Lucas Carminatti Pantaleão

**REPROGRAMAÇÃO FENOTÍPICA POR EXCESSO DE
GLICOCORTICOIDES: PARTICIPAÇÃO DE MICRO-RNAS NO
DESENVOLVIMENTO HEPÁTICO E POSSÍVEIS REPERCUSSÕES NA VIDA
ADULTA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2014

Lucas Carminatti Pantaleão

**REPROGRAMAÇÃO FENOTÍPICA POR EXCESSO DE
GLICOCORTICOIDES: PARTICIPAÇÃO DE MICRO-RNAS NO
DESENVOLVIMENTO HEPÁTICO E POSSÍVEIS REPERCUSSÕES NA VIDA
ADULTA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Profa. Dra. Silvana Auxiliadora Bordin
da Silva

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Pantaleão, Lucas Carminatti.

Reprogramação fenotípica por excesso de glicocorticoides: participação de micro-RNAs no desenvolvimento hepático e possíveis repercussões na vida adulta / Lucas Carminatti Pantaleão. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Silvana Auxiliadora Bordin da Silva.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Perfil de expressão e ação de microRNAs no tecido hepático.

Versão do título para o inglês: Programming by glucocorticoid excess: actions of miRNAs on hepatic development and outcome.

1. Dexametasona 2. Fígado 3. Neonatos 4. MiR-322-5P/424-5P 5. Desenvolvimento 6. Proliferação I. Silva, Profa. Dra. Silvana Auxiliadora Bordin da II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0203/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Lucas Carminatti Pantaleão.

Título da Tese: Reprogramação fenotípica por excesso de glicocorticoides: participação de micro-RNAs no desenvolvimento hepático e possíveis repercussões na vida adulta.

Orientador(a): Profa. Dra. Silvana Auxiliadora Bordin da Silva.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **014** nas fls. **99** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Silvana Auxiliadora Bordin da Silva**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "*Adaptações metabólicas induzidas por glicocorticóides na gestação*" do qual participam o(s) alunos **Lucas Carminatti Pantaleão, Patricia Rodrigues Lourenço Gomes, Sandra Campos Rodrigues** e os pesquisadores **Camilo de Lellis Santos, Fernanda Gaspar do Amaral**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **14.03.2011**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 22 de março de 2011.

Prof.Dr.WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **100** nas fls. **23** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Silvana Auxiliadora Bordin da Silva**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Adaptações metabólicas induzidas por glicocorticóide na gestação*" do qual participam o(s) aluno(s) **Patricia Rodrigues Lourenço Gomes, Lucas Carminati Pantaleão, Sandra Campos Rodrigues**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **10.11.2014**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 12 de novembro de 2014.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador- CEUA- ICB/USP

Prof. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

*Dedico essa conquista a todos que, ao longo desses anos, ajudaram a transformar a vida em uma obra de arte. Dedico esse momento a **você**, que comigo já dividiu um momento, um abraço, um beijo ou uma lágrima... e que me fez sentir, simplesmente sentir...*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Professora Silvana Bordin pela orientação e amizade.

Agradeço à Professora Susan Ozanne e aos meus colegas de trabalho do FICEMOL (USP) e do IMS (*University of Cambridge*), pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas a mim concedidas e pelo auxílio financeiro para desenvolvimento das atividades descritas nesta tese.

Agradeço também aos funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas da USP e do *Medical Research Centre* da *University of Cambridge*.

Finalmente, agradeço aos meus familiares e amigos, pelos grandes momentos vividos nos últimos quatro anos.

"Lo difícil no es ganar dinero. Lo difícil es ganarlo haciendo algo a lo que valga la pena dedicarle la vida."

Carlos Ruiz Zafón

RESUMO

PANTALEÃO, L. C. **Reprogramação fenotípica por excesso de glicocorticoides: Participação de micro-RNAs no desenvolvimento hepático e possíveis repercussões na vida adulta.** 2014. 124 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Apesar do reconhecido papel dos miRNAs para o estabelecimento do fenótipo no *diabetes mellitus* e na síndrome metabólica, ainda não há registro dos efeitos da restrição do crescimento intrauterino (RCIU) sobre a reprogramação da expressão desses transcritos em tecidos metabolicamente ativos. Este trabalho teve como objetivo inicial avaliar o efeito da RCIU induzida por administração pré-natal de glicocorticoides sobre a regulação da expressão de miRNAs no fígado de ratos albinos. Para tanto, foram utilizados ratos neonatos, lactantes e adultos expostos a dexametasona (DEX) no 3º período de gestação. Animais expostos intrauterinamente à dexametasona apresentaram menor peso ao nascer e fígados relativamente menores dos que os observados em animais controle, resultado acompanhado por menores concentrações hepáticas de PCNA, importante indicativo de redução na taxa de proliferação. Em longo prazo, detectamos que os animais DEX desenvolveram distúrbios metabólicos caracterizados por intolerância à glicose e maior potencial gliconeogênico no desmame e na vida adulta. Ao avaliarmos o perfil de miRNAs no fígado, detectamos aumento da expressão de todo o cluster do miR-322 no período perinatal, com menor conteúdo de alvos preditos desses transcritos (AKT3, CCND1 e INSR). Pudemos demonstrar que a superexposição ao miR-322-5P reduz a taxa de proliferação em linhagens celulares de hepatocarcinoma, diminuindo também a expressão dos alvos previamente observados no fígado dos animais estudados. Com esses resultados, propomos um *link* entre a expressão aberrante do miR-322-5P e a reduzida taxa de proliferação detectada no tecido hepático em desenvolvimento, o que pode contribuir para o estabelecimento do fenótipo em longo prazo.

Palavras-chave: Dexametasona. Fígado. Neonatos. MiR-322-5P/424-5P. Desenvolvimento. Proliferação.

ABSTRACT

PANTALEÃO, L. C. **Programming by glucocorticoid excess: Actions of miRNAs on hepatic development and outcome.** 2014. 124 p. [Ph. D. thesis (Human Physiology)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Despite the known role of miRNAs for the establishment of metabolic syndrome, there are no known reports on miRNAs expression programming by an intrauterine growth restriction (IUGR). Therefore, this thesis initially aimed to evaluate the effects of glucocorticoid induced IUGR on the expression of miRNA on Wistar rat livers. We studied newborn, weaning and adult rats exposed to dexamethasone during the third gestational week. Dexamethasone (DEX) treated animals were lighter and had smaller liver weight:body weight ratio when compared to control animals. Furthermore, liver PCNA expression was downregulated, suggesting a reduction on cell proliferation rate. In the long term, DEX animals developed metabolic disturbances characterized by glucose intolerance e increased gluconeogenesis in a fast state. The analysis of miRNA expression profile showed an upregulation of the miR-322 cluster on the perinatal period, together with a downregulation of three putative targets: Akt3, CCND1 and INSR. Later, we used in vitro studies to prove that overexpression of miR-322-5P arrests cell cycle and impairs proliferation of HEPG2 cells as well as it downregulates the predicted targets. Based on this data, we suggest a link between overexpression of miR-322-5P and impaired proliferation rate on the developing liver, which affects the phenotype in the long term.

Keywords: Dexamethasone. Liver. Newborn rats. MiR-322-5P/424-5P. Development. Proliferation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema simplificado da síntese e processamento dos miRNA de mamíferos.....	29
Figura 2 – Exemplo do Cluster do miR-35-41 em <i>C. Elegans</i> previsto computacionalmente usando o software RNAfold	30
Figura 3 – Tratamento com dexametasona reduz o ganho de massa corporal em ratas prenhes.....	46
Figura 4 – Prole de ratas tratadas com dexametasona durante a gestação exibe menor massa corporal.....	47
Figura 5 – Animais submetidos à restrição do crescimento intrauterino por excesso de glicocorticoides não exibem <i>catch up growth</i>	47
Figura 6 – Animais submetidos à restrição do crescimento intrauterino por excesso de glicocorticoides apresentam menores concentrações de glicose e de triacilgliceróis ao nascer.....	48
Figura 7 – Ratos nascidos com baixo peso são intolerantes à glicose no período do desmame	49
Figura 8 – Ratos que apresentam baixo peso ao nascer não exibem resistência à insulina no período do desmame	50
Figura 9 – Ratos nascidos com baixo peso têm maior potencial gliconeogênico no desmame	51
Figura 10 – Ratos nascidos com baixo peso são intolerantes à glicose na vida adulta	52
Figura 11 – Ratos que apresentam baixo peso ao nascer não exibem resistência à insulina na vida adulta	52
Figura 12 – Ratos nascidos com baixo peso mantém o maior potencial gliconeogênico quando adultos.....	53
Figura 13 – Animais DEX apresentam maiores concentrações de corticosterona plasmática na vida adulta	53
Figura 14 – Potencial de secreção de insulina por ilhotas pancreáticas isoladas de ratos adultos não é afetado pelo tratamento precoce com dexametasona.	54
Figura 15 – Fosforilação da Akt no fígado de ratos adultos não é afetada pela exposição à dexametasona durante a gestação	55
Figura 16 – Expressão da PEPCK no fígado é aumentada no jejum de ratos expostos à dexametasona durante a gestação	56

