DG e 7 DPN, assim Bcl2 e a Bim, não parecem ser modulados apenas por este miRNA. miR-181a-5p parece regular positivamente um outro alvo, o Tgfb1, cujos mRNA e proteína também aumentaram em LP (Figuras 44-46).



**Figura 44.** Expressão e inter-relações de miRNAs e de seus alvos no 17 DG em rins de animais LP comparativamente NP.

O grupo de Lv (2014) demonstrou a capacidade do miR-181c em regular negativamente a expressão de Six2, restringir a proliferação e promover a apoptose, e ainda fez com que as células do MM perdessem seu fenótipo



A expressão reduzida de Six2 é necessário para a diferenciação dos progenitores de néfrons, e a sinalização de Notch é fundamental e suficiente para regular negativamente Six2. A descoberta de que Notch está envolvida na regulação negativa de Six2, sugere que a sinalização de Notch tem um profundo impacto na rede de regulação gênica que governa a manutenção das células progenitoras de néfron (CHENG *et al.*, 2007, 2003). A sinalização de Wnt/B-catenina inicia a diferenciação de progenitores de néfron, mesmo que a sinalização de Wnt/B-catenina seja também importante para a manutenção de progenitores de nefron (BROWN *et al.*, 2015). Recentemente, foi sugerido que a sinalização de Notch pode servir como um gatilho para a diferenciação de progenitores de néfron (CHUNG *et al.*, 2016). Nos animais LP com 7DPN, não foi observado expressão do mRNA para Six2, e a expressão de Notch1 está aumentada, então podemos supor que Notch regulou negativamente Six2, para consequente diferenciação (Figuras 44-46).

Um estudo mostrou que superexpressão do miR-199a-5p reduz a proliferação de células císticas e induz a apoptose, além de controlar o ciclo celular (SUN *et al.*, 2015). Ao 17 DG a expressão do miR-199a-5p está reduzida em LP e a transcrição de Mki67 está aumentada. Neste mesmo período o mRNA de Map2k2 está aumentado, entretanto no 7DPN continua aumentado sem que tenha havido redução deste miRNA. Também VEGF não parece ser modulado apenas por este miRNA, nem tampouco Igf1 e Bcl2.

Xiang e colaboradores (2016) foram os primeiros a demonstrar que a expressão do miR-144 estava diminuída em células de carcinoma renal, semelhante às células de câncer de pulmão, onde a expressão desse miRNA também está reduzida (CHEN *et al.*, 2015). Eles também mostraram, que a

superexpressão do miR-144 suprime a proliferação das células do carcinoma renal e, obviamente, reduziu a proporção da fase G2/M, enquanto que a inibição do miR-144 promoveu a proliferação celular, e aumentou a porcentagem de células da fase G2/M. Nossos resultados mostram diminuição da expressão do miR-144-3p nos animais LP de 17 DG, sugerindo então, que ele pode estar induzindo a proliferação celular. Nos animais de 21 DG não encontramos diferença e nos animais de 7 DPN ele não foi expresso. No câncer renal, a via da mTOR desempenha um papel patogênico importante na proliferação e na resposta apoptótica durante o desenvolvimento tumoral (RIBBACK *et al.*, 2015; BAILEY *et al.*, 2014). O grupo de Xiang (2016) demonstrou uma importante correlação molecular entre miR-144 e mTOR. Observaram que a superexpressão do miR-144 inibe a expressão de mTOR, gênica e proteica, e a correlação inversa é verdadeira, a menor expressão do miR-144 aumenta expressão do mRNA para mTOR. Nijland e colaboradores (2007) demonstraram que a via de sinalização da mTOR é fundamental para o número de néfrons diminuído, no rim fetal de babuínos, cujo as mães foram submetidas a restrição de nutrientes (Figuras 44-46).

Nossos animais de 17 DG a expressão de mTOR está aumentada nos animais LP, com 21 DG a expressão de LP é igual ao NP, e com 7 DPN a expressão de mTOR está reduzida. Isso sugere que mTOR está sendo regulada pelo miR-144, mas não só por ele, para promover a proliferação celular.

O miR-298 participa na regulação na resposta à insulina, e em processos como sobrevivência e proliferação (WHITE, 2002). Em um estudo com células  $\alpha$  do pâncreas, foi mostrado que o miR-298-5p controla a via de sinalização do IGF1R, que é conhecido por promover a resistência a apoptose através de

diferentes mecanismos como, pelo aumento dos níveis de BCL2, um anti-apoptótico; ou inativando proteínas pró-apoptóticas (BAX e CASP9); ou estimulando a via das MAPKs. Assim, demonstram que a regulação negativa desse miRNA, nessas células  $\alpha$  do pâncreas, induz ao aumento da expressão de IGFR $\beta$  e TNF $\alpha$  (BARBAGALLO *et al.*, 2013). Nós observamos diferença na expressão desse miRNA apenas nos animais LP de 21 DG, cuja expressão estava aumentada e nesses animais a expressão do mRNA para Igf1 e Bax também estava aumentado. Então, é possível que a regulação positiva do miR-298 esteja influenciando o controle da apoptose via Bax e Igf1, mais estudos são necessários para concluir ao certo o papel da modelação do miR-298-5p no nosso modelo.

O miR-127 tem como um de seus alvos o proto-oncogene Bcl6 (SAITO *et al.*, 2006). Pan e colaboradores (2012), mostram, que em células do fígado, quando o miR-127 estava menos expresso era observado aumento da proliferação celular, e quando estavam superexpressos a proliferação estava inibida. Esses dados sugerem um papel importante do miR-127 na proliferação, diferenciação e desenvolvimento (CHEN *et al.*, 2013). A redução de miR 127-3p no 17 DG em animais LP foi acompanhada pelo aumento do mRNA para Mki67 e, exceto no *cap*, a proteína também estava aumentada. Entretanto o aumento na expressão deste miRNA no 21 DG, não alterou a expressão de Mki67 (Figuras 44-46). Além disso, o grupo de CHEN (2013) classificou esse miRNA como um novo regulador de senescência celular, via Bcl6 e no 17DG sua redução esteve associada ao aumento de Bcl-6. Contudo no 21 DG e no 7 DPN seu aumento ou retorno ao padrão observado em NP não interferiram na expressão de Bcl-6 que continuou elevada em LP. Tampouco PRDM1 pareceu estar sendo modulado apenas por este miRNA.

A expressão de Prdm1 está aumentada em LP no 21 DG e no 7 DPN. Prdm1 (*Positive Regulatory domain containing 1*) atua como uma histona metiltransferase ou recruta outras enzimas modificadoras de histonas para promotores ligantes específicos. Elas agem simultaneamente em diversos pontos do genoma, e exibem atividade contexto dependente. Estas características lhes conferem capacidade para direcionar e manter estados de transição nas células e para modificar a transcrição de vias de sinalização pleiotróficas durante o desenvolvimento. Evidências sugerem que os fatores PRDM direcionam o destino celular promovendo uma programação para um tipo celular específico e reprimindo diferenciações alternativas que a célula poderia adquirir. Adicionalmente Prdm1 tem papel chave na geração de células pluripotentes (HOHENAUER & MOORE, 2012).

Neste estudo também observamos que os animais do grupo LP, com 17 DG e 21 DG, apresentaram redução na área nefrogênica, corroborando os achados de Menendez-Castro e colaboradores (2013), que observaram que tanto a capacidade proliferativa quanto a zona nefrogênica estavam significativamente reduzida nos animais que sofreram restrição proteica (ração contendo 8.4% de caseína) gestacional em relação aos controles. Nós também observamos redução significativa de células marcadas positivamente para ki67, no CM, nos animais LP de 17 e 21 DG.

Six2 é considerado marcador de células tronco nefroprogenitoras (HERZLINGER *et al.*, 1992; SARIOLA, 2002; NISHINAKAMURA e OSAFUNE, 2006; BOYLE *et al.*, 2008) e sua expressão é mantida apenas durante o desenvolvimento renal (OLIVER *et al.*, 1995), não sendo expresso no rim de adultos (HUMPHREYS *et al.*, 2008). Além disso, Six2 é necessário para manter

a população de células progenitoras de néfron e controlar o destino dessa população de células, suprimindo sinais que induzem a diferenciação epitelial e mantendo disponível o pool de células do blastema em estágio indiferenciado (SELF *et al.*, 2006). Apesar de não encontrarmos diferença significativa na expressão do gene *Six2*, pela imunofluorescência observamos redução significativa tanto na intensidade da fluorescência quanto no número de células do CM marcadas para SIX2, nos animais do grupo que sofreram restrição proteica gestacional. Assim podemos supor a ocorrência de modulação pós-transcricional levando a redução na expressão proteica de *Six2* nos animais LP no 17DG. Surpreendentemente, a redução nas células positivas para SIX2 foi de 28%, a mesma proporção observada quanto à redução no número de néfrons neste modelo. No 21DG os animais do grupo LP apresentaram redução de 27,7% no número de células positivas para *Six2* nos CM. A deficiência de *Six2* durante o desenvolvimento pré-natal tem sido associada à redução no número de néfrons, hipertensão e falência renal crônica (FOGELGREN *et al.*, 2009). Novamente não observamos em LP coerência entre a expressão gênica e proteica de *Six2* no 21DG. Entretanto, quando observamos a imunohistoquímica constatamos aumento de SIX2 nas vesículas.

Couillard & Trudel (2009), associaram a diminuição das células do CM positivas para *c-myc* e *six2* com a redução na taxa de proliferação celular em rins dos camundongos transgênicos para *c-myc*. Nossos animais com 17 DG do grupo LP, também apresentaram redução significativa na proliferação das células progenitoras do CM, além de diminuição das células positivas para *c-myc*. Esses autores argumentam que, *c-myc* regula indiretamente a diferenciação renal, já que modula o tamanho da população de células do CM que podem, posteriormente,

sofrer diferenciação. Normalmente somente quando um *pool* suficiente de células do CM é alcançado, a nefrogênese pode prosseguir (Couillard & Trudel, 2009). Desta forma podemos afirmar que já no 17º dia gestacional temos este *pool* reduzido em 28% no CM dos animais LP e esta redução permanece até o 21 DG, o que irá repercutir na porcentagem de nefrons no adulto. Outra característica morfológica observada foi a existência de grandes espaços ocupados por matriz extracelular nos rins de animais LP no 21DG e 7DPN. A expressão de mRNA para colágeno I está aumentada nestes dois períodos estudados parecendo haver preenchimento com estroma devido à falta de parênquima nos animais LP.

O fator de transcrição ZEB1, é um marcador de transição epitélio mesenquimal (EMT) (VANNIER *et al.*, 2013; EGGERS *et al.*, 2016, SENE *et al.*, dados não publicados), essa transição é promovida através da supressão de marcadores epiteliais, como a e-caderina, e de miRNAS da família miR-200 (VANNIER *et al.*, 2013). Além desse papel, Zeb1, tem uma função crítica na organogênese animal (GONG & EULENBERG, 2001) e na regulação da proliferação celular mesenquimal (LIU *et al.*, 2008). Recentemente, Gu e colaboradores (2016) demonstraram que Zeb1 e Six2 apresentam padrões idênticos de expressão em fases distintas da organogênese renal indicando a existência de uma rede complexa de regulação entre estas duas proteínas. Demonstraram ainda que Zeb1, em associação com aumento na expressão de Six2 e redução na expressão de c-myc, promove proliferação e inibe apoptose e migração de células do CM. Nos animais de 21 DG do grupo LP, a expressão proteica e gênica de Six2 estava maior do que nos animais controle, paralelamente a redução na expressão de c-Myc, então esses achados

corroboram os dados do grupo de Gu *et al.* (2016). Além disso, o aumento nas células positivas para Ki67 em LP é patente, tanto no 17º quanto no 21º DG.

ZEB2 é um fator de transcrição que regula a morfogênese dos nefrons atuando no desenvolvimento dos túbulos proximais e na formação da junção glomérulo-tubular (Rasouly *et al.*, 2016). O mRNA para Zeb 2 está aumentado em LP nas três fases do desenvolvimento estudadas sugerindo estímulo à diferenciação em detrimento da proliferação.

Tem sido sugerido que a sinalização por mTOR desempenha papel central na percepção e resposta à disponibilidade de nutrientes intracelulares (Marshall, 2006). Desta forma, esta via certamente estaria envolvida nas respostas celulares à restrição de nutrientes maternos em LP. Como citado anteriormente o aumento de mTOR foi fundamental na redução do número de néfrons no rim fetal de babuínos, cujo as mães foram submetidas a restrição de nutrientes (Nijland *et al.*, 2007). A expressão do mRNA para mTOR no 17DG estava extremamente aumentada em LP e caiu abruptamente até o 7DPN, embora esteja ainda aumentada no 21DG. Acreditamos que o retorno das mães à ração normoproteica após o nascimento da prole com consequente aumento na disponibilidade de nutrientes para os filhotes possa estar envolvido na redução do mRNA para esta proteína no 7DPN.

Um evento *downstream* da via da mTOR inclui a sinalização por VEGF. VEGF estimula o desenvolvimento vascular e epitelial durante o desenvolvimento renal sendo um morfogênico das ramificações do BU (MARLIER *et al.*, 2009). Nijland e colaboradores (2007) observaram redução de VEGF paralelamente à redução de capilares peritubulares no rim fetal de babuínos, cujo as mães foram submetidas a restrição de nutrientes. Nossos estudos demonstraram redução

significativa do mRNA para VEGF no 17DG e aumento no 21DG e 7DPN, reforçando a hipótese que existe uma redução inicial das ramificações do BU paralelamente a redução das células do CM, e que no 21DG existe uma retomada do crescimento renal.

Vários estudos mostram a importância da regulação da apoptose, para o desenvolvimento renal, sendo que seu excesso ou diminuição durante o desenvolvimento pode resultar em anormalidades como hipoplasia renal, por exemplo (SORENSEN *et al.*, 1995; PORTEOUS *et al.*, 2000). Portanto a regulação adequada da apoptose é essencial para a nefrogênese normal, bem como para a manutenção da função renal normal no adulto. A restrição proteica gestacional em ratos foi associada ao aumento de apoptose no mesênquima metanefrogênico e redução no número de células progenitoras durante a vida embrionária (WELHAM *et al.*, 2002). Sabendo-se que membros da família Bcl, como Bcl-2 e Bax, regulam a apoptose, nós avaliamos a expressão gênica de Bcl-2 e Bax ao longo do desenvolvimento, e obtivemos aumento significativo na expressão gênica e proteica de Bcl-2 nos animais LP com 21 DG e 7 DPN comparativamente a NP. Em relação à Bax, nas três idades os animais do grupo LP, tiveram maior expressão quando comparados aos controles. Welham e colaboradores (2005) também observaram aumento na expressão de Bcl2 e Bax nos animais de 13 dias gestacionais, que sofreram restrição proteica gestacional, tanto na dieta com restrição de 6% quanto na restrição de 9% de proteína, em relação aos controles. Esse mesmo autor em 2002 relatou que a dieta materna com restrição proteica, aumentou a apoptose no início da metanefrogênese levando a redução no número de células progenitoras. Também observamos aumento de caspase 3 nos animais LP nos períodos estudados.

Como havíamos observado redução de 28,3% nas ramificações do broto uretérico após 14,5 dias de restrição proteica gestacional (MESQUITA *et al*, 2010b) analisamos a expressão gênica do receptor tirosina quinase c-ret, que é expresso pelas células do BU e, quando ativado por GDNF, induz ramificações do BU (DAVIS *et al.*, 2014). Entretanto, no 17 DG observamos aumento significativo no mRNA codificante de c-ret que, teoricamente levaria ao aumento nas ramificações do BU, mas como não observamos diferença na expressão de GDNF, nesse período, é plausível supor que, apesar do aumento de c-Ret, não está ocorrendo aumento de ramificações. Entretanto, nos animais LP de 21 DG, a expressão gênica tanto de c-Ret quanto de GDNF está aumentada, podendo indicar um mecanismo de compensação, para tentar reestabelecer as ramificações. Entretanto não sabemos se a expressão destas proteínas também está aumentada. De qualquer forma fica evidente a relação entre a expressão de six2 e GDNF nos 3 tempos estudados. Brodbeck e colaboradores (2004) demonstraram que Six2 regula a transcrição de *Gdnf*. Desta forma, a redução de 28% nas células positivas para six2 poderia repercutir, na mesma proporção, em redução de GDNF que, por sua vez, atuaria na redução de 28,3% das ramificações do broto uretérico que observamos anteriormente (MESQUITA *et al*, 2010b).

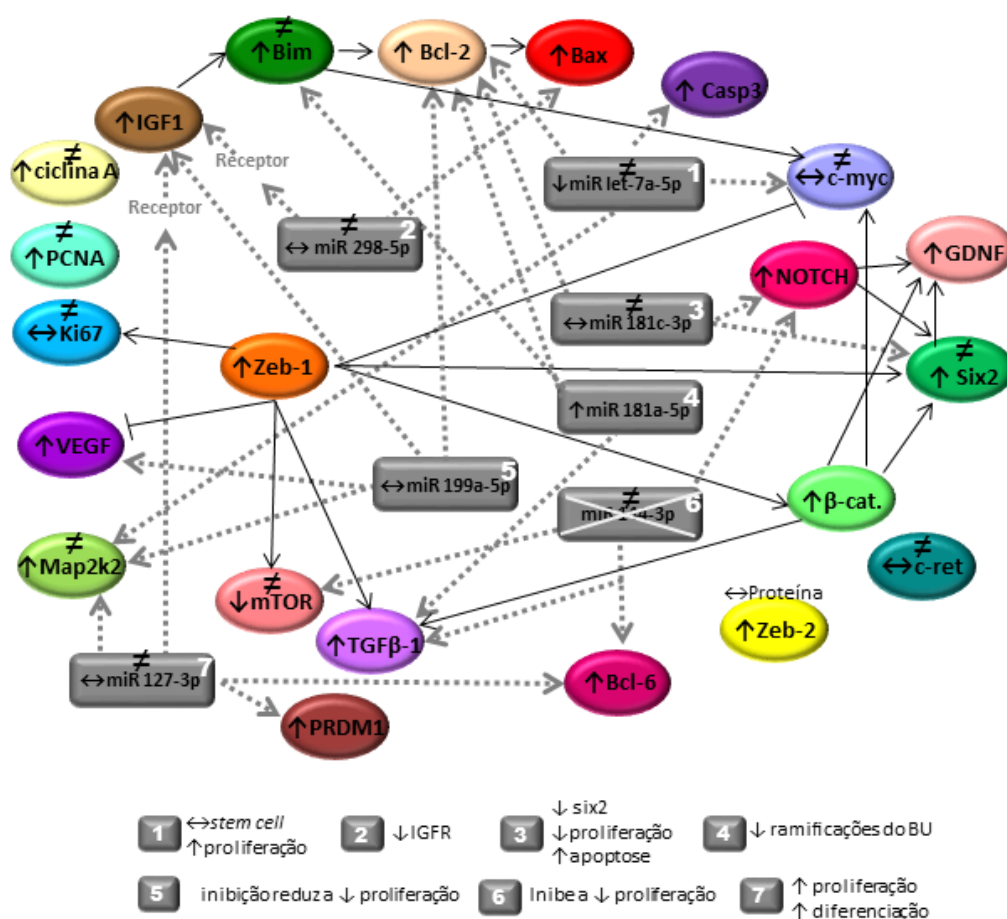
$\beta$ -catenina interage com Smad1 e Smad4 formando um complexo transcricional (HU *et al.*, 2003) que controla c-myc que, por sua vez regula a proliferação e a diferenciação do epitélio tubular renal (HU & ROSENBLUM, 2005). Tem sido demonstrado que  $\beta$ -catenina participa de uma via de sinalização que controla o tamanho dos órgãos. Esta proteína modula a população de células progenitoras do CM e junto a um complexo transcricional se liga à região

promotora do gene anti-apoptótico *bcl2l1*, no rim em desenvolvimento (BOIVIN & BRIDGEWATER, 2014). Além disso,  $\beta$ -catenina interage com o receptor c-ret que, quando é estimulado por GDNF, libera-a no citosol e a  $\beta$ -catenina migra para o núcleo das células do BU (SARIN *et al.*, 2014). Além de sua participação na alongação do ducto de Wolffian, a  $\beta$ -catenina é essencial para que ocorram ramificação e diferenciação do BU (BRIDGEWATER *et al.*, 2008; MAROSE *et al.*, 2008). Entretanto, Bridgewater e colaboradores (2011) demonstraram que o aumento na expressão de  $\beta$ -catenina levou ao aumento na expressão de TGFB1 nas células epiteliais inibindo ramificações do BU e causando diferenciação prematura das células progenitoras do CM.

Diversos estudos demonstram que o aumento da expressão de  $\beta$ -catenina no CM interrompe as ramificações do BU e a nefrogênese pela desregulação de genes importantes durante o desenvolvimento renal (BOIVIN *et al.*, 2015). Observamos que expressão gênica e proteica de  $\beta$ -catenina está aumentada durante os períodos estudados do desenvolvimento renal nos animais LP. Durante o desenvolvimento renal a  $\beta$ -catenina é expressa tanto no BU quanto no CM modulando a programação gênica que rege novos brotamento e ramificação do BU e a nefrogênese. Em LP no 17 DG é evidente o aumento de beta catenina no BU, no citosol, enquanto que no NP a localização é no núcleo. No CM também observamos marcação para beta catenina e não no NP. O mesmo foi observado no 21 DG e no 7 DPN onde a marcação ocorreu em túbulos distais e coletores.

Enfim, obtivemos grande quantidade de resultados envolvendo microRNAs, mRNAs e proteínas cuja interpretação nos abre uma série de possibilidades que necessitam estudos adicionais para comprovação. Mesmo quanto ao processo de nefrogênese normal que já foi amplamente estudado por

diversos autores (MUGFORD *et al.*, 2009; COSTANTINI & KOPAN, 2010; LITTLE & MCMAHON, 2012;), pouco se sabe sobre os mecanismos que determinam o número de néfrons. Isso é uma questão particularmente importante, visto que o baixo número de néfrons, é um fator de risco para hipertensão e doença renal crônica (BENZ *et al.*, 2011; HOY *et al.*, 2006; LUYCKX & BRENNER, 2005; SCHREUDER, 2012). Nosso estudo visou elucidar a participação dos miRNAs na regulação gênica dos genes-chaves, envolvidos nos processos de proliferação, diferenciação e apoptose, que são essenciais no desenvolvimento renal, objetivando esclarecer os mecanismos envolvidos na gênese renal que levam ao menor número de néfrons no nosso modelo de restrição proteica gestacional.



**Figura 46.** Expressão e inter-relações de miRNAs e de seus alvos no 7 DPN em rins de animais LP comparativamente NP.

CONCLUSÃO

## VI. CONCLUSÕES

Os principais achados:

### No 17 DG:

- Redução da área renal total, da área nefrogênica e de células em proliferação;
- Alteração na expressão de seis microRNAs com aumento da expressão de miR-181a-5p, miR-181c-3p e o let-7a-5p e redução de miR-127-3p, o miR-144-3p e o miR-199a-5p; No CM, redução do mRNA para Notch1 e diminuição pós-transcricional na proteína Six2, que levou a redução de 28% das células tronco.
- A expressão reduzida de Six2 e o aumento de  $\beta$ -catenina e ZEB2 induziram diferenciação prematura destas células do CM. O aumento de ZEB1 induziu redução de c-myc e da proliferação celular. Ocorreu ainda, aumento de Bim, Bax e caspase 3 sugerindo aumento de apoptose;
- No BU, aumento de  $\beta$ -catenina e mTOR com redução de VEGF e c-myc, sendo que estas mudanças redundam na ação de reduzir as ramificação do BU

### No 21 DG:

- Redução no peso dos filhotes machos no 21DG;
- Redução da área nefrogênica.e dos rins;
- O miR-127-3p, miR-298-5p, let-7a-5p, miR-181a-5p e o miR-181c-3p estão com sua expressão aumentada nos animais LP de 21 DG.
- No CM, aumento do mRNA para Notch1, c-myc e de Six2, embora hovesse redução de 27,7% das células tronco.  $\beta$ -catenina e ZEB2 continuam aumentadas induzindo diferenciação destas células do CM.