Figura 17 – Exposição ao excesso de glicocorticoides sintéticos durante último terço da gestação afeta a morfologia hepática no início da vida	57
Figura 18 – Exposição à dexametasona durante último terço da gestação provoca aumento da expressão de GR e de genes por ele regulados no fígado de ratos neonatos	58
Figura 19 – Exposição à dexametasona durante último terço da gestação afeta o conteúdo de RNAm de diversos genes envolvidos na homeostase celular, no desenvolvimento tecidual, na regulação da taxa de proliferação de hepatócitos e no metabolismo de glicocorticoides	59
Figura 20 – Exposição à dexametasona durante último terço da gestação altera o perfil de expressão de miRNAs no fígado de ratos neonatos	60
Figura 21 – Animais com restrição no crescimento intrauterino exibem maior expressão de Dicer no fígado	64
Figura 22 – <i>Cluster</i> do miR-322 é regulado positivamente no fígado de ratos neonatos com RCIU	64
Figura 23 – MiR-322 é o mais expresso entre os componentes do <i>cluster</i>	65
Figura 24 – CCND1 é alvo do miR-322-5P	66
Figura 25 – Akt3 é alvo putativo do miR-322-5P	66
Figura 26 – INSR é alvo putativo do miR-322-5P	67
Figura 27 – Expressão de genes alvo do miR-322-5P é reduzida no fígado de animais DEX ao nascer	68
Figura 28 – Expressão de PCNA no fígado de ratos neonatos é reduzida com a exposição intrauterina à dexametasona	68
Figura 29 – Expressão de componetes do <i>cluster</i> do miR-322 no fígado de ratos adultos também sofre efeito da exposição precoce a glicocorticoides	69
Figura 30 – Expressão de CCND1 não é afetada pela regulação do miR-322-5P no fígado de ratos adultos	69
Figura 31 – Expressão de miR-322 expostos precocemente a glicocorticoides sofre efeito da exposição ao jejum prolongado	70
Figura 32 – Superexpressão do miR-424-5P reduz a taxa proliferativa de células HEPG2 ...	71
Figura 33 – HIF-1 α é regulada positivamente em células HEPG2 após 72 horas de transfecção com mimético do hsa-miR-424-5P	71
Figura 34 – Superexpressão do miR-424-5P regula negativamente a expressão de seus alvos preditos	72
Figura 35 – Superexpressão do miR-424-5P afeta o fenótipo celular	73

Figura 36 – Superexpressão do miR-424-5P não provoca fragmentação do DNA em células HEPG2.....	74
Figura 37 – Exposição à dexametasona e à privação de soro fetal bovino não afeta a expressão do miR-424-5P em células HEPG2	74
Figura 38 – Tratamento com dexametasona não afeta efeitos provocados pela superexpressão do miR-424-5P sobre a taxa proliferativa de células HEPG2	75
Figura A1 – Ratos nascidos com baixo peso ao nascer são hiperglicêmicos no jejum prolongado	93
Figura A2 – Animais tratados intrauterinamente com dexametasona têm menor resposta glicêmica em um teste de infusão de glicose durante o jejum prolongado	94
Figura A3 – Ratos adultos tratados intrauterinamente com dexametasona apresentam menor capacidade gliconeogênica durante o jejum prolongado	94
Figura A4 – Ratos adultos tratados intrauterinamente com dexametasona são resistentes à insulina após 60 horas de jejum.....	95
Figura A5 – Ratos adultos tratados intrauterinamente com dexametasona apresentam maiores concentrações de corticosterona após 60 horas de jejum	95
Figura A6 – Tratamento precoce com dexametasona reduz a atividade da via dos glicocorticoides no fígado de ratos adultos no jejum prolongado e ativa a ERK.....	97
Figura A7 – Tratamento precoce com dexametasona afeta o conteúdo de RNAm no fígado de animais adultos durante o jejum prolongado	98
Figura A8 - Desenho experimental	101
Figura A9 - Teste revela que amostras de RNA extraídas de fígados de animais adultos apresentam qualidade compatível com a análise do transcriptoma.....	105
Figura A10 - Enriquecimento de RNA foi efetivo nas amostras de tecido hepático	107
Figura A11 - Quantificação das <i>libraries</i> para posterior <i>pooling</i>	108
Figura A12 - Após isolamento de bandas entre 145 e 160 bp, eletroferograma apresenta fragmentos de tamanho correto, com concentração baixa.....	109
Figura A13 - Processo de concentração de <i>pool</i> de <i>libraries</i> resulta em soluções com concentração de cDNA aumentada.....	110
Figura A14 – Combinação de dieta hiperlipídica materna e pós-lactacional resulta em maior acúmulo de gordura hepática em ratos	111
Figura A15 – Imagens histológicas confirmam o acúmulo de gordura no fígado de animais OO	112

Figura A16 – Expressão de genes lipogênicos é aumentada no tecido hepático de animais provenientes de mães obesas e que receberam dieta hiperlipídica no período pós lactacional	113
Figura A17 – Exposição à dieta hiperlipídica durante a gestação e no período pós-lactacional induz a redução da expressão de ATGL no fígado de ratos adultos	114
Figura A18 – Exposição à dieta hiperlipídica durante a gestação e no período pós-lactacional induz a redução da expressão de PEPCK, mas não afeta a expressão de componentes da via de sinalização à insulina no fígado de ratos adultos.....	115
Figura A19 – Dieta hiperlipídica em diferentes etapas da vida afetam a expressão e a fosforilação de GS3K	116
Figura A20 – Concentração de glicogênio hepático não é afetada pelas diferentes dietas em animais jejuados por 12 horas	117
Figura A21 – Dieta materna não afeta a expressão de TNF α no fígado de ratos com 12 semanas de vida.....	117
Figura A22 – Animais adultos pertencentes ao grupo OO têm o maior número de genes hepáticos regulados após jejum noturno quando comparado ao controle	118
Figura A23 – Expressão de 1979 genes é afetada no fígado de animais OO quando comparados a animais CC	118
Figura A24 – Animais adultos pertencentes ao grupo OO têm o maior número de genes hepáticos regulados após jejum noturno quando comparado ao grupo CO	119
Figura A25 – Animais adultos pertencentes ao grupo OO têm o maior número de genes hepáticos regulados após jejum noturno quando comparado ao grupo OC	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Peso absoluto do fígado e peso relativo ao peso corporal de animais neonatos provenientes de ratas tratadas (DEX) ou não (CTL) com dexametasona na água de beber.....	57
Tabela 2 – MiRNAs regulados positiva ou negativamente no tecido hepático de ratos neonatos tratados intrauterinamente com dexametasona.....	60
Tabela 3 – MiRNAs regulados positiva ou negativamente no tecido hepático de ratos neonatos tratados intrauterinamente com dexametasona segundo a amplitude de regulação ..	62
Tabela 4 – MiRNAs regulados positiva ou negativamente no tecido hepático de ratos neonatos tratados intrauterinamente com dexametasona segundo o grau de expressão calculado por qPCR.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

11 β HSD – 11 beta-hidroxisteroide desidrogenase
90d – Rato adulto com 90 dias de vida
AGO – Proteína argonauta
Akt – *RAC-gamma serine/threonine-protein kinase*
AMPc – Adenosil monofosfato cíclico
AMPK – Proteína quinase ativada por AMP
ANOVA – Análise de variâncias
ATGL – Lipase de triacilgliceróis do adipócito
ATP – Adenosil trifosfato
BMP9 – *Bone morphogenetic protein*
CCND1 – Ciclina D1
cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar
CPT1 – *Carnitine palmitoyltransferase 1*
CT – Controle
CT – Limiar do ciclo (*Cycle threshold*)
CTL – Controle
DEX – Dexametasona
DEX – Tratamento com dexametasona
DEXRas – Proteína Ras induzida por dexametasona
Dnmt – DNA metiltransferase
dNTP – Desoxiribonucleosídeos trifosfatados
DTT – Ditionotreitól
DX – Dexametasona
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM – Erro padrão da média
ERK – Proteína quinase responsiva a sinais extracelulares
FACS – *Fluorescence-activated cell sorting*
FAS – Ácido graxo sintase
FATP1 – Proteína transportadora de ácido graxo 1
G6PDH – Glicose 6 fosfato desidrogenase
GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GC – Glicocorticoides
GLUT 3 – Transportador de glicose 3
GLUT4 – Transportador de glicose 4
GR – Receptor de glicocorticoide
H6PD – Hexose-6-fosfato desidrogenase
HCL – Ácido clorídrico
HDAC – Histona desacetilase
HE – Hematoxilina e Eosina
HEF2 – *Hepatocyte enhancer factor 2*
HIF1 α – *Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit*
HISS – Substância hepática sensibilizadora à insulina (*Hepatic Insulin Sensitizing Substance*)
Hsa – *Homo Sapiens*
IgG – Imunoglobulina G
INSR – Receptor de insulina
KCl – Cloreto de potássio
KH – Krebs Hanseleit