Ocorreu ainda, aumento de Bcl-2, Bax e caspase 3 sugerindo aumento de apoptose. Six2 levou ao aumento na expressão de *Gdnf*;

- No BU atuam o aumento do VEGF e de c-ret que pelo aumento de GDNF restabelece os brotamentos do BU, embora a expressão de  $\beta$ -catenina e mTor, que reduzem as ramificações ainda esteja aumentada. A expressão de Zeb 2 e PRDM1 está elevada induzindo a diferenciação.

#### **No 7 DPN:**

- Expressão maior do miR-181a-5p e menor de let-7a-5p;
- mTOR está regulada negativamente e Bax, Bim, Casp3, Col1, Gdnf, Tgfb1, Bcl2, Bcl6, Ciclina A, Map2k2, Prdm1, Vegf,  $\beta$ -Catenina, Zeb1, Zeb2, Notch1 e Igf1 estão regulados positivamente.

Estes resultados demonstram que os miRNAs, os mRNAs e as proteínas aqui investigados, estão modificados nos animais LP com 17DG acarretando na redução da indução recíproca entre o CM e BU e, conseqüentemente, do número de néfrons. Proteínas responsáveis pelo controle do tamanho dos rins estão alteradas, levando a redução deste órgão. Grande parte dos mRNAs e proteínas tem a expressão aumentada no 21DG e no 7DPN, a maioria com ação positiva à nefrogênese, sugerindo ação compensatória para recuperação no desenvolvimento renal. Existe uma rede intrincada e finamente regulada mediando as alterações renais provocadas pela restrição proteica gestacional.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBROS V. MicroRNAs and developmental timing. *Curr Opin Genet Dev.* 2011; 21, 511-7.
- BAILEY ST, ZHOU B, DAMRAUER JS, et al. mTOR inhibition induces compensatory, therapeutically targetable MEK activation in renal cell carcinoma. *PLoS One*, 2014; 9: e104413.
- BAO MH, FENG X., ZHANG YW, LOU XY, CHENG Y, ZHOU HH. Let-7 in cardiovascular diseases, heart development and cardiovascular differentiation from stem cells. *Int J Mol Sci.* 2013; 14: 23086-102.
- BARBAGALLO et al. miR-296-3p, miR-298-5p and their downstream networks are causally involved in the higher resistance of mammalian pancreatic  $\alpha$  cells to cytokine-induced apoptosis as compared to  $\beta$  cells. *BMC Genomics.* 2013; 14:62.
- BARKER DJP, WINTER PD, OSMOND C, MARGETTS B, SIMMONDS, SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet.* 1989. 577-580.
- BARKER DJ. Intrauterine programming of adult disease. *Mol Med Today.* 1995; 1:418–423.
- BARKER D. *In utero* programming of chronic disease. *Clinical Science.* 1998; 95:115–128.
- BARKER DJ. The developmental origins of chronic adult disease. *Acta Paediatrica.* 2004; 93(Suppl): 26-33.
- BARKER M, ROBINSON S, OSMOND C, BARKER DJ. Birth weight and body fat distribution in adolescent girls. *Arch Dis Child.* 1997; 77: 381-383.
- BEITENS IZ, BAYARD F, ANCES IG, KOWARSKI A, MIGEON CJ: The metabolic clearance rate, blood production, interconversion and transplacental passage of cortisol and cortisone in pregnancy near term. *Pediatr Res.* 1973; 7:509–519.
- BENEDIKTSSON R, LINDSAY R, NOBLE J, SECKL JR, EDWARDS CRW. Glucocorticoid exposure in utero: A new model for adult hypertension. *Lancet.* 1993; 341:339–341.
- BENEDIKTSSON R, BRENNAND J, TIBI L, CALDER AA, SECKL JR, EDWARDS CRW. Fetal osteocalcin levels are related to placental 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in humans. *Clin Endocrinol.* 1995; 42:551–555.

- BENEDIKTSSON R, CALDER AA, EDWARDS CRW, SECKL JR: Placental 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 is the placental barrier to maternal glucocorticoids: Ex vivo studies. *Clin Endocrinol.* 1997; 46:161–166.
- BENTWICH I, AVNIEL A, KAROV Y, AHARONOV R, GILAD S, BARAD O, BARZILAI A, EINAT P, EINAV U, MEIRI E, SHARON E, SPECTOR Y, BENTWICH Z. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet.* 2005; 37: 766-770.
- BERTRAM C, TROWERN AR, COPIN N, JACKSON AA, WHORWOOD CB. The maternal diet during pregnancy programs altered expression of the glucocorticoid receptor and type 2 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase: potential molecular mechanisms underlying the programming of hypertension *in utero.* *Endocrinology* 2001; 142: 2841–2853.
- BOIVIN FJ, SARIN S, EVANS JC, BRIDGEWATER D. The Good and Bad of  $\beta$ -Catenin in Kidney Development and Renal Dysplasia. *Front Cell Dev Biol.* 2015; 3: 81.
- BOYLE S, MISFELDT A, CHANDLER KJ, DEAL KK, SOUTHARD-SMITH EM, MORTLOCK DP, BALDWIN HS, DE CAESTECKER M. Fate mapping using Cited1-CreERT2 mice demonstrates that the cap mesenchyme contains self-renewing progenitor cells and gives rise exclusively to nephronic epithelia. *Dev Biol.* 2008; 313:234–245.
- BRIDGEWATER D, DI GIOVANNI V, CAIN JE, COX B, JAKOBSON M, SAINIO K, ROSENBLUM ND. beta-Catenin causes renal dysplasia via upregulation of Tgfbeta2 and Dkk1. *J Am Soc Nephrol.* 2011, 22: 718-731.
- BROWN AC, MUTHUKRISHNAN SD, OXBURGH L. A synthetic niche for nephron progenitor cells. *Dev. Cell.* 2015; 34, 229–241.
- BRUYNE E, BOS TJ, SCHUIT F, VAN VALCKENBORGH E, MENU E. IGF-1 suppresses Bim expression in multiple myeloma via epigenetic and posttranslational mechanisms. *Blood.* 2010; 15: 2430-2440.
- BUSSING I, SLACK FJ, GROSSHANS H. let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer. *Trends Mol Med* 2008; 14: 400-409.
- CAMPBELL AL, MURPHY BEP: The maternal-fetal cortisol gradient during pregnancy and at delivery. *J Clin Endocrinol Metab.* 1977; 45:435–440.
- CARRIERI C, FORREST AR, SANTORO C, PERSICHETTI F, CARNINCI P, ZUCHELLI S, GUSTINCICH S. Expression analysis of the long non-coding RNA antisense to Uchl1 (AS Uchl1) during dopaminergic cells' differentiation *in vitro* and in neurochemical models of Parkinson's disease. *Front. Cell. Neurosci.* 2015; 9.

- CARVALHO EB, SALES TKA. Avaliação nutricional, a base da escolha terapêutica. In: Eduardo Botelho de Carvalho (ed). Manual de Suporte Nutricional. Medsi, 1992, 3: 21-39.
- CHEN J, WANG M, GUO M, XIE Y, CONG Y. miR-127 Regulates Cell Proliferation and Senescence by Targeting BCL6. 2013;8(11):1–9.
- CHEN JH, TARRY-ADKINS JL, MATHARU K, YEO GS, OZANNE SE. Maternal protein restriction affects gene expression profiles in the kidney at weaning with implications for the regulation of renal function and lifespan. *Clin Sci (Lond)*. 2010; 23; 119: 373-384.
- CHEN S, BRUNSKILL EW, POTTER SS, DEXHEIMER PJ, SALOMONIS N, et al. Intrinsic Age-Dependent Changes and Cell-Cell Contacts Regulate Nephron Progenitor Lifespan. *Developmental Cell*. 2015; 35: 49–62.
- CHENG HT, MINER JH, LIN M, TANSEY MG, ROTH K, KOPAN R. Gamma -secretase activity is dispensable for mesenchyme-to-epithelium transition but required for podocyte and proximal tubule formation in developing mouse Kidney. *Development*. 2003; 130: 5031-5042.
- CHENG HT, KIM M, VALERIUS MT, SURENDRAN K, SCHUSTER-GOSSLER K, GOSSLER A, MCMAHON AP, KOPAN R. Notch2, but not Notch1, is required for proximal fate acquisition in the mammalian nephron. *Development*. 2007; 134: 801-811.
- CHU CY, RANA TM. Small RNAs: regulators and guardians of the genome. *J Cell Physiol*. 2007; 213: 412-419.
- CHU JYS, SIMS-LUCAS S, BUSHNELL DS, BODNAR AJ, KREIDBERG JA, HO J. Dicer function is required in metanephric mesenchyme for early kidney development. *Am J Physiol*. 2014; 306: F764-F-772.
- CHUNG E, DEACON P, MARABLE S, SHIN J, PARK J. Notch signaling promotes nephrogenesis by downregulating Six2. *Development*. 2016; 143: 3907-3913.
- COLE TJ, BLENDY JA, MONAGHAN AP, SCHMID W, AGUZZI A, SCHUTZ G: Molecular genetic analysis of glucocorticoid signaling during mouse development. *Steroids*. 1995; 60:93–96.
- COPLEY, MR. AND EAVES, CJ. Developmental changes in hematopoietic stem cell properties. *Exp Mol Med*. 2013; 45, e55.
- COSTANTINI F. Renal branching morphogenesis: concepts, questions, and recent advances. *Differentiation*. 2006; 74: 402–421.
- CONSTANTINI F, KOPAN R. Patterning a Complex Organ: Branching Morphogenesis and Nephron Segmentation in Kidney Development. *Developmental Cell*. 2010; 18: 698-712.

- COUILLARD M, TRUDEL M. c-myc as a Modulator of Renal Stem/Progenitor Cell Population. *Developmental Dynamics*. 2009; 238:405–414.
- CROWLEY SD, GURLEY SB, OLIVERIO MI, PAZMINO AK, GRIFFITHS R, FLANNERY PJ, et al. Distinct roles for the kidney and systemic tissues in blood pressure regulation by the renin-angiotensin system. *J Clin Invest*. 2005; 115: 1092-1099.
- DAS A, TANIGAWA S, KARNER CM, XIN M, LUM L, CHEN C, OLSON EN, PERANTONI AO, CARROLL TJ. Stromal–epithelial crosstalk regulates kidney progenitor cell differentiation. *Nature Cell Biology*. 2013; 15: 1035-1044.
- DAVE-SHARMA S, WILSON RC, HARBISON MD, NEWFIELD R, AZAR M, KROZOWSKI ZS, FUNDER JW, SHACKLETON CHL, BRADLOW HL, WEI JQ, HERTECANT J, MORAN A, NEIBERGER RE, BALFE JW, FAT-TAH A, DANEMAN D, AKKURT HI, DESANTIS C, NEW MI: Extensive personal experience: Examination of genotype and phenotype relationships in 14 patients with apparent mineralocorticoid excess. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; 83:2244–2254.
- DAVIS EM, BABINEAU DC, WANG X, ZYZANSKI S, ABRAMS B, BODNAR LM, HORWITZ RI. Short inter-pregnancy intervals, parity, excessive pregnancy weight gain and risk of maternal obesity. *Matern Child Health J*. 2014 18: 554-562.
- DESAI M, CROWTHER NJ, LUCAS A, HALES CN. Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. *Br J Nutr*. 1996; 76:591-603.
- DIAZ R, FUXE K, OGREN SO: Prenatal corticosterone treatment induces long-term changes in spontaneous and apomorphine-mediated motor activity in male and female rats. *Neuroscience*. 1997; 81:129–140.
- DRAKE AJ, WALKER BR. The intergenerational effects of fetal programming: non-genomic mechanisms for the inheritance of low birth weight and cardiovascular risk. *Journal of Endocrinology*. 2004; 180:1–16.
- DU T, ZAMORE PD. microPrimer: The biogenesis and function of microRNA. *Development*. 2005; 132: 4645-4652.
- EDWARDS LJ, MCFARLANE JR, KAUTER KG, MCMILLEN IC. Impact of periconceptional nutrition on maternal and fetal leptin and fetal adiposity in singleton and twin pregnancies. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005; 288, R39–R45.
- EGGERS JC, MARTINO V, REINBOLD R, SCHAFER SD, KIESEL L, STARZINSKI-POWITZ A, SCHURING AN, KEMPER B, GREVE B, GOTTE M. microRNA miR-200b affects proliferation, invasiveness and stemness of endometriotic cells by targeting ZEB1, ZEB2 and KLF4. *Reprod. Biomed. Online* 2016, 32: 434–445.

- ENRIGHT AJ, JOHN B, GAUL U, TUSCHL T, SANDER C, MARKS DS. MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol* 2003; 5(1): R1.
- EWINGS KE, WIGGINS CM, COOK SJ. Bim and the pro-survival Bcl-2 proteins: opposites attract, ERK repels. *Cell Cycle*. 2007; 6: 2236–2240.
- FELICES M, CICHOCKI F, MCCULLAR V, PRESNELL SR, AL-ATTAR A, LUTZ CT, MILLER JS. Cutting edge: microRNA-181 promotes human NK cell development by regulating Notch signaling. *J. Immunol.* 2011; 187: 6171–6175.
- FAO. United Nations Food and Agriculture Organization. <http://www.fao.org>. Accessed in March 12, 2016.
- FILIPOWICZ W, BHATTACHARYYA SN, SONENBERG N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* 2008; 9: 102-114.
- FOGELGREN B, YANG S, SHARP IC, HUCKSTEP OJ, MA W, SOMPONPUN SJ, CARLSON EC, UYEHARA CF, LOZANOFF S. Deficiency in Six2 during prenatal development is associated with reduced nephron number, chronic renal failure, and hypertension in Br/+ adult mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009; 296: F1166-F1178.
- FORSDAHL A. Are poor living conditions in childhood and adolescence an important risk factor for arteriosclerotic heart disease? *British Journal of Preventive and Social Medicine.* 1967; 3:249–256.
- FORSDAHL A. Observations throwing light on the high mortality in the county of Finnmark. Is the high mortality today a late effect of very poor living conditions in childhood and adolescence? *Int J Epidemiol.* 2002; 31:302–308.
- FOWDEN AL, GIUSSANI DA, FORHEAD AJ. Intrauterine *programming* of physiological systems: causes and consequences. *Physiology (Bethesda).* 2006; 21:29-37.
- GABET Y, NOH T, LEE C, FRENKEL B. Developmentally regulated inhibition of cell cycle progression by glucocorticoids through repression of cyclin A transcription in primary osteoblast cultures. *J Cell Physiol.* 2011; 226:991-998.
- GONG, SG.; EULENBERG, RL. Palatal development in Twirler mice. *Cleft Palate Craniofac. J.* 2001, 38, 622–628.
- GREGORY RI, YAN KP, AMUTHAN G, CHENDRIMADA T, DORATOTAJ B, COOCH N, SHIEKHATTAR R. The microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 2004; 432: 235-240.
- GROBSTEIN C. Inductive interaction in the development of the mouse metanephros. *J Exp Zool.* 1955; 130: 319-340.

- GU Y, ZHAO Y, ZHOU Y, XIE Y, JU P, LONG Y, et al. Zeb1 Is a Potential Regulator of Six2 in the Proliferation , Apoptosis and Migration of Metanephric Mesenchyme Cells. 2016.
- GUIDI E, MENGHETTI D, MILANI S, MONTAGNINO G, PALAZZI P, BIANCHI G. Hypertension may be transplanted with the kidney in humans: a long-term historical prospective follow-up of recipients grafted with kidneys coming from donors with or without hypertension in their families. *J Am Soc Nephrol*. 1996; 7: 1131-1138
- HAN J, LEE Y, YCOM KH, KIM YK, JIN H, KIM VN. The Drosha-DGR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*. 2004; 18: 3016-3027.
- HARVEY SJ, JARAD G CUNNINGHAM J, GOLDBERG S, SCHERMER B, HARFE BD, MCMANUS MT, BENZING T, MINER JH. Podocyte-specific deletion of dicer alters cytoskeletal dynamics and causes glomerular disease. *J Am Soc Nephrol*. 2008; 19: 2150-2158.
- HENDRY C, RUMBALLE B, MORITZ K, LITTLE MH. Defining and redefining the nephron progenitor population. *Pediatr Nephrol*. 2011; 26:1395-406.
- HERZLINGER D, KOSEKI C, MIKAWA T, AL-AWQATI Q. Metanephric mesenchyme contains multipotent stem cells whose fate is restricted after induction. *Development*. 1992; 114:565–572.
- HOHENSTEIN P, PRITCHARD-JONES K, CHARLTON J. The yin and yang of kidney development and Wilms' tumors. *Genes Dev*. 2015; 29: 467-482.
- HO J, PANDEY P, SCHATTON T, SIMS-LUCAS S, KHALID M, FRANK MH, HARTWIG S, KREIDBERG JA. The pro-apoptotic protein Bim is a microRNA target in kidney progenitors. *J Am Soc Nephrol*. 2011; 22: 1053-1063.
- HO J, KREIDBERG JA. The long and short of microRNAs in the kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2012; 23: 400-404.
- HOPPE CC, EVANS RG, BERTRAM JF, MORITZ KM. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*. 2007; 292: R1768-R1774.
- HUANG P, YE B, YANG Y, SHI J, ZHAO H. MicroRNA-181 functions as a tumor suppressor in non-small cell lung cancer (NSCLC) by targeting Bcl-2, *Tumor Biol*. 2015; 36: 3381–3387.
- HUMPHREYS BD, VALERIUS MT, KOBAYASHI A, MUGFORD JW, SOEUNG S, DUFFIELD JS, MCMAHON AP, BONVENTRE JV. Intrinsic Epithelial Cells Repair the Kidney after Injury. *Cell Stem Cell*. 2008; 2: 284–291.
- HUTVÁGNER G, MCLACHLAN J, PASQUINELLI AE, BÁLINT E, TUSCHL T, ZAMORE PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*. 2001; 293: 834-838.

- JOPLING CL, YI M, LANCASTER AM, LEMON SM, SARNOV P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific microRNA. *Science* 2005; 309:1577-1581.
- KANN M, BAE E, LENZ MO, LI L, TRANNGUYEN BT, et al. WT1 targets Gas1 to maintain nephron progenitor cells by modulating FGF signals. *Development*. 2015; 142: 1254-1266.
- KARNER CM, DAS A, MA Z, SELF M, CHEN C, LUM L, OLIVER G, CARROLL TJ. Canonical Wnt9b signaling balances progenitor cell expansion and differentiation during kidney development. *Development*. 2011; 138: 1247-1257.
- KELLER G, ZIMMER G, MALL G, RITZ E, AMANN K. Nephron number in patients with primary hypertension. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348: 101-108.
- KIM VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009; 10:126-139.
- KOBAYASHI A, VALERIUS MT, MUGFORD JW, CARROLL TJ, SELF M, OLIVER G, MCMAHON AP. Six2 defines and regulates a multipotent self-renewing nephron progenitor population throughout mammalian kidney development. *Cell Stem Cell*. 2008; 3:169-181.
- KOESTERS R, RIDDER R, KOPP-SCHNEIDER A, BETTS D, ADAMS V, NIGGLI F, BRINER J, VON KNEBEL DOEBERITZ M. Mutational activation of the beta-catenin proto-oncogene is a common event in the development of Wilms' tumors. *Cancer Res.* 1999; 59: 3880-3882.
- KOESTERS R, NIGGLI F, VON KNEBEL DOEBERITZ M, STALLMACH T. Nuclear accumulation of beta-catenin protein in Wilms' tumours. *J. Pathol.* 2003; 199: 68-76.
- KOPAN R, CHEN S, LITTLE M. Nephron progenitor cells: shifting the balance of self-renewal and differentiation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2014; 107: 293–331.
- KORSMEYER SJ, SCORRANO L. Mechanisms of cytochrome C release by pro Apoptotic bcl-2 family members. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 304: 437–411.
- KRIZ W, LEHIR M. Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases - insights from animal models. *Kidney Int.* 2005; 67: 404-419.
- LANGLEY-EVANS SC, PHILIPS G, BENEDIKTSSON R, GARDNER D, EDWARDS CRW, JACKSON AA, SECKL JR. Maternal dietary protein restriction, placental glucocorticoid metabolism and the program of hypertension. *Placenta.* 1996a; 17:169–172.

- LANGLEY-EVANS SC, WELHAM SJ, SHERMAN RC, JACKSON AA. Weanling rats exposed to maternal low-protein diets during discrete periods of gestation exhibit differing severity of hypertension. *Clin Sci (Lond)*. 1996b; 91:607-615.
- LANGLEY-EVANS SC. Fetal nutrition and adult disease – Programming of Chronic Disease through Fetal Exposure to Undernutrition. CABI *Publishing*, UK. 2004.
- LANGLEY-EVANS SC. Developmental programming of health and disease. *Proc Nutr Soc*. 2006; 65: 97–105.
- LANGLEY-EVANS SC. Nutrition programming of disease: unraveling the mechanism. *J Anat*. 2009; 215: 36-51.
- LANGLEY-EVANS SC, MCMULLEN S. Developmental origins of adult disease. *Med Princ Pract*. 2010; 19: 87-98.
- LEE RC. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993; 75: 843-854.
- LEE Y, AHN C, HAN J, CHOI H, KIM J, LEI J, PROVOST P, RADMARK O, KIM S, KIM VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425: 415-419.
- LEE Y, KIM M, HAN J, YEOM KH, LEE S, BAEK SH, KIM VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004; 23: 4051-4060.
- LI CM, KIM CE, MARGOLIN AA, GUO M, ZHU J, MASON JM, HENSLE TW, MURTY VV, GRUNDY PE, FEARON ER, D'AGATI V, LICHT JD, TYCKO B. CTNNB1 mutations and overexpression of Wnt/beta-catenin target genes in WT1-mutant Wilms' tumors. *Am. J. Pathol*. 2004; 165: 1943-1953.
- LI JY, YONG TY, MICHAEL MZ, GLEADLE JM. Review: The role of microRNAs in Kidney disease. *Nephrology* 2010; 15: 599-608.
- LI W, QIU X, JIANG H, HAN Y, WEI D, LIU J. Downregulation of miR-181a protects mice from LPS-induced acute lung injury by targeting Bcl-2. *Biomed Pharmacother*. 2016; 4461: 1-8.
- LITTLE MH, MCMAHON AP. Mammalian kidney development: principles, progress, and projections. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 2012; 4, 4.
- LIU Y, EL-NAGGAR S, DARLING DS, HIGASHI Y, DEAN DC. Zeb1 links epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence. *Development* 2008; 135: 579–588.
- LOPEZ-BERNAL A, FLINT APF, ANDERSON ABM, TURNBULL AC. 11b-Hydroxysteroid dehydrogenase activity (E.C.1.1.1.146) in human placenta and decidua. *J Steroid Biochem*. 1980; 13:1081–1087.

- LOPEZ-JARAMILLO P, GOMEZ-ARBELAEZ D, SOTOMAYOR-RUBIO A, MANTILLA-GARCIA D, LOPEZ-LOPEZ J. Maternal undernutrition and cardiometabolic disease: a latin american perspective. *BMC Medicine*. 2015; 13:41.
- LUCAS A. Programming by early nutrition in man. In: Bock, G.R. and Whelan, J. (eds) *The Childhood Environmental and Adult Disease*. John Wiley e Sons, Chichester, UK, pp. 38-55. 1991.
- LUYCKX VA, BRENNER BM. Low birth weight, nephron number, and kidney disease. *Kidney Int Suppl*. 2005 Aug;(97):S68-77.
- LUYCKX VA, BERTRAM JF, BRENNER BM, FALL C, HOY WE, OZANNE SE, VIKSE BE. Effect of fetal and child health on kidney development and long-term risk of hypertension and kidney disease. *Lancet*. 2013; 382: 273-283.
- LYU Z, MAO Z, WANG H, FANG Y, CHEN T, WAN Q, et al. MiR-181b targets Six2 and inhibits the proliferation of metanephric mesenchymal cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013;440(4):495–501.
- LV X, MAO Z, LYU Z, ZHANG P, ZHAN A, WANG J, et al. miR181c promotes apoptosis and suppresses proliferation of metanephric mesenchyme cells by targeting Six2 in vitro. 2014;(July):571–9.
- MARLIER A, SCHMIDT-OTT KM, GALLAGHER AR, BARASCH J, KARIHALOO A. Vegf as an epithelial cell morphogen modulates branching morphogenesis of embryonic kidney by directly acting on the ureteric bud. *Mech Dev*. 2009; 126: 91–98.
- MARTINS VJ, TOLEDO FTM, GRILLO LP, CARMO PFM, MARTINS PA, CLEMENTE AP, SANTOS CD, FATIMA AVM, SAWAYA AL. Long-lasting effects of undernutrition. *Int J Environ Res Public Health* 2011; 8: 1817-1846.
- MARRONE AK, STOLZ DB, BASTACKY SI, KOSTKA D, BODNAR AJ, HO J. MicroRNA-17~92 is required for nephrogenesis and renal function. *J Am Soc Nephrol*. 2014; 25: 1440-1452.
- MARSHALL S. Role of insulin, adipocyte hormones, and nutrient-sensing pathways in regulating fuel metabolism and energy homeostasis: a nutritional perspective of diabetes, obesity, and cancer. *Sci STKE*. 2006, re7.
- MENDELSON ME. In hypertension, the kidney is not always the heart of the matter. *J Clin Invest* 2005; 115: 840-844.
- MENENDEZ-CASTRO C, HILGERS KF, AMANN K, DANIEL C, CORDASIC N, WACHTVEITL R, FAHLBUSCH F, PLANK C, DÖTSCH J, RASCHER W, HARTNER A. Intrauterine growth restriction leads to a dysregulation of Wilms' tumour suppressor gene 1 (WT1) and to early podocyte alterations. *Nephrol Dial Transplant*. 2013; 28:1407-1417.