KH₂PO₄ – Fosfato de potássio monobásico
KITT – Constante de decaimento de glicose em um teste de tolerância à insulina
L1 – Rato lactante com um dia de vida
L21 – Rato lactante com vinte e um dias de vida
MAPK – Proteína quinase ativada por mitógenos
miR – microRNA
miRNA – microRNA
MIT – *Massachusetts Institute of Technology*
MKP – MAPK fosfatase
MnCl₂ – Cloreto de manganês
N – Número
Na₂PO₄ – Fosfato de sódio dibásico
NaCl – Cloreto de sódio
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*
NR4a1 – Nuclear receptor 4a 1
OGT – *O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase*
P – Probabilidade de obtenção de um resultado ao menos tão extremo quanto o observado, assumindo que a hipótese nula é verdadeira
PACT – *Protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator*
PAP – Fenol + aminofenazona
PBS – Solução tampão fosfato
PBST – Solução tampão fosfato adicionado de *tween*
PCNA – *Proliferating cell nuclear antigen*
PCR – Reação de polimerase em cadeia (*Polymerase Chain Reaction*)
PEPCK – Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
qPCR – Reação de polimerase em cadeia quantitativa (*quantitative Polymerase Chain Reaction*)
RCIU – Restrição do crescimento intrauterino
RGMa – *Repulsive guidance molecule family member a*
RGMb – *Repulsive guidance molecule family member b*
RISC – Complexo ribonucleoproteico de inibição
RNA – Ácido ribonucleoproteico
Rno – *Rattus norvegicus*
Rnu6 – Pequeno RNA nuclear
RPL37 – Proteína ribossomal L37
RT – Transcrição reversa
S18 – RNA ribossomal S18
SDS – *Sodium dodecyl sulfate*
SFB – Soro fetal bovino
SGK – Proteína quinase regulada por glicocorticoides séricos
SINASC – Sistema de Informação sobre Nascidos Vivos
SIRT – Sirtuina
SNC – Sistema nervoso central
TAG – Triacilglicerol
TARBP – *TAR (HIV-1) RNA binding protein 2*
TNF- α – Fator de necrose tumoral α
TRIS – Tris(hidroximetil)aminometano
U1 – Pequeno RNA nuclear U1
UCP3 – Proteína desacopladora 3

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Reprogramação fenotípica, uma perspectiva histórica	22
2.2 Epidemiologia do baixo peso ao nascer	23
2.3 Glicocorticoides e a restrição do crescimento intrauterino	24
2.4 O fígado: importância metabólica e desenvolvimento	25
2.4.1 Desenvolvimento hepático	26
2.4.2 Prejuízo no desenvolvimento hepático na RCIU	27
2.5 MicroRNAs	27
2.5.1 Biogênese de miRNAs	28
2.5.2 Transcrição policistrônica	30
2.5.3 Silenciamento gênico por miRNAs	31
2.5.4 Ação dos miRNAs	32
2.6 Justificativa e objetivos	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Tratamento dos animais e obtenção dos tecidos	34
3.2 Extração de RNA e análise do perfil de expressão de miRNA	35
3.3 Confirmação da expressão dos miRNA	37
3.4 Predição dos alvos dos miRNAs identificados	37
3.5 Avaliação dos alvos identificados ‘ <i>in silico</i> ’ e demais proteínas	38
3.6 Conteúdo de RNAm	39
3.7 Análise morfológica	39
3.7.1 Hematoxilina e Eosina (HE)	40
3.8 Marcadores séricos	40
3.8.1 Glicose	40
3.8.2 Triacilgliceróis	40
3.8.3 Colesterol total	40
3.8.4 Proteínas totais	41
3.8.5 Corticosterona	41
3.9 Testes de tolerância	41
3.9.1 Teste de tolerância à glicose	41
3.9.2 Teste de tolerância à insulina	42

3.9.1 <i>Teste de tolerância ao piruvato</i>	42
3.10 Secreção estática de insulina	42
3.11 Cultura de linhagens celulares	43
3.11.1 <i>Transfecção de oligonucleotídeos miméticos do hsa-miR-424-5P</i>	43
3.12 Análise fenotípica das células transfectadas	44
3.12.1 <i>Índice de proliferação</i>	44
3.12.2 <i>Viabilidade celular</i>	44
3.12.3 <i>Fragmentação de DNA</i>	44
3.13 Análise estatística	45
4 RESULTADOS	46
4.1 Ganho ponderal materno e da prole	46
4.2 Caracterização metabólica da prole em curto, médio e longo prazo	48
4.3 Morfologia do tecido hepático Dos animais neonatos	56
4.4 Expressão de GR e atividade de seus alvos	57
4.5 Conteúdo de RNAm de genes associados à regulação metabólica, proliferativa e epigenética no tecido hepático dos animais neonatos	58
4.6 Expressão de miRNAs no tecido hepático da prole	59
4.7 Expressão de alvos preditos do miR-322-5P e de PCNA	65
4.8 Transfecção de HEPG2 com miméticos do miR-424-5P	70
5 DISCUSSÃO	76
6 CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS	84
APÊNDICE A – Ratos expostos à dexametasona no início da vida exibem intolerância ao jejum prolongado	93
APÊNDICE B – Pesquisa desenvolvida durante o intercâmbio no laboratório da professora Suzan E. Ozanne	99

1 INTRODUÇÃO

O conceito de reprogramação dos processos fisiológicos no início da vida denota a importância da saúde materna para a prevenção de doenças crônicas na vida adulta da prole.

Muitos estudos contribuem para a resolução do quebra-cabeças que envolve os mecanismos que levam às modificações permanentes no fenótipo em resposta às condições intrauterinas adversas. As observações originais deram luz à teoria de restrição seletiva do crescimento e da maturação de alguns órgãos e tecidos em detrimento ao sistema nervoso central, enquanto estudos mais recentes investigam o potencial de reorganização do epigenoma para o estabelecimento do fenótipo em longo prazo. Em ambos os casos, encontramos estudos que caracterizam e propõem mecanismos fisiológicos e moleculares que, apesar de esclarecedores, não explicam totalmente a origem do repertório de alterações precoces que induzem os efeitos futuros.

A complexidade desses fenômenos observados em resposta à exposição a um ambiente intrauterino adverso é difícil de ser explicada com ferramentas de pesquisa que envolvem apenas a caracterização do perfil funcional do indivíduo exposto ao evento. Paralelamente, a busca incessante pela descrição em nível molecular de fenômenos fisiológicos e fisiopatológicos popularizou o estudo da regulação da expressão gênica em larga escala que, mais recentemente, começou a envolver o estudo de moléculas de RNA que não são traduzidas, mas que participam ativamente da regulação da expressão gênica. Todavia, ainda encontramos um grande *gap* de informação referente a esse assunto dentro do contexto da reprogramação fenotípica.

Uma vez que alguns desses transcritos, classificados como miRNAs, ganham notoriedade por sua participação na regulação de diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos, compreende-se que a caracterização do seu perfil de expressão proverá uma importante ferramenta para a compreensão desses fenômenos.

Assim, este trabalho teve como objetivo central compreender a importância de alguns miRNAs para o estabelecimento do fenótipo em resposta à RCIU em um modelo animal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Reprogramação fenotípica, uma perspectiva histórica

Durante a segunda guerra mundial, o exército alemão ocupa e fecha vias aéreas e terrestres de países europeus que não aderem ao seu crescente império. Por conta da obstrução de suas estradas, diversas cidades e províncias situadas nas planícies holandesas próximas a Amsterdam têm seu suprimento de alimentos reduzido, fato acompanhado por um rigoroso inverno iniciado em 1944, responsável por impedir o trânsito fluvial e pela perda de plantações e de animais de pecuária. Por conta dessa sucessão de eventos, houve alto índice de baixo peso ao nascer e de mortalidade neonatal na região oeste da Holanda nessa época, e mais de 20 mil pessoas morreram de frio e de fome (STEIN et al., 1975). Esse capítulo da história mundial ficou conhecido como “o inverno da fome holandesa” e só foi encerrado com o fim do embargo alemão após o término da segunda guerra mundial em 1945.

Anos mais tarde, são publicados os primeiros estudos de coorte que avaliam a saúde dos indivíduos nascidos durante a fome de inverno. Como resultado dessas observações, os autores imediatamente detectam correlação positiva entre o baixo peso ao nascer dos sujeitos nascidos entre 1944 e 1945 e a incidência de sobrepeso e de doenças cardiovasculares na vida adulta (RAVELLI; STEIN; SUSSER, 1976). A partir desses e de outros estudos, surge o conceito de “reprogramação fenotípica” que, na época seria mais conhecido como “programação fetal” (LUCAS, 1991).

Paralelamente, entre o final da década de 1980 e o início da década de 1990, o inglês David Barker e seus colaboradores publicam a hipótese mais tarde conhecida como “hipótese da origem fetal das doenças” (BARKER, 1993; BARKER; OSMOND, 1986). A hipótese inicial de Barker foi pautada em dados epidemiológicos que demonstravam que a restrição do crescimento intrauterino (RCIU) induzida pela desnutrição proteico-energética materna estava associada à obesidade e ao risco aumentado para doenças cardiovasculares na vida adulta e, por essa razão, também recebeu a alcunha “hipótese do fenótipo conservador” (HALES; BARKER, 1992). Esses estudos são oriundos de dados epidemiológicos na Inglaterra, os quais afirmavam que indivíduos nascidos em regiões com elevada prevalência de mortalidade infantil no início do século XX apresentavam maior risco para doenças cardiovasculares na vida adulta.

A hipótese inicialmente aventada por Barker provoca grande impacto na comunidade científica e nos órgãos promotores de saúde pública da época. A partir da proposta do

fenótipo conservador, diversos grupos de pesquisa convergem seus esforços para elucidar os mecanismos responsáveis pela reprogramação observada. Como resultado, foi sugerido que a desnutrição intrauterina induziria redução seletiva do desenvolvimento de órgãos e tecidos, visando preservar aqueles de maior importância para a manutenção da vida e assim reduzir o risco de mortalidade de um indivíduo exposto a um ambiente intrauterino adverso. Por essa razão, fetos com retardo de crescimento apresentam assimetria corporal, caracterizada pela preservação da circunferência da cabeça e redução da circunferência da cintura (BARKER et al., 1995; HYATT; BUDGE; SYMONDS, 2008).