- MESQUITA FF, GONTIJO JAR, CULLE-MCEWEN L, ARENA D, BOER PA, BERTRAM JF, ARMITAGE JA. Low protein diet in utero results in reduced ureteric branching in cultured metanephroi, but the renal renin-angiotensin system is not involved. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*. 2009; v.1. p.S31 - S32
- MESQUITA FF, GONTIJO JAR, BOER PA. Expression of renin-angiotensin system signalling compounds in maternal protein-restricted rats: effect on renal sodium excretion and blood pressure. *Nephrol Dial Transpl*. 2010a; 25: 380-388.
- MESQUITA FF, GONTIJO JA, BOER PA. Maternal undernutrition and the offspring kidney: from fetal to adult life. *Braz J Med Biol Res*. 2010b; 43:1010-1018.
- MEZA-SOSA, K. F., PEDRAZA-ALVA, G. AND PEREZ-MARTINEZ, L. microRNAs: key triggers of neuronal cell fate. *Front Cell Neurosci*. 2014; 8, 175.
- miRBase. The microRNA database. <http://www.mirbase.org>. Accessed in february 21, 2016.
- MIYAJIMA A, SUNOUCHI M, MITSUNAGA K, YAMAKOSHI Y, NAKAZAWA K, USAMI M. Sexinf of postimplantation rat embryos in stores two-dimensional electrophoresis (2-DE) samples by polymerase chain reaction (PCR) of an SRY sequence. *T. J. Toxicological Sciences*. 2009; 34: 681-685
- MONASTYRSKAYA K, SÁNCHEZ-FREIRE V, HASHEMI GHEINANI A et al: miR-199a-5p regulates urothelial permeability and may play a role in bladder pain syndrome. *Am J Pathol*, 2013; 182(2): 431–48.
- MORITZ KM, WINTOUR EM. Functional development of the meso- and metanephros. *Pediatr Nephrol*. 1999; 13: 171–178.
- MUGFORD JW, YU J, KOBAYASHI A, MCMAHON AP. High-resolution gene expression analysis of the developing mouse kidney defines novel cellular compartments within the nephron progenitor population. *Dev. Biol*. 2009; 333: 312– 323.
- MUGRAUER G, EKBLÖM P. Contrasting expression patterns of three members of the myc family of protooncogenes in the developing and adult mouse kidney. *J Cell Biol*. 1991; 112:13–25.
- MURPHY BEP, CLARK SJ, DONALD IR, PINSKY M, VEDADY DL. Conversion of maternal cortisol to cortisone during placental transfer to the human fetus. *Am J Obstet Gynecol*. 1974; 118:538–541.

- MURPHY DJ, MUTHALAGU N. Bim's upfirst Auto-commentary on (Bim is the primary mediator of Myc-induced apoptosis) in multiple solid tissues. *Molecular & Cellular Oncology*. 2015; 2: e975083.
- NAGALAKSHMI VK, REN Q, PUGH MM, VALERIUS MT, MCMAHON AP, YU J. Dicer regulates the development of nephrogenic and ureteric compartments in the mammalian kidney. *Kidney Int*. 2011, 79, 317–330.
- NAGALAKSHMI VK, LINDNER V, WESSELS A, YU J. microRNA-dependent Temporal Gene Expression in the Ureteric Bud Epithelium during Mammalian Kidney Development. *Developmental Dynamics*. 2014.
- NIJLAND MJ, SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH NE, HUBBARD GB, NATHANIELSZ PW, COX LA. Nonhuman primate fetal kidney transcriptome analysis indicates mammalian target of rapamycin (mTOR) is a central nutrient-responsive pathway. *J Physiol*. 2007; 579: 643-656.
- NISHINAKAMURA R, OSAFUNE K. Essential roles of Sall family genes in kidney development. *J Physiol Sci*. 2006; 56:131–136.
- NISHINAKAMURA R, UCHIYAMA Y, SAKAGUCHI M, FUJIMURA S. Nephron progenitors in the metanephric mesenchyme. *Pediatr Nephrol*. 2011; 26:1463-1467.
- NWAGWU MO, COOK A, LANGLEY-EVANS SC. Evidence of progressive deterioration of renal function in rats exposed to a maternal low-protein diet in utero. *Br J Nutr*. 2000; 83:79-85.
- NYIRENDA MJ, LINDSAY RS, KENYON CJ, BURCHELL A E SECKL JR. Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. *Journal of Clinical Investigation*. 1998; 15:2174–2181.
- OLIVER G, WEHR R, JENKINS NA, COPELAND NG, CHEYETTE BN, HARTENSTEIN V, ZIPURSKY SL, GRUSS P. Homeobox genes and connective tissue patterning. *Development*. 1995; 121: 693-705.
- OROM UA, NIELSEN FC, LUND AH. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Molecular Cell* 2008; 30:460-471.
- PAN C, CHEN H, WANG L, YANG S, FU H, et al. Down-regulation of MiR-127 facilitates hepatocyte proliferation during rat liver regeneration. *PLoS One*. 2012; 7: e39151.
- PAINTER RC, ROSEBOOM TJ, VAN MONTFRANS GA, BOSSUYT PM, KREDIET RT, OSMOND C, BARKER DJ, BLEKER OP. Microalbuminuria in adults after prenatal exposure to the Dutch famine. *J Am Soc Nephrol*. 2005; 16: 189-194.

- PFAFFL MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 2001; 29: e45.
- PHUA YL, HO J. MicroRNAs in the pathogenesis of cystic kidney disease. *Curr Opin Pediatr*. 2015; 27: 219-226.
- PHUA YL, CHU JYS, MARRONE AK, BODNAR AJ, SIMS-LUCAS S, HO J. Renal stromal miRNAs are required for normal nephrogenesis and glomerular mesangial survival. *Physiol Rep*. 2015; 3: e12537.
- PORTEOUS S, TORBAN E, CHO NP, CUNLIFFE H, CHUA L, MCNOE L, WARD T, SOUZA C, GUS P, GIUGLIANI R, SATO T, YUN K, FAVOR J, SICOTTE M, GOODYER P, ECCLES M. Primary renal hypoplasia in humans and mice with PAX2 mutations: evidence of increased apoptosis in fetal kidneys of Pax2(1Neu) +/- mutant mice. *Hum Mol Genet*. 2000; 9: 1-11.
- RANE S, HE M, SAYED D et al: An antagonism between the AKT and betaadrenergic signaling pathways mediated through their reciprocal effects on miR-199a-5p. *Cell Signal*, 2010; 22(7): 1054–62.
- RAVELLI GR, STEIN ZA, Susser MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N England J Med* 1976; 295: 349-353.
- RASOULY HM, KUMAR S, CHA S, PISAREK-HOROWITZ A, SHARMA, et al. Loss of Zeb2 in mesenchyme derived nephrons causes primary glomerulocystic disease. *Kidney Int*. 2016; 90: 1262-1273.
- RECZKO M, MARAGKAKIS M, ALEXIOU P, GROSSE I, HATZIGEORGIOU AG. Functional microRNA targets in protein coding sequences. *Bioinformatics* 2012; 28:771-776.
- REIDY K, ROSENBLUM N. Cell and molecular biology of kidney development. *Semin Nephrol* 2009; 29:321–337
- RETTIG R, FOLBERTH C, STAUSS H, KOPF D, WALDHERR R, UNGER T. Role of the kidney in primary hypertension: a renal transplantation study in rats. *Am J Physiol*. 1990; 258: F606-F611.
- REYNOLDS RM. Glucocorticoid excess and the developmental origins of disease: Two decades of testing the hypothesis - 2012 Curt Richter Award Winner. *Psychoneuroendocrinology*. 2013; 38: 1-11.
- RIBBACK S, CIGLIANO A, KROEGER N, et al. PI3K/AKT/mTOR pathway plays a major pathogenetic role in glycogen accumulation and tumor development in renal distal tubules of rats and men. *Oncotarget*. 2015; 6: 13036-13048.
- ROBERTS D, DALZIEL S. Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane Database Syst. Rev*. 2006; 3: CD004454.

- ROGERSON FM, KAYES KM, WHITE PC: Variation in placental type 2, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity is not related to birth weight or placental weight. *Mol Cell Endocrinol.* 1997; 128:103–109.
- ROSE G. Familial patterns in ischaemic heart disease. *British Journal of Preventive and Social Medicine.* 1964; 18:75-80.
- ROSEBOOM TJ, VAN DER MEULEN JH, VAN MONTFRANS GA, RAVELLI AC, OSMOND C, BARKER DJ, BLEKER OP. Maternal nutrition during gestation and blood pressure in later life. *J Hypertens* 2001; 19: 29-34.
- ROSTAND SG. Oligonephronia, primary hypertension and renal disease: 'is the child father to the man?'. *Nephrol Dial Transplant.* 2003; Aug;18(8):1434-8.
- ROUSH, S, SLACK, FJ. The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol.* 2008; 18, 505-16.
- RUIJTER JM, RAMAKERS C, HOOGAARS WMH, KARLEN Y, BAKKER O, van den Hoff MJ, MOORMAN AF. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic acids research* 2009; 37: e45.
- SAKURAI K, FURUKAWA C, HARAGUCHI T et al: MicroRNAs miR-199a-5p and -3p target the Brm subunit of SWI/SNF to generate a double-negative feedback loop in a variety of human cancers. *Cancer Res*, 2011; 71(5): 1680–89.
- SARIOLA H. Nephron induction revisited: from caps to condensates. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2002;11:17–21.
- SAXEN L. Ontogenesis of the vertebrate excretory system. In: Barlow PW, Breen PB, Wylie CC, editors. *Organogenesis of the kidney*. New York: Cambridge University Press. 1987; p 1–34.
- SELF M, LAGUTIN OV, BOWLING B, HENDRIX J, CAI Y, DRESSLER GR, OLIVER G. Six2 is required for suppression of nephrogenesis and progenitor renewal in the developing kidney. *The EMBO Journal* 2006; 25: 5214-5228.
- SENE LdB, Mesquita FF, de Moraes LN, Santos DC, Carvalho R, Gontijo JA, Boer PA. Involvement of renal corpuscle microRNA expression on epithelial-to-mesenchymal transition in maternal low protein diet in adult programmed rats. *PLoS One.* 2013; 8: e71310.
- SEQUEIRA-LOPEZ M, WEATHERFORD ET, BORGES GR, MONTEAGUDO MC, PENTZ ES, HARFE BD, et al. The microRNA-processing enzyme dicer maintains juxtaglomerular cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2010; 21:460–467.
- SCHMID P, SCHULZ WA, HAMEISTER H. Dynamic expression pattern of the myc protooncogene in midgestation mouse embryos. *Science.* 1989; 24:226–229.

- SCHREUDER M, DELEMARRE-VAN DE WAAL H, VAN WIJK A. Consequences of intrauterine growth restriction for the kidney. *Kidney Blood Press Res* 2006; 29: 108-125.
- SHEN Q, CICINNATI VR, ZHANG X et al: Role of microRNA-199a-5p and discoidin domain receptor 1 in human hepatocellular carcinoma invasion. *Mol Cancer*, 2010; 9: 227.
- SHI S, YU L, CHIU C, SUN Y, CHEN Y, KHITROV G, et al. Podocyte-selective deletion of dicer induces proteinuria and glomerulosclerosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2008; 19:2159–2169.
- SINGHT RR, MORITZ KM, BERTRAM JF, CULLEN-MCEWEN LA. Effects of dexamethasone exposure on rat metanephric development: in vitro and in vivo studies. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007; 293(2):F548-54.
- SORENSEN CM, ROGERS SA, KORSMEYER SJ, HAMMERMAN MR. Fulminant metanephric apoptosis and abnormal kidney development in bcl-2-deficient mice. *Am J Physiol.* 1995; 268: F73-F81.
- SOKOL NS. Small temporal RNAs in animal development. *Curr Opin Genet Dev.* 2012; 22: 368-73.
- STANTON BR, PERKINS AS, TESSAROLLO L, SASSOON DA, PARADA LF. Loss of Nmyc function results in embryonic lethality and failure of the epithelial component of the embryo to develop. *Genes Dev.* 1992; 6: 2235–2247.
- STEWART PM, ROGERSON FM, MASON JI: Type 2, 11b-hydroxysteroid dehydrogenase messenger RNA and activity in human placenta and fetal membranes: its relationship to birth weight and putative role in fetal steroidogenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80:885–890.
- SUN H, ZHOU C, FU L. Inhibition of MiR-199a-5p Reduced Cell Proliferation in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease through Targeting CDKN1C. 2015;195–200.
- TÜFEKCI KU, MEUWISSEN RL, GENÇ S. The role of microRNAs in biological processes. *Methods Mol Biol.* 2014; 1107: 15-31.
- VALENTE FLS. Fome, desnutrição e cidadania: inclusão social e direitos humanos. *Saúde e Sociedade.* 2003; 2: 51-60.
- VANNIER, C; MOCK, K.; BRABLETZ, T; DRIEVER, W. Zeb1 regulates E-cadherin and Epcam (epithelial cell adhesion molecule) expression to control cell behavior in early zebrafish development. *J. Biol. Chem.* 2013, 288: 18643–18659.
- VAN ROOIJ E, SUTHERLAND LB, THATCHER JE, et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:13027-13032.

- VASUDEVAN S, TONG Y, STEITZ JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 2007; 318:1931-1934.
- VLACHOS IS, HATZIGEORGIOU AG. Online resources for miRNA analysis. *Clin Biochem* 2013; 46:879-900.
- WEI Q, BHATT K, HE HZ, MI QS, HAASE VH, DONG Z. Targeted deletion of Dicer from proximal tubules protects against renal ischemia-reperfusion injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2010; 21:756–761.
- WEI J, ZHANG Y, LUO Y, WANG Z, BI S, SONG D, DAI Y, WANG T, QIU L, WEN L, YUAN L, YANG JY. Aldose reductase regulates miR-200a-3p/141-3p to coordinate Keap1-Nrf2, Tgf $\beta$ 1/2, and Zeb1/2 signaling in renal mesangial cells and the renal cortex of diabetic mice. *Free Radic Biol Med.* 2014; 67: 91-102.
- WELHAM SJ, WADE A, WOOLF AS. Protein restriction in pregnancy is associated with increased apoptosis of mesenchymal cells at the start of rat metanephrogenesis. *Kidney Int* 2002;61:1231 - 1242.
- WELHAM S, RILEY P, WADE A, HUBANK M, WOOLF A. Maternal diet programs embryonic kidney gene expression. *Physiol Genomics* 2005; 22:48–56
- WHITE MF: IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002, 283:E413–422.
- WOODALL SM, JOHNSTON BM, BREIER BH, GLUCKMAN PD. Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. *Pediatr Res.* 1996; 40:438-443.
- WOOD-BRADLEY RJ, CULLEN-McEWEN LA, EIPPER LG, ARENA D, HENRY SL, BERTRAM JF, ARMITAGE JC. Maternal protein restriction affects kidney development by impairing nephrogenesis not ureteric branching morphogenesis. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease.* 2011; v.3. p.O3i-1.
- YAMASHITA JJT, BUDHU A, FORGUES M, JIA HL, LI C, DENG C, WAUTHIER E, REID LM, YE QH. Identification of microRNA-181 by genome-wide screening as a critical player in EpCAM-positive hepatic cancer stem cells. *Hepatology* 2009; 50: 472–480.
- YI R, QIN Y, MACARA IG, CULLEN BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNA and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 2003; 17: 3011-3016.
- YU Y, WANG Y, TSUYADA A, REN X, WU X, STUBBLEFIELD K, RANKIN-GEE EK, WANG SE. Transforming growth factor-beta regulates the sphere-initiating stem cell-like feature in breast cancer through miRNA-181 and ATM. *Oncogene* 2011; 30: 1470–1480.

- XIANG C, CUI S, KE Y. MiR-144 Inhibits Cell Proliferation of Renal Cell Carcinoma by Targeting MTOR. *J Huazhong Univ Sci Technol.* 2016; 36: 186-192.
- XU N, ZHANG J, SHEN C et al: Cisplatin-induced downregulation of miR-199a-5p increases drug resistance by activating autophagy in HCC cell. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 423(4): 826–31
- ZANDI-NEJAD K, LUYCKX VA, BRENNER BM. Adult hypertension and kidney disease: the role of fetal programming. *Hypertension.* 2006; 47: 502-508.
- ZHAO Y, Srivastava D. A developmental view of microRNA function. *Trends in Biochemical Sciences* 2008; 32(4): 189-197.
- ZEMAN FJ. Effects of maternal protein restriction on the kidney of the newborn young of rats. *J Nutr.* 1968; 94: 111-116.
- ZHANG H, KOLB FA, JASKIEWICZ L, WESTHOF E, FILIPOWICZ W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 2004; 118:57-68.
- ZHDANOVA O, SRIVASTAVA S, DI L, LI Z, TCHELEBI L, DWORKIN S, JOHNSTONE DB, ZAVADIL J, CHONG MM, LITTMAN DR, HOLZMAN LB, BARISONI L, SKOLNIK EY. The inducible deletion of Drosha and microRNAs in mature podocytes results in a collapsing glomerulopathy. *Kidney Int.* 2011; 80: 719-730.
- ZHU W, CHEN G, SHI D, LV L, ZHANG C, LIU P, HU W. MicroRNA-181 a sensitizes human malignant glioma U87MG cells to radiation by targeting Bcl-2. *Oncol. Rep.* 2010; 23: 997–1003.



## VIII. ANEXO

## Anexo 1



## *Certificado*

Certificamos que o Protocolo nº 446-CEUA, sobre “Estudo comparativo dos efeitos da restrição proteica *in útero* e da exposição à dexametasona *in vitro* durante a nefrogênese: avaliação da expressão gênica, proteica e morfométrica no mesênquima metanefrogênico”, sob a responsabilidade de **Patrícia Aline Boer**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado “*Ad referendum*” da **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**, nesta data.

Botucatu, 28 de junho de 2013.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Wellerson Scarano".

**Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano**  
Presidente da CEUA

## Anexo 2

**Tabela 5:** Conjunto de listas de miRNAs diferencialmente expressos em diferentes comparações ( $p < 0.05$ ).

GRUPO DE COMPARAÇÃO		
NP (21DG) vs. LP (21DG)	NP (7DPN) vs. LP (7DPN)	NP (17 DG) vs. LP (17DG)
rno-mir-10b	rno-mir-10b	rno-mir-199a
rno-let-7f-2	rno-mir-151	rno-mir-181a-2
rno-mir-19b-1	rno-mir-214	rno-miR-136-3p
rno-mir-152	rno-miR-298-5p	rno-let-7g-5p
rno-mir-149	rno-mir-148a	rno-mir-181a-2
rno-miR-326-3p	rno-mir-143	rno-mir-298
rno-miR-615	rno-mir-351-1	rno-miR-144-3p
rno-let-7f-5p	rno-miR-1249	rno-miR-298-5p
rno-mir-298	rno-mir-10b	rno-mir-541
rno-let-7i	rno-mir-92a-1	rno-mir-351-2
rno-mir-196b-2	rno-mir-351-2	rno-mir-127
rno-mir-127	rno-mir-504	rno-mir-374
rno-let-7g-5p	rno-mir-30d	rno-miR-183-5p
rno-let-7e-3p	rno-mir-181a-1	rno-miR-181d-5p
rno-miR-127-3p	rno-mir-181b-2	rno-mir-127
rno-miR-98-5p	rno-miR-181a-5p	rno-miR-455-3p
rno-miR-103-3p	rno-mir-92a-1	rno-mir-181b-1
rno-mir-423	rno-mir-143	rno-mir-130b
rno-miR-451-5p	rno-miR-199a-3p	rno-mir-181a-2
rno-mir-196b-2	rno-mir-222	rno-miR-320-3p
rno-mir-103-1	rno-miR-125a-5p	rno-miR-376b-3p
	rno-miR-486	rno-mir-451
	rno-miR-26b-5p	rno-miR-151-3p
	rno-mir-328a	rno-mir-341
	rno-mir-351-1	rno-miR-181c-3p
	rno-mir-30d	rno-mir-451
	rno-miR-143-3p	rno-mir-214
	rno-mir-196b-2	rno-mir-144
	rno-mir-99b	rno-mir-148b
	rno-mir-92a-1	rno-mir-351-2
	rno-let-7i	rno-mir-130b
	rno-mir-214	rno-mir-541
	rno-mir-205	rno-miR-195-3p
	rno-mir-151	rno-mir-10a
	rno-mir-214	rno-miR-1298
	rno-mir-125a	rno-miR-92b-3p
	rno-miR-151-3p	rno-mir-146a

	rno-let-7a-5p rno-mir-148a rno-miR-148a-3p rno-mir-125a rno-mir-125a rno-miR-125b-5p rno-mir-143 rno-mir-30c-1 rno-mir-30d rno-mir-9a-2 rno-mir-423 rno-mir-484 rno-mir-10b rno-mir-92a-2 rno-mir-486 rno-mir-23a rno-miR-196b-5p rno-mir-148b rno-let-7e rno-miR-17-1-3p rno-mir-196b-1 rno-let-7b rno-mir-322-1 rno-mir-196a rno-mir-351-1 rno-mir-10a rno-mir-298 rno-mir-351-2 rno-mir-542-3 rno-mir-351-1 rno-mir-9a-1 rno-miR-146b-5p rno-let-7i rno-mir-10a rno-miR-149-5p rno-mir-181a-1 rno-mir-26b	rno-mir-504 rno-let-7b-5p rno-let-7f-5p rno-mir-125a rno-miR-410-3p rno-miR-541-5p rno-mir-140
<b>GRUPO DE COMPARAÇÃO</b>		
<b>NP (21DG) vs. NP (7DPN)</b>	<b>NP (21DG) vs. NP (17DG)</b>	<b>NP (7DPN) vs. NP (17DG)</b>
rno-miR-192-5p rno-mir-192 rno-miR-298-5p	rno-mir-30a rno-miR-192-5p rno-mir-10a	rno-miR-192-5p rno-mir-30a rno-mir-192