Todavia, apesar de inicial redução nas proporções de tecido adiposo branco, tal indivíduo apresentaria maior susceptibilidade para o acúmulo de gordura visceral ao longo de sua vida pós útero.

Assim, a Hipótese do Fenótipo Conservador tem por base o conceito de resposta preditiva adaptativa a um ambiente intrauterino adverso, programando o indivíduo para resistir a condições semelhantes àquela vivenciada durante a vida fetal. No caso da desnutrição proteico-energética, o indivíduo apresenta adaptações metabólicas nas quais ele tende a estocar energia para resistir à escassez de nutrientes e prevenir o catabolismo proteico. No entanto, quando do contato com ambientes de maior abundância de nutrientes, há maior acúmulo energético, aumentando o risco para a obesidade e para as comorbidades que a acompanham.

Todavia, os distúrbios observados nos indivíduos programados não pareciam estar necessariamente atrelados a alterações morfofuncionais. Assim, a partir da década de 2000 começam a aparecer os primeiros trabalhos relacionando o fenótipo de seres humanos e de outros mamíferos adultos programados durante a vida fetal com a atividade aberrante de alguns genes cuja expressão está alterada de forma permanente. Para explicar a alteração de genes programados, os pesquisadores começam a estudar o impacto do ambiente no início da vida sobre marcadores epigenéticos.

A epigenética compreende o estudo das alterações no padrão de expressão gênica que são mitoticamente hereditárias, mas que não envolvem alterações na sequência do DNA (RIGGS; RUSSO; MARTIENSSEN, 1996). Em um âmbito mais concreto e prático, a epigenética estuda as alterações covalentes no DNA ou nas histonas que provocam maior compactação ou relaxamento de regiões específicas da cromatina. Tais alterações são transmitidas para as próximas gerações celulares durante a replicação do DNA e determinam se um gene será mais expresso, menos expresso, ou silenciado.

Nos dias atuais, o estudo da reprogramação fenotípica no início da vida compreende mecanismos que envolvem alterações morfológicas, fisiológicas, metabólicas e epigenéticas.

2.2 Epidemiologia do baixo peso ao nascer

Apesar da crescente incidência de macrosomia observada em diferentes populações ocidentais, a ocorrência de baixo peso ao nascer ainda se faz presente (ANDRADE; SZWARCOWALD; CASTILHO, 2008; VIANA et al., 2013). A análise dos dados provenientes do Sistema de Informação sobre Nascidos Vivos (SINASC), por exemplo, revela a prevalência de 4,3% de baixo peso ao nascer em neonatos a termo no Brasil no ano de 2005 (ANDRADE; SZWARCOWALD; CASTILHO, 2008), sendo que, segundo Viana et al. (2013), a investigação de estratos amostrais que perfazem as cinco regiões brasileiras demonstra que 20% das gestações ainda resultam em neonatos com peso insuficiente (≥ 2500 g e < 3000 g).

Assim, mesmo dentro do atual panorama da maior parte dos países americanos e europeus, no qual a prevalência de desnutrição materna vem sendo substituída pelo ganho de peso gestacional excessivo e pela obesidade materna - fato que pressupõe a maior incidência de crianças com alto peso ao nascer -, observações epidemiológicas demonstram que mulheres eutróficas que exibem ganho de peso gestacional excessivo tendem a apresentar filhos com menor peso ao nascer em relação ao comprimento, sugerindo que o ambiente obesogênico durante a gestação pode estar relacionado tanto ao alto quanto ao baixo peso ao nascer (HEERMAN et al., 2014; SIEGA-RIZ; LARAIA, 2006). Além da composição corporal materna, dentre outros fatores ambientais também relacionados ao ainda incidente baixo peso ao nascer destacam-se o tabagismo e a baixa escolaridade materna (VIANA et al., 2013).

2.3 Glicocorticoides e a restrição do crescimento intrauterino

Apesar da maior parte dos estudos epidemiológicos e experimentais que envolvem restrição intrauterina e reprogramação fenotípica relacionarem a desnutrição proteica ou proteico-energética ao desenvolvimento de doenças metabólicas em longo prazo, após mais de vinte anos de pesquisas em reprogramação fenotípica, outros “insultos” durante o período fetal já foram descritos como potenciais indutores de restrição do crescimento intrauterino.

Acredita-se, nesse sentido, que a exposição precoce a determinados insultos pode levar ao menor aporte de nutrientes, de oxigênio e de hormônios de crescimento para o feto em

formação, afetando diretamente seu desenvolvimento. Uma das principais hipóteses aventadas é a de que a superexposição ao ambiente hormonal do estresse – *i.e.*, altas concentrações de glicocorticoides (GC) – seja desencadeador de RCIU e da reprogramação fenotípica observada (MCMILLEN; ROBINSON, 2005). Tal condição é comumente observada em quadros de má nutrição materna e parece ser o ponto de ligação entre diferentes insultos e a alteração no desenvolvimento fetal.

Dumortier et al. (2007), por exemplo, observaram que a exposição a uma dieta materna restritiva leva ao maior aporte de GC para fetos de roedores. Além disso, ainda é frequente o uso terapêutico de GC sintéticos em caso de gestações com risco de prematuridade.

Em conjunto, vários estudos conduzidos em modelos animais demonstram que o excesso pré-natal de GC, quer por superprodução endógena decorrente do estresse materno induzido por má-alimentação, quer por administração exógena, quer por diminuição da atividade placentária da 11beta-hidroxisteróide desidrogenase 2 (11 β -HSD2), é responsável pelo baixo peso ao nascer e por alterações metabólicas e cardiovasculares permanentes (MCMILLEN; ROBINSON, 2005). Em seres humanos, por exemplo, já está bem estabelecido que mutações que causam perda de função da 11 β -HSD2 aumentam a fetal aos GC e estão associadas ao retardo no crescimento intrauterino (SECKL; MEANEY, 2004).

Nos principais tecidos reguladores do metabolismo energético já foram identificadas várias alterações decorrentes da programação fetal por excesso de GC. Em ratos, a exposição pré-natal à dexametasona induz aumento, até a vida adulta, da expressão da PEPCK e da sua atividade enzimática, predispondo assim à hiperglicemia (MOFFAT et al., 1998). No músculo esquelético ocorre aumento da expressão de Glut4 e redução de UCP3 (WYRWOLL et al., 2008). No tecido adiposo se observa aumento do depósito de gordura abdominal, em paralelo à redução da expressão da lipase lipoproteica (CLEASBY et al., 2003) e ao aumento da produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL1 β e TNF- α (WYRWOLL et al., 2008). No fígado (MOFFAT et al., 1998) e no tecido adiposo (CLEASBY et al., 2003), a exposição pré-natal aos GC também aumenta permanentemente a expressão de seu receptor (GR). Essa última resposta é consistente com a resistência à insulina nestes tecidos, na medida em que a responsividade aos GC depende, dentre outros fatores, do conteúdo de seu receptor no tecido.

É importante destacar que a exposição aos GC em roedores também está relacionada à reprogramação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, aumentando permanentemente a produção endógena de corticosterona (THEOGARAJ et al., 2005; WADDELL et al., 2010),

fato também evidenciado em primatas não humanos quanto à sua produção de cortisol (DEVRIES et al., 2007).

2.4 O fígado: importância metabólica e desenvolvimento

O fígado é o segundo maior órgão do corpo humano, perfazendo entre 2 e 5% do peso corporal de um humano adulto e entre 4 e 5% do peso de um neonato saudável, sendo ainda o órgão com maior diversidade de funções.

A localização anatômica desse órgão condiz diretamente com sua principal contribuição para a homeostasia. Ele encontra-se localizado na cavidade abdominal, em contato direto com a circulação portal, recebendo fluidos e moléculas provenientes do estômago, do intestino delgado, do intestino grosso, do pâncreas e do baço. Logo, a principal função desse órgão torna-se metabolizar compostos endógenos (hormônios e sais biliares) e exógenos (nutrientes, compostos bioativos, toxinas, etc) (SUCHY in BORON; BOULPAEP, 2009).

Além da sua ação metabólica direta, o fígado ainda apresenta uma série de outras funções que o torna essencial para grande parte da regulação metabólica em outros órgãos e para controle de processos fisiológicos e imunológicos. Esse órgão participa da ativação de importantes hormônios, secreta fatores de crescimento, interesterifica ácidos graxos e os secreta conjugados a lipoproteínas (ZMIEC, 2001). Os sinusoides hepáticos são especialmente ricos em macrófagos denominados células de Kupfer, cujo papel é metabolizar hemácias velhas, secretar moléculas relacionadas com processos imunológicos e fagocitar bactérias oriundas do intestino grosso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Por fim – mas não menos importante – o fígado é o órgão chave da manutenção da glicemia dentro de uma faixa estreita, função esta desempenhada (i) pela sua capacidade metabólica direta que resulta de sua habilidade de liberar glicose na circulação pela glicogenólise e a gliconeogênese e (ii) pela sua função endócrina de secretar uma substância putativa sensibilizadora à insulina em resposta ao reflexo parassimpático (*Hepatic Insulin Sensitizing Substance* - HISS) (LAUTT et al., 2001).