rno-let-7i-5p	rno-mir-30a	rno-miR-22-3p
rno-mir-192	rno-mir-23b	rno-miR-298-5p
rno-mir-181a-2	rno-miR-298-5p	rno-mir-92a-2
rno-mir-30d	rno-let-7c-5p	rno-mir-30a
rno-mir-181a-1	rno-let-7b-5p	rno-mir-143
rno-mir-298	rno-mir-143	rno-miR-30c-5p
rno-mir-30a	rno-mir-143	rno-mir-181a-1
rno-mir-30a	rno-miR-30a-5p	rno-mir-143
rno-miR-194-5p	rno-let-7g-5p	rno-miR-30a-5p
rno-miR-181a-5p	rno-mir-10a	rno-mir-30a
rno-mir-192	rno-mir-30a	rno-mir-92a-1
rno-mir-130b	rno-mir-92a-1	rno-mir-298
rno-mir-182	rno-mir-26b	rno-mir-182
rno-miR-98-5p	rno-miR-22-3p	rno-miR-182
rno-miR-30c-5p	rno-mir-23b	rno-mir-92a-2
rno-mir-143	rno-miR-27b-3p	rno-mir-192
rno-mir-92a-2	rno-mir-27b	rno-mir-143
rno-miR-181c-5p	rno-miR-30c-5p	rno-mir-181a-2
rno-mir-21	rno-mir-23b	rno-miR-143-3p
rno-mir-192	rno-let-7a-5p	rno-miR-181a-5p
rno-mir-143	rno-miR-26a-5p	rno-mir-30d
rno-miR-182	rno-mir-92a-2	rno-miR-181c-5p
rno-miR-143-3p	rno-miR-375-3p	rno-mir-182
rno-mir-181a-1	rno-miR-98-5p	rno-miR-194-5p
rno-miR-30d-5p	rno-miR-181c-5p	rno-mir-27b
rno-mir-92a-1	rno-mir-182	rno-mir-192
rno-mir-30e	rno-mir-378a	rno-mir-10a
rno-mir-10b	rno-mir-92a-1	rno-mir-199a
rno-miR-22-3p	rno-mir-30a	rno-mir-421
rno-mir-92a-1	rno-let-7f-1	rno-mir-130b
rno-mir-10a	rno-mir-421	rno-mir-130b
rno-mir-186	rno-let-7f-5p	rno-miR-130b-5p
rno-miR-130b-5p	rno-let-7f-2	rno-let-7f-1
rno-mir-143	rno-miR-182	rno-mir-92a-1
rno-mir-351-1	rno-let-7i-5p	rno-let-7b-5p
rno-miR-17-5p	rno-mir-10a	rno-mir-30c-2
rno-mir-27b	rno-let-7i	rno-miR-30b-5p
rno-miR-196a-5p	rno-mir-92a-2	rno-miR-21-5p
rno-mir-192	rno-mir-143	rno-mir-183
rno-miR-9a-5p	rno-mir-181a-1	rno-miR-378a-3p
rno-mir-181b-2	rno-mir-183	rno-mir-298
rno-miR-130b-3p	rno-miR-181a-5p	rno-let-7b
rno-mir-451	rno-mir-92a-1	rno-mir-23b
rno-mir-143	rno-mir-298	rno-miR-17-5p
rno-mir-130b	rno-miR-378a-3p	rno-mir-23b
rno-miR-335	rno-mir-10a	rno-mir-181a-1

rno-mir-181c	rno-let-7a-1	rno-mir-10b
rno-mir-298	rno-mir-192	rno-mir-21
rno-mir-10b	rno-let-7i	rno-miR-92a-1-5p
rno-mir-17-1	rno-mir-10a	rno-miR-335
rno-mir-130b	rno-mir-199a	rno-miR-130b-3p
rno-mir-335	rno-mir-676	rno-mir-199a
rno-miR-30a-5p	rno-mir-151	rno-let-7f-2
rno-miR-30b-5p	rno-mir-92a-1	rno-mir-92a-1
rno-mir-30d	rno-mir-192	rno-let-7g-5p
rno-miR-145-5p	rno-mir-351-2	rno-mir-181a-2
rno-miR-25-3p	rno-miR-411-5p	rno-mir-192
rno-mir-182	rno-miR-143-3p	rno-mir-30d
rno-mir-181a-2	rno-mir-182	rno-mir-143
rno-miR-23a-3p	rno-mir-298	rno-mir-10b
rno-let-7b	rno-miR-130b-5p	rno-miR-181c-3p
rno-mir-10a	rno-let-7g	rno-miR-196a-5p
rno-mir-10b	rno-let-7c-1	rno-let-7a-1
rno-mir-92a-2	rno-miR-25-3p	rno-let-7g
rno-mir-30e	rno-let-7d-5p	rno-let-7a-2
rno-miR-21-5p	rno-mir-322-1	rno-let-7b
rno-mir-181d	rno-mir-30d	rno-mir-335
rno-mir-30c-1	rno-miR-23b-3p	rno-mir-17-1
rno-miR-340-5p	rno-miR-194-5p	rno-miR-30d-5p
rno-mir-30c-2	rno-miR-410-3p	rno-mir-181b-2
rno-miR-150-5p	rno-miR-30b-5p	rno-mir-30e
rno-mir-126a	rno-mir-181a-2	rno-miR-25-3p
rno-mir-181a-2	rno-mir-27b	rno-mir-26b
rno-miR-92a-3p	rno-miR-21-5p	rno-mir-92a-1
rno-mir-182	rno-mir-411	rno-miR-541-5p
rno-miR-378a-3p	rno-mir-351-2	rno-miR-23b-3p
rno-mir-125a	rno-miR-541-5p	rno-miR-199a-3p
rno-mir-10a	rno-let-7d	rno-mir-30c-1
rno-mir-378a	rno-miR-99b-5p	rno-mir-30e
rno-mir-101a	rno-let-7a-2	rno-mir-23b
rno-miR-92a-1-5p	rno-miR-30a-3p	rno-let-7c-2
rno-mir-126a	rno-mir-181c	rno-mir-10a
rno-let-7i	rno-mir-99b	rno-mir-30d
rno-miR-23b-3p	rno-mir-30a	rno-mir-192
rno-mir-181a-2	rno-mir-351-2	rno-mir-30e
rno-mir-200a	rno-miR-125a-5p	rno-let-7i
rno-miR-20a-5p	rno-mir-92a-2	rno-mir-151
rno-miR-200a-3p	rno-mir-30c-2	rno-mir-92a-2
rno-let-7a-2	rno-miR-125b-5p	rno-mir-182
rno-mir-351-1	rno-miR-92a-1-5p	rno-miR-200a-3p
rno-mir-181a-2	rno-mir-181a-2	rno-mir-130b
rno-mir-183	rno-mir-21	rno-let-7c-1

<p>rno-mir-125a  rno-mir-92a-1  rno-mir-181b-1  rno-mir-351-2  rno-miR-126a-3p  rno-mir-92a-1  rno-mir-181a-1</p>	<p>rno-mir-431  rno-miR-423-3p  rno-mir-92a-1  rno-miR-199a-3p  rno-miR-34c-5p  rno-miR-199a-5p  rno-miR-130b-3p  rno-mir-10a  rno-mir-322-2  rno-miR-146a-5p  rno-mir-181a-1  rno-let-7e-5p  rno-mir-30d  rno-mir-541  rno-miR-136-3p  rno-mir-130b  rno-mir-351-1  rno-mir-27a  rno-mir-17-1  rno-mir-351-1  rno-mir-10b  rno-mir-30a  rno-mir-351-1  rno-mir-322-2  rno-mir-199a  rno-mir-30c-1  rno-miR-221-3p  rno-miR-335  rno-mir-199a  rno-mir-10a  rno-miR-191a-5p  rno-miR-322-5p  rno-miR-18a-5p  rno-mir-335  rno-mir-199a  rno-mir-200b  rno-mir-423  rno-mir-130b  rno-miR-484  rno-let-7g  rno-mir-351-2  rno-miR-30c-2-3p  rno-miR-30d-5p  rno-mir-183  rno-mir-93  rno-mir-30e</p>	<p>rno-mir-351-1  rno-mir-10a  rno-mir-10a  rno-let-7c-5p  rno-mir-218a-1  rno-mir-10b  rno-miR-145-5p  rno-mir-183  rno-miR-125b-1-3p  rno-mir-93  rno-miR-150-5p  rno-mir-92a-1  rno-mir-99b  rno-mir-92a-1  rno-mir-125a  rno-mir-218a-2  rno-mir-181c  rno-miR-27b-3p  rno-let-7f-5p  rno-mir-126a  rno-miR-183-5p  rno-miR-34c-5p  rno-mir-30a  rno-miR-30a-3p  rno-miR-23a-3p  rno-miR-301b-3p  rno-mir-378a  rno-mir-322-1  rno-mir-21  rno-mir-676  rno-mir-181b-1  rno-let-7g  rno-miR-20a-5p  rno-miR-9a-5p  rno-let-7d  rno-miR-26b-5p  rno-mir-196a  rno-mir-351-2  rno-mir-92a-1  rno-miR-126a-3p  rno-mir-378a  rno-mir-21  rno-mir-301a  rno-miR-92a-3p  rno-mir-429  rno-mir-101a</p>
---	---	---

	<p> rno-mir-181b-2  rno-miR-125b-2-3p  rno-mir-10b  rno-mir-125b-1  rno-mir-26b  rno-mir-92a-2  rno-mir-21  rno-miR-125b-1-3p  rno-mir-301a  rno-let-7e  rno-mir-199a  rno-mir-200a  rno-mir-423  rno-mir-205  rno-miR-19b-3p  rno-miR-26b-5p  rno-mir-222  rno-miR-99a-5p  rno-miR-205  rno-mir-28  rno-mir-30d  rno-miR-17-5p  rno-miR-204-5p  rno-mir-181c  rno-mir-196a  rno-mir-10b  rno-mir-351-1  rno-miR-196a-5p  rno-mir-130b  rno-mir-10a  rno-miR-200a-3p  rno-mir-322-1  rno-miR-145-5p  rno-miR-183-5p  rno-mir-181a-2  rno-mir-126a  rno-mir-30d  rno-mir-93  rno-mir-99b  rno-mir-10a  rno-miR-301b-3p  rno-mir-429  rno-mir-143  rno-mir-542-3  rno-mir-298  rno-miR-429 </p>	<p> rno-mir-143  rno-miR-26a-5p  rno-miR-221-3p  rno-mir-20a  rno-miR-199a-5p  rno-mir-100  rno-let-7e  rno-mir-186  rno-mir-181c  rno-mir-148b  rno-let-7i-5p  rno-miR-19b-3p  rno-mir-27b  rno-mir-322-2  rno-mir-199a  rno-mir-27a  rno-mir-125a  rno-miR-130a-3p  rno-miR-351-5p  rno-mir-10b  rno-mir-199a  rno-miR-106b-5p  rno-mir-181d  rno-mir-199a  rno-mir-351-2  rno-mir-101a  rno-mir-200b  rno-mir-148a  rno-let-7d-3p  rno-miR-28-5p  rno-mir-351-1  rno-mir-30d  rno-mir-451  rno-mir-28  rno-mir-30a  rno-mir-181c  rno-mir-351-1  rno-miR-322-5p  rno-mir-351-1  rno-mir-141  rno-mir-411  rno-mir-181a-2  rno-mir-27a  rno-mir-486  rno-miR-93-5p  rno-mir-425 </p>
--	---	--

		<p>rno-mir-26b rno-let-7a-5p rno-mir-205 rno-miR-872-5p rno-mir-351-2 rno-mir-125a rno-miR-204-5p rno-miR-27a-3p rno-mir-181a-1 rno-mir-30d rno-mir-199a rno-miR-218a-5p rno-let-7i rno-miR-191a-5p rno-miR-181b-5p rno-mir-199a rno-miR-340-5p rno-mir-182 rno-miR-429 rno-miR-125b-2-3p rno-mir-181d rno-miR-146a-5p rno-mir-196a</p>
--	--	---

### Anexo 3

**Tabela 6:** Funções e redes envolvidas nos miRNAs diferencialmente expressos da comparação entre controle a vs controle b.

<b>Top Molecular and Cellular Functions</b>				
Cellular Development				
Cellular Growth and Proliferation				
Cellular Movement				
Cell Cycle				
Cell Death and Survival				
<b>Top Networks (Score)</b>				
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities, Reproductive System Disease (57)				
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities, Reproductive System Disease (33)				
Cancer, Hematological Disease, Immunological Disease (17)				
<b>Top 10 highly expressed miRNAs</b>				
miR-192-5p	miR-298-5p	miR-130a-3p	let-7a-5p	miR-182-5p
miR-181a-5p	miR-30c-5p	miR-194-5p	miR-143-3p	miR-21-5p

**Tabela 7:** Funções e redes envolvidas nos miRNAs diferencialmente expressos da comparação entre controle a vs tratado a.

<b>Top Molecular and Cellular Functions</b>				
Cellular Development				
Cellular Growth and Proliferation				
Cellular Movement				
Cell Cycle				
Cell Death and Survival				
<b>Top Networks (Score)</b>				
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities, Reproductive System Disease (54)				
Organismal Injury and Abnormalities, Reproductive System Disease, Cancer (48)				
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities, Reproductive System Disease (24)				
Endocrine System Disorders, Gastrointestinal Disease, Metabolic Disease (24)				
Connective tissue Disorders, Inflammatory Disease, Inflammatory Response (22)				
<b>Top 10 highly expressed miRNAs</b>				
miR-10b-5p	miR-148a-3p	miR-330-5p	miR-615-5p	let-7a-5p
miR-298-5p	miR-127-3p	let-7e-3p	miR-103-3p	miR-423-3p

**Tabela 8:** Funções e redes envolvidas nos miRNAs diferencialmente expressos da comparação entre controle a vs controle c.

<b>Top Molecular and Cellular Functions</b>				
Cellular Development				
Cellular Growth and Proliferation				
Cellular Movement				
Cell Cycle				
Cell Death and Survival				
<b>Top Networks (Score)</b>				
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities, Reproductive System Disease (62)				
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities, Reproductive System Disease (37)				
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities, Reproductive System Disease (29)				
Cancer, Gastrointestinal Disease, Organismal Injury and Abnormalities (5)				
<b>Top 10 highly expressed miRNAs</b>				
miR-30c-5p	miR-192-5p	miR-10a-5p	miR-23a-3p	miR-298-5p
let-7a-5p	miR-143-3p	miR-26a-5p	miR-22-3p	miR-27a-3p

**Tabela 9:** Funções e redes envolvidas nos miRNAs diferencialmente expressos da comparação entre controle b vs controle c.

<b>Top Molecular and Cellular Functions</b>				
Cellular Development				
Cellular Growth and Proliferation				
Cellular Movement				
Cell Cycle				
Cell Death and Survival				
<b>Top Networks (Score)</b>				
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities, Reproductive System Disease (67)				
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities, Reproductive System Disease (31)				
Organismal Injury and Abnormalities, Reproductive System Disease, Cancer (21)				
Cancer, Hematological Disease, Immunological Disease (10)				
<b>Top 10 highly expressed miRNAs</b>				
miR-192-5p	miR-30c-5p	miR-22-3p	miR-298-5p	miR-143-3p
miR-182-5p	miR-181a-5p	miR-194-5p	miR-27a-3p	miR-10a-5p

**Tabela 10:** Funções e redes envolvidas nos miRNAs diferencialmente expressos da comparação entre controle b vs tratado b.

<b>Top Molecular and Cellular Functions</b>				
Cellular Development				
Cellular Growth and Proliferation				
Cell Cycle				
Cellular Movement				
Cell Death and Survival				
<b>Top Networks (Score)</b>				
Cancer, Gastrointestinal Disease, Organismal Injury and Abnormalities (28)				
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities, Reproductive System Disease (23)				
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities, Respiratory Disease (10)				
<b>Top 10 highly expressed miRNAs</b>				
miR-10b-5p	miR-214-3p	miR-298-5p	miR-143-3p	miR-1249-3p
miR-504-5p	miR-30c-5p	miR-181a-5p	miR-199a-3p	miR-221-3p

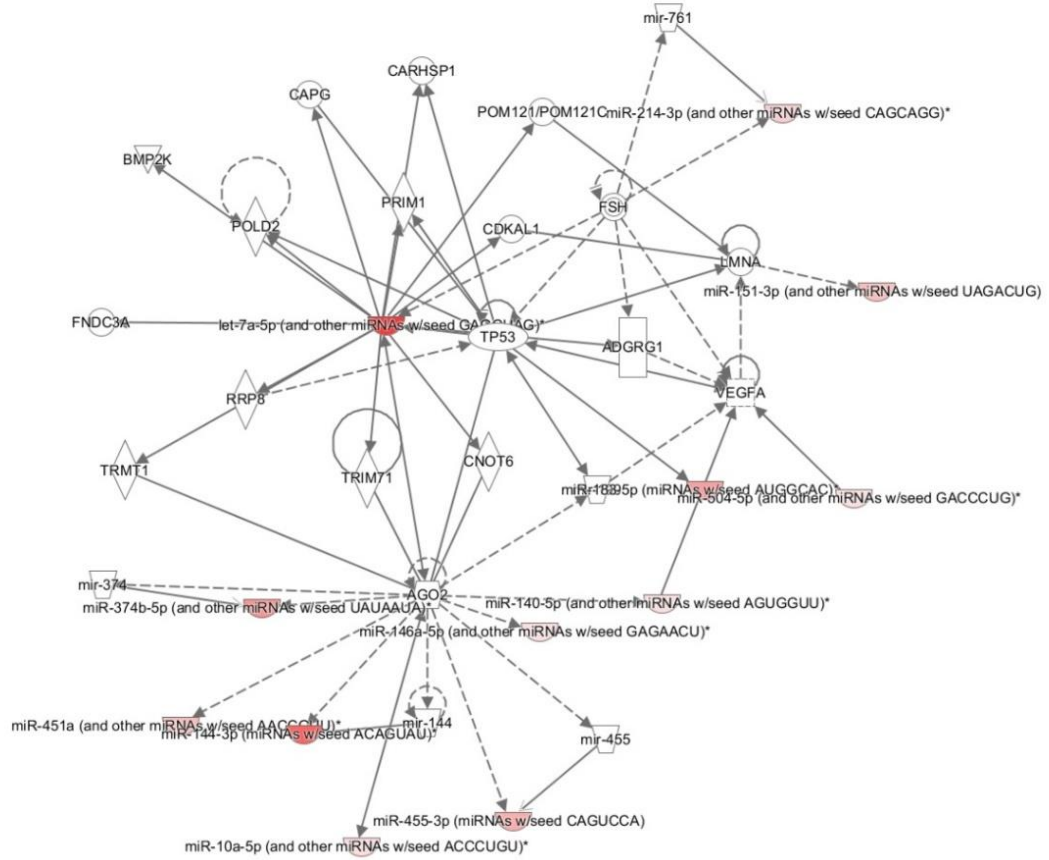
**Tabela 11:** Funções e redes envolvidas nos miRNAs diferencialmente expressos da comparação entre controle c vs tratado c.

<b>Top Molecular and Cellular Functions</b>				
Cellular Development				
Cellular Growth and Proliferation				
DNA Replication, Recombination, and Repair				
Cell Cycle				
Cellular Movement				
<b>Top Networks (Score)</b>				
Organismal Injury and Abnormalities, Reproductive System Disease, Cancer (28)				
Cancer, Gastrointestinal Disease, Organismal Injury and Abnormalities (28)				
<b>Top 10 highly expressed miRNAs</b>				
miR-199a-5p	miR-136-3p	let-7a-5p	miR-298-5p	miR-144-3p
miR-541-5p	miR-127-3p	miR-374b-5p	miR-183-5p	miR-181a-5p

**A= 21 DG   B= 7 DPN   C= 17 DG**

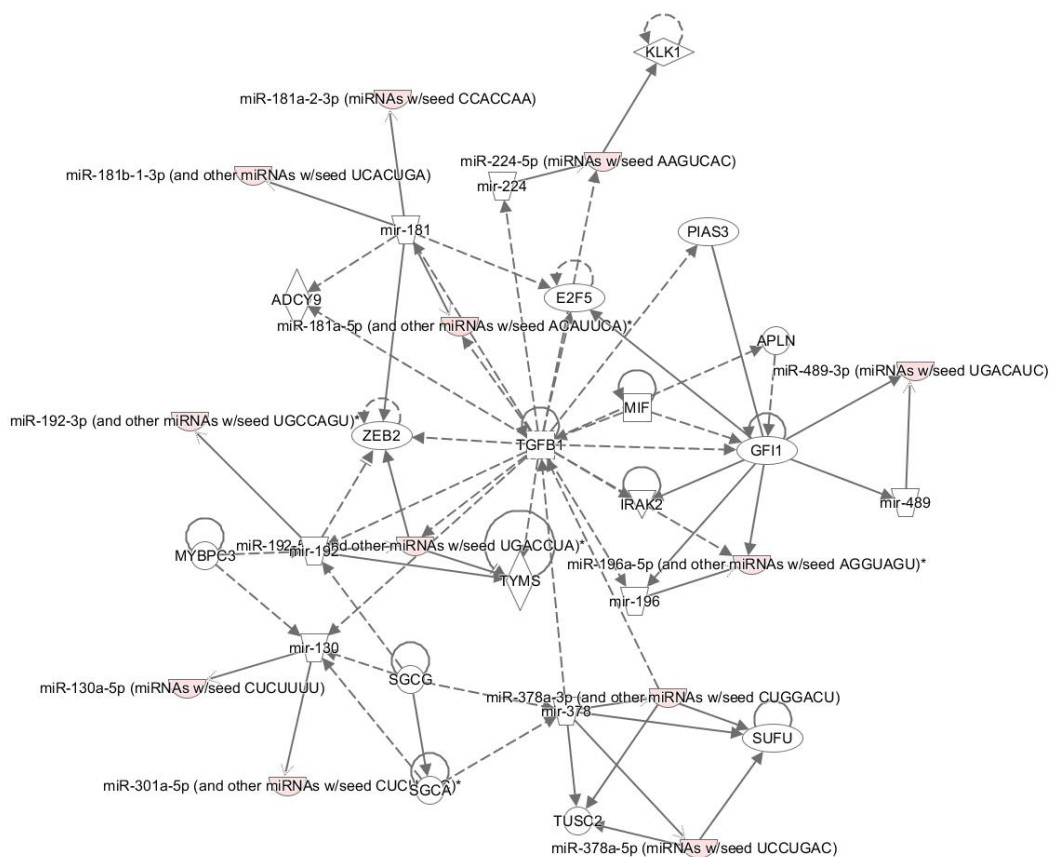


Network 2 : control c vs treatment c clean p0.05- 2015-11-23 01:37 PM : control c vs treatment c clean : control c vs treatment c clean p0.05- 2015-11-23 01:37 PM













## Anexo 7

**Tabela 13.** Lista dos microRNAs e mRNA alvo que foram validados por RT-qPCR.

microRNA	Literatura	miRTarBase	Ingenuity
<b>miR-127-3p</b>	Ativa proliferação e diferenciação (Ren e Li, 2016)	SETD8 <b>PRDM1</b> MAPK4 <b>BCL6</b>	INSR IGF1R <b>TP53</b> <b>PRDM1</b> <b>Map2k2</b>
<b>let-7a-5p</b>	Manutenção de stem cel e da proliferação (Peter, 2009). Liga-se ao mRNA de TGFβR1 e Lin 28B reprimindo sua expressão (Lee et al., 2015)	<b>c-myc</b> <b>PRDM1</b> <b>BCL2</b> CKD6	CDKAL1 <b>PRDM1</b> BMP2K MAP2K1/2 <b>BCL2L11</b> <b>CASP3</b>
<b>miR-199a-5p</b>	Ativa a via <b>WNT</b> regulando diferenciação do nefro e dos vasos renais (Nakagawa et al., 2015). Sua inibição reduz proliferação celular em rim (Sun et al., 2015)	Met <b>IGF1</b> <b>VEGF</b> NFKb1 SNAL1 WNT2 SMAD1 MAPK1 CD44	<b>SMAD2/3</b> NFATC2 <b>BCL2</b> MAP2K1/2 AGO2
<b>miR-298-5p</b>	Liga-se ao mRNA de IGF1Rβ e TNFα reprimindo sua expressão (Barbagallo et al., 2013)	IGF1R <b>CDKN1A</b> TNF <b>BAX</b>	<b>SMAD2/3</b> BACE1
<b>miR-144-3p</b>	Inibe proliferação mantendo as células em G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> (Huang et al, 2016)	<b>NOTCH1</b> <b>TGFB1</b> <b>mTOR</b> GATA2 PRKAA1	AGO2 ABCA1
<b>miR-181a-5p</b>	Liga-se a região 3' –UTR do c-Met reduzindo sua ativação. c-Met estimula a ramificação do BU determinando o número de nefros (Karihaloo et al., 2009; Korhan et al., 2014)	<b>BCL2</b> <b>Bcl2L11 (Bim)</b> HOXA <b>PROX1</b>	<b>TGFβ-1</b> <b>SMAD2/3</b> CDKN1B RNA POL III AGO
<b>miR-181c-3p</b>	Liga-se a <b>Six2</b> reduzindo sua expressão, levando à apoptose, perda do fenótipo de progenitora e supressão da proliferação (Lv, 2014)	NOTCH2 NOTCH4 <b>BCL-2</b> TNF KRAS TRIM2	

\*genes e miRNAs em negritos significa que foram validados por RT-qPCR, e em vermelho os primers correspondente aos genes que não funcionaram.