2.4.1 *Desenvolvimento hepático*

O fígado, juntamente com o compartimento epitelial do trato gastrointestinal e o pâncreas, deriva da endoderme, uma das três camadas germinativas formadas durante a gastrulação (LEMAIGRE, 2009; TREMBLAY; ZARET, 2005).

Por volta da quarta semana da embriogênese de seres humanos (8º dia em roedores), ocorre o início da especificação do tecido hepático, com células pluripotentes começando a expressar genes hepáticos como a albumina, a transferrina e a alfa-fetoproteína. A partir desse processo, diversos eventos acompanham a organogênese do fígado, iniciada com a formação do divertículo hepático recoberto por hepatoblastos que, inicialmente, formam um epitélio pseudoestratificado que prolifera formando um tecido primitivo (BORT et al., 2006; LEMAIGRE, 2009). Finalmente, os hepatoblastos abandonam o epitélio endodermal e invadem o septo transversal onde irão proliferar e diferenciar em hepatócitos ou colangiócitos para dar origem ao fígado em expansão (LEMAIGRE, 2009).

Após o estágio de segregação, as células diferenciadas na linhagem de hepatócitos atravessam um período de maturação, a qual consiste na aquisição de características morfológicas e funcionais em processo que ocorre durante boa parte do desenvolvimento pós-natal (JOCHHEIM et al., 2003; PETKOV et al., 2004). Assim, observa-se que a maturação dos hepatócitos ainda não está totalmente completa no nascimento e só termina após o período intrauterino.

Todavia, é importante citar que os hepatócitos distribuídos no fígado são heterogêneos quanto às suas características metabólicas, com sua função primária variando segundo sua localização. Hepatócitos localizados em regiões periportais tendem a apresentar característica predominantemente gliconeogênica, por conta do maior aporte de oxigênio, nutrientes e hormônios, enquanto que aqueles localizados próximos à veia central estão expostos a um ambiente pobre em nutrientes e oxigênio, o que favorece a característica glicolítica (IKEZAWA et al., 1998; QUISTORFF, 1985; TEUTSCH, 1988).

2.4.2 *Prejuízo no desenvolvimento hepático na RCIU*

Estudos epidemiológicos e experimentais denotam que o desenvolvimento adequado, bem como a maturação funcional do fígado fetal, é essencial para a sobrevivência neonatal e para a homeostase na vida adulta (BARKER et al., 1995; FOWDEN; MIJOVIC; SILVER, 1993). Fowden, Mijovic & Silver (1993), por exemplo, demonstraram que o excesso de GC no final da gestação provoca maior atividade de enzimas gliconeogênicas no fígado, podendo haver uma alteração na proporção de células glicolíticas e gliconeogênicas devido às mudanças no padrão de desenvolvimento.

Quando os insultos no início da vida atuam durante janelas de plasticidade do desenvolvimento de determinados órgãos, eles tendem a provocar sequelas permanentes. O fígado, em especial, é alvo de reprogramação fenotípica por conta de alterações estruturais, funcionais e epigenéticas (CIANFARANI et al., 2012). Assim, o fato do desenvolvimento hepático se iniciar durante embriogênese e terminar somente após o nascimento o torna um órgão sensível à reprogramação durante longo período no início da vida de mamíferos.

2.5 **MicroRNAs**

Com a conclusão do Projeto Genoma Humano em 2003, observou-se que a caracterização dos cerca de 25 mil genes identificados e mapeados não explicava a complexidade do fenótipo observado em seres humanos.

Por essa razão, o restante do DNA não codificante despertou interesse, devido à possibilidade de uma fração correspondente a mais de 98% do genoma poder servir a uma função particular. Em geral, os genes codificadores de proteínas são regulados por fatores de transcrição e por alterações covalentes da cromatina. Na época, a possibilidade de moléculas de RNA não codificante alterar a expressão proteica parecia improvável. Nesse sentido, um dos principais avanços para a elucidação dos mecanismos de regulação da informação genética veio do descobrimento dos microRNAs (miRNAs).

MiRNA é a denominação aventada para moléculas de RNA endógeno que, em sua fase madura, possuem entre 20 e 22 nucleotídeos e que atuam no processo de silenciamento gênico através da regulação negativa da taxa de tradução de RNAs específicos.

O primeiro miRNA foi descoberto em 1993 por meio de rastreamento genético de mutações em *C. elegans* (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993). Desde então, mais de 24 mil miRNAs já foram identificados ou caracterizados em diferentes espécies (miRBase Sequence

Database-Release 20), sendo que análises computacionais indicam que a maior parte desses transcritos pode regular centenas de genes diferentes (ZHUO et al., 2013). No genoma humano já foram identificados 2555 miRNAs (miRBase Sequence Database-Release 20).

2.5.1 Biogênese de miRNAs

Genes de miRNAs encontram-se distribuídos em todo o genoma em duas localizações básicas: em regiões intergênicas e dentro de regiões codificadoras de proteínas, principalmente compondo parte de íntrons.

No primeiro caso, os genes de miRNAs possuem regiões promotoras que contribuem para a regulação de sua expressão (GRAVES; ZENG, 2012). Além disso, grande parte desses miRNAs encontra-se agrupada (i.e., em *cluster*), ou seja, mais de um miRNA maduro é produzido a partir de um único transcrito primário denominado RNA policistrônico. Nesse mesmo contexto, a maior parte dos *clusters* contém mais de uma cópia de um determinado miRNA, justificando o rápido aumento na concentração de algumas dessas moléculas em condições específicas, característica que permite a regulação efetiva de diversos genes.

Por outro lado, diversos miRNAs são encontrados em regiões intrônicas de determinados genes. Quando os miRNAs são produzidos a partir do processamento de pré-RNA, a coexpressão geralmente envolve o silenciamento de genes de ação antagônica à do gene hospedeiro, permitindo maior resposta fenotípica à expressão do mesmo (BARIK, 2008). Além disso, estudos mostram indícios de coevolução entre o gene hospedeiro e o gene de miRNA intrônico (HE et al., 2012).

Independente da origem genômica, a biogênese de miRNA envolve uma série de processos que são comuns para todos esses transcritos. De forma geral, a primeira etapa de síntese de miRNA é a transcrição do gene específico pela atividade da RNA polimerase II ou, ocasionalmente, da RNA polimerase III, originando uma molécula intermediária com tamanho bastante superior ao miRNA maduro denominada (miRNA primário). Os pri-miRNA estão sujeitos à complementariedade de bases em regiões específicas, levando à formação de estruturas secundárias com característica física de grampos (*hairpins*) (CULLEN, 2004; GRAVES; ZENG, 2012). Posteriormente, os pri-miRNA são clivados por uma RNase nuclear da classe III - denominada Drosha- em processo que implica na liberação dos *hairpins* e a consequente formação dos pré-miRNAs.

Os pequenos *duplex* de RNA de cerca de 60 nucleotídeos denominados pré-miRNAs são exportados para fora do núcleo pela ação de proteínas de exportação (exportina 5). Uma

vez no citoplasma, esses transcritos são imediatamente processados pela RNase III citoplasmática Dicer, que catalisa a retirada da alça que liga as fitas paralelas do *duplex*, levando à formação dos miRNA maduros que serão incorporados a um complexo proteico (RNA-inducing silencing complex, RISC) composto por uma das fitas oriundas do *duplex* e por proteínas citoplasmáticas denominadas proteínas argonautas (AGO), TARBP e PACT (HAMMOND et al., 2001). A escolha da fita para composição do RISC dependerá da estabilidade termodinâmica das duas pontas do *duplex* (KHVOROVA; REYNOLDS; JAYASENA, 2003; SCHWARZ et al., 2003).

A fita que não é inicialmente utilizada pode ser descartada e degradada por nucleases citosólicas ou compor outro RISC. Quando isso acontece, identificamos as diferentes fitas oriundas de um mesmo pré-miRNA com o sufixo -3p ou -5p, de acordo com a ponta livre.

Figura 1 – Esquema simplificado da síntese e processamento dos miRNA de mamíferos.

Adaptado de Piva, Spandidos & Gambari, 2013.

2.5.2 Transcrição policistrônica

Aproximadamente 45% dos pré-miRNA expressos em ratos e em seres humanos são encontrados em *clusters* genômicos e, em alguns casos, são previamente sintetizados como um transcrito único conhecido como pri-miRNA policistrônico que será posteriormente processado, originando os *hairpins* livres característicos de pri-miRNAs (BASKERVILLE; BARTEL, 2005; SEWER et al., 2005). Segundo Baskerville & Bartel (2005), existe grande probabilidade de dois miRNAs encontrados em uma faixa do genoma que compreenda 0, 1 kb e 50 kb terem o padrão de expressão semelhante, o que é consistente com a ideia de origem por um transcrito único e posterior processamento. A distância proposta pelo estudo citado é similar ao tamanho médio de genes humanos anotados no banco de dados do NCBI [55 kb (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Web/Newsltr/Spring03/human.html>)], o que reforça a hipótese da transcrição policistrônica para miRNAs adjacentes.

Por conta desse fenômeno, a regulação da expressão de miRNAs de um mesmo *cluster* tende a estar correlacionada positivamente (BASKERVILLE; BARTEL, 2005).

Figura 2 – Exemplo do Cluster do miR-35-41 em *C. Elegans* previsto computacionalmente usando o software RNAfold.

Adaptado de Lau et al., 2001.

2.5.3 Silenciamento gênico por miRNAs

A regulação negativa da expressão exercida pelos miRNA é dependente da sua ligação a sequências complementares no RNAm alvo. Essa ligação permite a regulação pós-transcricional por indução da supressão/redução da síntese proteica e/ou degradação do mRNA alvo (FABIAN; SONENBERG; FILIPOWICZ, 2010).

Uma vez montado o complexo de silenciamento, a fita do miRNA atua como guia para a localização de sequências complementares nos RNAm alvo e o complexo é acoplado nessa molécula (Figura 1).

A partir da ligação do RISC no RNAm, ocorre o silenciamento gênico por duas vias, dependendo do grau de complementariedade observado com o miRNA. Quando a complementariedade é total, ou seja, todas as bases do miRNA alinham com as bases do alvo, a maquinaria de silenciamento induz a clivagem endonucleotídica da molécula de RNAm pelas proteínas componentes do complexo, levando ao decaimento na abundância desses transcritos. Esse tipo de ação do RISC é frequentemente observado em plantas.

O segundo tipo de silenciamento induzido por RISC, frequentemente observado em animais, envolve a complementariedade incompleta de bases entre o miRNA e a molécula alvo e, portanto, a maior preservação da integridade da mesma. Nesse sentido, são formados híbridos imperfeitos de miRNA e sequências geralmente localizadas na região 3' não traduzida do RNAm. As imperfeições na região central do híbrido evitam que o RNAm seja prontamente degradado, mas favorece o bloqueio da tradução (BHATTACHARYYA et al., 2006; TOMARI; ZAMORE, 2005).

No segundo caso, os mecanismos envolvidos no processo de silenciamento ainda não estão totalmente elucidados, mas possivelmente envolvem a redução da taxa de tradução mediada por dois eventos: (a) RISC pode atuar reduzindo a ação do complexo de iniciação da tradução e afetar a interação entre RNAm e ribossomos, induzindo a agregação do RNAm aos corpúsculos de processamento (*P bodies*), regiões ricas em endonucleases nas quais o RNAm pode ser degradado ou desassociado do miRNA para direcionamento aos polirribossomos (BHATTACHARYYA et al., 2006); (b) RISC pode provocar o recrutamento do complexo de desadenilação Ccr4:Not1, responsável pela degradação da cauda poli-A, perda de estabilidade do RNAm alvo, imediato bloqueio da tradução e posterior degradação do RNAm (PILLAI; BHATTACHARYYA; FILIPOWICZ, 2007). Nota-se que em ambos os casos também há decaimento de RNAm.

2.5.4 Ação dos miRNAs

Embora milhares de miRNA já tenham sido identificados em várias espécies, a caracterização dos alvos funcionais tem sido uma tarefa desafiadora. Isto se deve ao fato de que, nos mamíferos, cada miRNA pode potencialmente regular centenas de transcritos diferentes, e o mesmo gene pode ser regulado por muitos miRNAs. Entretanto, potenciais genes alvo dos miRNAs podem ser rastreados através do uso de ferramentas computacionais de domínio público disponíveis nos principais bancos de dados de miRNA como o *miRBase* (GRIFFITHS-JONES et al., 2008), e softwares *online* como o *TargetScan* (MIT).

Dos milhares de miRNAs identificados, apenas uma parcela teve seus alvos validados experimentalmente até o momento. Além dos achados obtidos nas diversas áreas que já têm consistentemente estudado a participação dos miRNAs nos processos biológicos – como a embriologia e a oncologia – fortes evidências indicam que os miRNAs têm importância central na regulação dos eventos moleculares envolvidos na patogênese da obesidade e do *diabetes mellitus*.

Assim, dados da literatura ressaltam o envolvimento dos miRNAs em processos tão diversos quanto o desenvolvimento embrionário (MINENO et al., 2006; WIENHOLDS et al., 2005), a manutenção de células tronco (HOUBAVIY; MURRAY; SHARP, 2003; PARK et al., 2007), a resposta ao estresse (VAN ROOIJ et al., 2007), a cardiogênese (ZHAO et al., 2007), a resistência viral (NIU et al., 2006) e a apoptose (WANG; LEE, 2009). Além disso, a expressão aberrante de diversos miRNA já foi comprovada em condições patológicas como a obesidade, o câncer, a aterosclerose e o diabetes (DAVID; MELTZER, 2011; FERNANDEZ-VALVERDE; TAFT; MATTICK, 2011; ZHANG, 2009).

A participação dos miRNA no metabolismo energético e na patogênese de distúrbios metabólicos foi inicialmente aventada após a demonstração da regulação do metabolismo lipídico pelo miR-14 (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993). Desde então, vários estudos têm demonstrado a função de miRNA em tecidos relacionados direta ou indiretamente à regulação metabólica, como ilhotas pancreáticas, fígado, musculo esquelético, tecido adiposo e SNC (CHEN et al., 2014; LI et al., 2009; ROWLANDS et al., 2014; ZHAO et al., 2009). No fígado de camundongos *ob/ob*, por exemplo, 8 miRNA se mostraram menos expressos que na linhagem controle (dentre eles o miR-34a) e 4 estavam superexpressos (dentre eles o miR-122) (LI et al., 2009). Tanto miR-34a quanto miR-122 apresentaram padrão idêntico de expressão em fígado de camundongos com diabetes induzida por estreptozotocina, indicando que esses poderiam fazer parte de um conjunto hipotético de miRNA associados a condições

metabólicas aberrantes. Ademais, a expressão do miR-34a também apresentou correlação direta com o fenótipo de obesidade de camundongos BTBR e B6, tanto no fígado como nas ilhotas pancreáticas (LI et al., 2009; ZHAO et al., 2009).

2.6 Justificativa e objetivos

Desconhecemos, até o momento, a existência de estudos que avaliaram o padrão de expressão de miRNA relacionados especificamente a deficiências do metabolismo hepático induzidas por RCIU; entretanto, acreditamos que, dada a importância central de diversos miRNA na etiologia de grande número de doenças, é relevante o estudo do padrão de expressão desses transcritos para posterior caracterização da sua participação no estabelecimento do fenótipo deste modelo.

Nesse sentido, o objetivo inicial do presente trabalho foi identificar o repertório de miRNAs potencialmente relevantes para a disfunção hepática de ratos albinos submetidos à reprogramação metabólica por exposição pré-natal a dexametasona. Com base nos resultados obtidos no decorrer do estudo, tornou-se principal objetivo analisar a possível participação do miR-322-5P na redução da taxa de proliferação de hepatócitos nesses animais no período de seu nascimento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Tratamento dos animais e obtenção dos tecidos

Foram utilizadas ratas albinas Wistar primíparas, obtidas de colônias de produção do Instituto de Ciências Biomédicas. Os animais foram mantidos em gaiolas de criação até o 60º dia de vida e então transferidos para caixas de polipropileno coletivas (dimensões de 30x18x13 cm), nas quais permaneceram até o final do experimento. Durante todo o período experimental, os animais foram submetidos a condições ambientais que incluíam: temperatura de 22 ± 2 °C, umidade relativa de $55 \pm 10\%$ e ciclo de iluminação 12 h claro/12 h escuro.

Todos os procedimentos realizados com os ratos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, de acordo com as normas do Colégio Brasileiro sobre Experimentação Animal. Aos 3 meses de idade, as ratas foram acasaladas com machos de mesma linhagem. O acasalamento realizado foi poligâmico (3 fêmeas e 1 macho) e a cópula foi confirmada pela constatação da presença de espermatozoides no esfregaço vaginal no período matutino (9 h), sendo este considerado o primeiro dia de gestação. A partir do 14º dia de gestação as ratas receberam dexametasona ou veículo na água de beber (0,2 ou 0,1 mg/kg peso corpóreo/dia). Experimentos prévios mostraram que este tratamento induz redução significativa do peso corporal da prole em relação aos animais controle. Também testamos o tratamento com injeção subcutânea, que apresentou alta mortalidade na prole (70-80%), inviabilizando a conclusão do estudo piloto.

Assim que os filhotes nasceram (21 a 22 dias após o acasalamento), avaliou-se o tamanho da ninhada por contagem e determinou-se o sexo dos animais, mediante a avaliação da distância anogenital. Sempre que possível, seis animais de cada ninhada foram eutanasiados no nascimento (L1) para coleta de amostras e seis animais machos foram randomicamente selecionados para dar continuidade ao estudo.

Posteriormente, as proles foram eutanasiadas por decapitação após narcose em 2 períodos experimentais distintos: no desmame (L21) e aos 90 dias de vida (90d). Escolhemos esses períodos a partir de dados obtidos no projeto-piloto: L1 porque apresentou variação significativa na expressão de miRNA no fígado, e L21 e 90d porque, em ambos os casos, os animais tratados com DEX apresentaram intolerância à glicose. Amostras de sangue foram coletadas de animais neonatos e adultos. Dos primeiros, fez-se um *pool* de amostras de animais provenientes das mesmas matrizes. O sangue foi centrifugado [(Eppendorf centrifuge

5804 R) a 4 °C, 1200 g, 15 minutos] e o soro coletado para as análises de concentração sérica de proteínas totais, de glicose, de colesterol total e de triacilgliceróis. Fragmentos de fígados de todos os animais foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80 °C para a extração de RNA e de proteínas. Adicionalmente, secções do fígado dos animais neonatos foram fixadas em solução de fixação Methacarn (metanol/clorofórmio/ácido acético glacial – 60/30/10 – v/v/v) para posterior análise morfológica.

Para a coleta de ilhotas pancreáticas, cerca de quatro animais adultos por grupo foram eutanasiados, esanguinados e submetidos à laparotomia mediana para a exposição e clampeamento do ducto pancreático. Pelo ducto, foi introduzida uma cânula de poliestireno e injetados 15 ml de solução de Hanks (NaCl 137 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1 mM, MgSO₄ 1 mM, Na₂HPO₄ 0,3 mM, KH₂PO₄ 0,4 mM, NaHCO₃ 4 mM) equilibrada com carbogênio (O₂/CO₂ – 95/5 – v/v), adicionada de glicose (5,6 mM) e colagenase [0,7 mg/ml (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA)]. Após inflação, o pâncreas foi retirado e disposto em placa de Petri para dissecação de gânglios linfáticos, vasos sanguíneos e tecido adiposo. Posteriormente, ele foi transferido para um tubo de 50 ml e incubado em banho-maria a 37 °C por 25 minutos. A seguir, cerca de 30 ml de solução de Hanks gelada foi adicionada e o tubo foi agitado por cerca de 10 segundos para completa digestão do pâncreas. O produto da digestão foi transferido para um becker contendo solução de Hanks gelada e lavado por 3 vezes. Ao final desse processo, as ilhotas pancreáticas foram coletadas com o emprego de lupa e micropipeta.

3.2 Extração de RNA e análise do perfil de expressão de miRNA

A análise do perfil de expressão de miRNAs foi conduzida a partir de RNA total extraído com reagente QIAzol (Qiagen, Valencia, CA, EUA). Para tanto, foi utilizado o kit miRNome microRNA Profilers QuantiMir [Rat Cat. # RA670A-1 (System Biosciences, Mountain View, CA, EUA)]. Três RNAs não codificantes constitutivos validados estão presentes nos kits e foram utilizados para normalização dos resultados obtidos. A descrição detalhada de todo o procedimento encontra-se nos próximos parágrafos.

A extração de RNA do fígado seguiu as recomendações do fabricante do reagente comercial QIAzol. Resumidamente, cerca de 100 mg dos tecidos congelados foram imersos em 1 ml de QIAzol, homogeneizados em tubos autoclavados usando-se um homogeneizador de bancada [Polytron PT2100 (Kinematica, Luzern, Suíça)] e mantidos em gelo até o final do processo. Posteriormente, o homogenato foi transferido para tubos de 1,5 ml e adicionado de 200 µl de clorofórmio. A solução foi agitada em vórtex por 15 segundos e repousada em

temperatura ambiente por 3 minutos. Os tubos foram submetidos à centrifugação (12000 g/ 20 min/ 4 °C) e a fase aquosa foi coletada. Adicionamos à solução coletada 500 µl de isopropanol e agitamos por inversão (10 vezes). Novamente, os tubos foram centrifugados (12000 g/ 10 min/ 4 °C) e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* resultante da centrifugação foi lavado com 70% etanol gelado e, após secagem, foi ressuspensão em água ultrapura.

A concentração de RNA da solução final foi quantificada por espectrofotometria em *nanodrop*, e uma alíquota foi submetida à eletroforese em gel de agarose desnaturante para análise da integridade das frações ribossomais. As 3 amostras de melhor qualidade de cada grupo foram utilizadas como *pool* para a análise em larga escala. Para isso, os *primers* contidos nas placas dos kits foram ressuspensos com 20 µl de água ultrapura (livre de nucleases) e aliquotados em placas de 96 poços (2 µl/poço). As transcrições reversas foram realizadas a partir de 800 ng de RNA (volume de 5 µl), acrescido de 2 µl de tampão poli-A 5X, 1 µl MnCl₂ (25 mM), 1,5 µl de ATP (5 mM) e 0,5 µl da enzima poli-A polimerase; a mistura foi incubada a 37 °C por 30 min para adição de uma cauda poli-A em todos os RNAs presentes na amostra original. Na segunda etapa, foi adicionado 0,5 µl do adaptador ligado ao oligo-dT na mistura, que foi aquecida a 60 °C por 5 min e resfriada até a temperatura ambiente para anelamento do oligo. Em seguida, foram adicionados 4 µl do tampão RT 5X, 1 µl da mistura de dNTP, 1,5 µl de DTT (0,1 mM), 1,5 µl de água livre de nucleases e 1 µl de transcriptase reversa. A transcrição foi realizada por aquecimento a 42 °C por 60 min, seguida da inativação da enzima por aquecimento a 95 °C por 10 min.

A amplificação seguiu protocolo padrão de qPCR com SYBR Green [Power SYBR Green (Applied Biosystems – Life Technologies, Foster City, CA, EUA)]: 2X Mastermix SYBR Green (2,5 ml por cDNA), 100 µl de *primer* reverso universal (10 µM), 10 µl de cDNA e 1,556 ml de água livre de nuclease. Essa mistura, depois de homogeneizada por pipetagem, foi distribuída nas placas contendo os primers previamente aliquotados (10 µl por poço). O protocolo padrão para amplificação consistiu de aquecimento a 95 °C por 10 min seguido de 40 ciclos de desnaturação (95 °C, 3 min) e anelamento/extensão (60 °C, 1 min). Os CTs obtidos foram exportados para uma planilha Excel disponibilizada pelo fabricante para cálculo da expressão dos miRNA. As reações de amplificação foram realizadas em equipamento de PCR em tempo real [Mx3005P (Agilent, Santa Clara, CA, EUA)].

3.3 Confirmação da expressão dos miRNA

Parte dos miRNA significativamente alterados na análise em larga escala foram quantificados por qPCR. A amplificação de cada miRNA foi realizada em amostras individuais (não em *pool* como nos *arrays*) utilizando *primers* e seguindo rigorosamente as instruções do fabricante. Para isso, a extração do RNA total foi novamente realizada com QIAzol. Após quantificação, as concentrações nas diferentes amostras foi ajustada para 125 ng/ μ l. As reações de poladenilação dos RNAs foram realizadas a partir de 250 ng de RNA (volume de 2 μ l), acrescido de 2 μ l de tampão poli-A 10X, 1 μ l de ATP (10 mM), 0,5 μ l da enzima poli-A polimerase [5 U/ μ l (New England Biosciences, Ipswich, MA, EUA)] e 5,5 μ l de água ultrapura; a mistura foi incubada a 37 °C por 10 min para adição da cauda poli-A em todos os RNAs presentes na amostra original, seguida de inativação da enzima a 65 °C por 20 min. Na segunda etapa, adicionamos 0,5 μ l do adaptador ligado ao oligo-dT (10 μ M) na mistura, a qual foi aquecida a 60 °C por 5 min e mantida a 25 °C por 2 min para anelamento do oligo. Em seguida, foram adicionados 4 μ l do tampão RT 5X, 1 μ l de mistura de dNTP (10 mM cada nucleotídeo), 3,5 μ l de solução de cloreto de magnésio (25 mM) e 1 μ l de transcriptase reversa [Improm III (Promega, Fitchburg, WI, EUA)]. Após homogeneização, a mistura foi mantida a 25 °C por 5 min e a transcrição reversa ocorreu após aquecimento a 42 °C por 60 min, que foi seguida da inativação da enzima por aquecimento a 70 °C por 15 min.

Novamente, a amplificação seguiu protocolo padrão de qPCR com SYBR Green (Kappa Biosciences, Woburn, MA, EUA): 2X Mastermix SYBR Green (6,25 μ l por reação), 0,5 μ l de *primer* reverso universal (10 μ M) e 0,5 μ l de *primer* específico (sequência do miRNA), 0,5 μ l de cDNA e 4,75 μ l de água ultrapura. Para a amplificação, essa mistura é aquecida a 95 °C por 3 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação (95 °C, 3 s) e anelamento/extensão (60 °C, 30 s). Os snRNAs U1 e Rnu6, bem como o RNA ribossômico S18 foram também avaliados para normalização dos resultados. A quantificação da expressão relativa dos miRNA estudados foi feita utilizando a equação de cálculo do $\Delta\Delta C_t$.

3.4 Predição dos alvos dos miRNAs identificados

Foram utilizados dois modelos computacionais independentes para predição dos alvos dos miRNAs selecionados: (1) TargetScan; (2) ferramentas disponíveis no *website* microrna.org.

3.5 Avaliação dos alvos identificados '*in silico*' e demais proteínas

A verificação experimental dos alvos preditos *in silico* foi realizada por imunoblotting, de acordo com metodologia de uso corrente no laboratório (NICOLETTI-CARVALHO et al., 2010; BROMATI et al., 2011; NOGUEIRA et al., 2011). Inicialmente, os fígados congelados foram homogeneizados em tampão de extração contendo 100 mM tampão TRIS (pH 7,00), 10 mM EDTA (pH 8,00), 1% SDS, 10 mM NaF. Para a homogeneização foi usado homogeneizador elétrico (Kinematica Polytron®, Newark, New Jersey, United States) na velocidade máxima. As amostras foram, então, centrifugadas por 20 minutos a 12.000 g e temperatura de 4 °C. Após a centrifugação, coletou-se o sobrenadante, que foi transferido para outro tubo. A concentração de proteínas do homogenato foi determinada através do ensaio de Bradford. Homogenatos provenientes de amostras de linhagens celulares permanentes tiveram a sua concentração de proteínas determinada pelo ensaio do ácido bicinonínico. As amostras foram então combinadas com tampão de amostra contendo 240 mM Tris, (pH 6,8), 40% glicerol, 0,8% SDS, 10% beta-mercaptoetanol e 0,02% azul de bromofenol. Amostras contendo 25 µg de proteína foram submetidas à eletroforese no gel de poliacrilamida, inicialmente a 60 V. Uma vez que as proteínas atravessaram o gel de empilhamento, a voltagem foi aumentada para 120 V, sendo mantida até o final da corrida. A transferência de proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose foi realizada em cuba de eletroforese, na presença de tampão de transferência, sob corrente elétrica de 120 V, por 60 min. A eficiência da transferência foi verificada corando-se a membrana, por 5 min, com corante *Ponceau* red (1% ponceau, 1% ácido acético), seguida de lavagem com PBST [8% NaCl, 0,2% KCl, 0,2% $\text{KH}_2(\text{PO})_4$, 1,15% $\text{Na}_2\text{H}(\text{PO})_4$, 0,5% Tween]. Os sítios sem proteínas das membranas foram bloqueados com leite em pó desnatado 5%, em tampão PBST, por 60 min, sob agitação. O anticorpo específico para cada proteína de interesse foi diluído em PBST e utilizado para a incubação das membranas overnight, sob agitação em geladeira a 4 °C. Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes, por 10 min, com PBST e incubada com anticorpo anti-IgG, conjugado com peroxidase de raiz forte, diluído 1:10000 em PBST, por 1 h, sob agitação em geladeira. A membrana foi lavada 3 vezes, por 10 min, com agitação. Uma solução de revelação composta por luminol, tampão Tris, ácido p-cumárico e peróxido de hidrogênio foi utilizada para umedecer as membranas. Os blots foram visualizados por revelação em filmes para raios-X ou por revelação em câmara escura acoplada a uma câmera fotográfica de alta resolução.

3.6 Conteúdo de RNAm

Dos RNA totais extraídos e quantificados, realizamos a transcrição reversa a partir de 1 µg de amostra. Para tanto, adicionamos 4 µl do tampão RT 5X, 1 µl de mistura de dNTP (10 mM cada nucleotídeo), 2,4 µl de solução de cloreto de magnésio (25 mM), 1 µl de transcriptase reversa [Improm (Promega)] e q.s.p. 20 µl de água ultrapura. Após agitação, a mistura foi mantida a 25 °C por 5 min e a transcrição reversa ocorreu através de aquecimento a 42 °C por 60 min, seguida da inativação da enzima por aquecimento a 70 °C por 15 min. A amplificação seguiu protocolo padrão de qPCR com SYBR Green (Kappa Bioscience): 2X Mastermix SYBR Green (6,25 µl por reação), 0,25 µl de primer sense (10 µM) e 0,25 µl de primer antisense (10 µM), 0,5 µl de cDNA e 5,25 µl de água ultra pura. Para a amplificação, essa mistura foi aquecida a 95 °C por 3 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação (95 °C, 3 s) e anelamento/extensão (60 °C, 30 s). A média geométrica dos CTs obtidos na análise de conteúdo de RNAm de RPL37 e de GAPDH foi utilizada para normalização dos resultados. A escolha desses dois genes se deu pela análise dos CTs de cinco diferentes genes constitutivos com o software geNorm v3.4 pautado no algoritmo proposto por Vandesompele et al. (2002). A quantificação da expressão relativa dos RNAm estudados foi feita utilizando a equação de cálculo do $\Delta\Delta C_t$.

3.7 Análise morfológica

Secções do fígado de animais neonatos foram fixadas em fixador Methacarn (60% metanol, 30% clorofórmio e 10% ácido clorídrico) por 4-12 horas, lavados e posteriormente mantidos em álcool 70% por cerca de uma semana. Após a fixação, o material passou por uma bateria de desidratação composta por uma lavagem de 1 hora em etanol 95%, três lavagens de 1 hora em etanol 100% e duas lavagens de 1 hora em xilol. Finalmente, as amostras foram mantidas em três banhos de 1 hora em parafina a 60 °C e foram incluídas em parafina usando formas de aço inox. Os blocos de parafina com os tecidos foram então desbastados em micrótomo automatizado [*Fully Automated Rotary Microtome* Leica RM2255 (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany)], removendo a sua região superficial. Posteriormente, cortes de 5 µm foram coletados em lâminas de vidro previamente higienizadas em álcool 70% e preparada com poli-l-lisina.

Para as colorações, as lâminas foram desparafinizadas com lavagens de 3 minutos de xilol, etanol 100%, etanol 95%, etanol 70% e água corrente.

3.7.1 *Hematoxilina e Eosina (HE)*

Para a coloração HE, lâminas contendo os cortes foram imersas em hematoxilina por 3 minutos, lavadas em água corrente por 5 minutos, diferenciadas rapidamente com solução 0,5% ácido clorídrico em álcool 70%, novamente lavadas com água corrente e contracoradas com eosina por 2 minutos. Posteriormente, os tecidos fixados foram novamente desidratados com uma bateria composta por etanol 95%, etanol 100%, xilol e xilol para montagem.

3.8 Marcadores séricos

3.8.1 *Glicose*

Para a determinação da concentração sérica de glicose, utilizou-se um kit comercial [Glicose PAP (Labtest diagnóstica, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil)] para a aquisição dos reagentes usados nas reações e seguiu-se o método determinado por Bergmeyer (1974). O procedimento seguiu a indicação do fabricante e a absorbância do produto final foi lida em espectrofotômetro (Shimadzu UV mini-1240, Shimadzu, Kyoto, Japan) em comprimento de onda de 505 nm. O aparelho foi previamente calibrado com um branco e a concentração de glicose foi calculada a partir dos resultados de absorbância dos testes e do padrão. Os testes para determinação de glicose foram realizados em duplicata.

3.8.2 *Triacilgliceróis*

Para a determinação da concentração sérica de triacilgliceróis, utilizou-se um kit colorimétrico comercial [Triglicérides Liquiform (Labtest)]. O procedimento seguiu a indicação do fabricante e a absorbância do produto final foi lida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 505 nm. O aparelho foi previamente calibrado com um branco e a concentração de triacilgliceróis foi calculada a partir dos resultados de absorbância dos testes e do padrão. Os testes para a determinação de triacilgliceróis foram realizados em duplicata.

3.8.3 *Colesterol total*

Para a determinação da concentração sérica de colesterol, utilizou-se um kit colorimétrico comercial [Colesterol total (Labtest)]. Após seguir as recomendações do

fabricante, a absorbância do produto final foi lida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 500 nm. O aparelho foi previamente zerado com um branco e a concentração de colesterol foi calculada a partir dos resultados de absorbância dos testes e do padrão. Os testes para a determinação de colesterol foram realizados em duplicata.

3.8.4 Proteínas totais

Para a determinação da concentração sérica de proteínas totais, foi utilizado um kit colorimétrico comercial [Proteínas totais (Labtest)] para aquisição dos reagentes usados nas reações. O procedimento seguiu a indicação do fabricante e a absorbância do produto final foi lida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 545 nm. O aparelho foi previamente zerado com um branco e a concentração de proteínas totais foi calculada a partir dos resultados de absorbância dos testes e do padrão.

3.8.5 Corticosterona

As concentrações plasmáticas de corticosterona foram avaliadas por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA) conforme especificações do fabricante [Corticosterona (Neogen, Lexington, KY, EUA)].

3.9 Testes de tolerância

3.9.1 Teste de tolerância à glicose

Para os testes de tolerância à glucose, os animais foram submetidos ao jejum noturno (aproximadamente 12 horas) e os procedimentos tiveram início às 9:00. Inicialmente, uma leve incisão foi feita na cauda dos animais e uma amostra de sangue foi coletada para análise da glicemia basal usando glicosímetro portátil [Performa Accu-Check (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Swiss)]. Foram injetadas 1,5 g/kg de glicose diluída em solução fisiológica (20%) via intraperitoneal e mais amostras de sangue foram coletadas para análise em 5, 10, 15, 30, 60 e 120 minutos após a injeção. Os dados foram plotados em um gráfico de dispersão e os resultados analisados como área sob a curva.

3.9.2 *Teste de tolerância à insulina*

Para os testes de tolerância à insulina, os animais foram submetidos ao jejum noturno (aproximadamente 12 horas) e os procedimentos tiveram início às 9:00. Inicialmente, uma leve incisão foi feita na cauda dos animais e uma amostra de sangue foi coletada para análise da glicemia basal usando glicosímetro. Para animais com 21 dias de vida, injetamos 0,5 U/kg de insulina diluída em solução fisiológica (0,1 U/kg), enquanto que, para animais adultos (90 dias), injetamos 2 U/kg de insulina diluída em solução fisiológica (0,01 U/ml). A solução contendo insulina foi injetada intraperitonealmente e amostras de sangue foram coletadas para determinação da glicemia em 15, 30, 45, 60 e 90 minutos após a injeção para animais no desmame, e em 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos para animais adultos. Os dados foram plotados em um gráfico de dispersão e os resultados interpretados como constante de decaimento da glicose.

3.9.3 *Teste de tolerância ao piruvato*

Para os testes de tolerância ao piruvato, os animais foram submetidos ao jejum noturno (aproximadamente 12 horas) e os procedimentos tiveram início às 9:00. Inicialmente, uma leve incisão foi feita na cauda dos animais e uma amostra de sangue foi coletada para análise da glicemia basal usando glicosímetro. 2 g/kg de piruvato diluído em solução fisiológica (200 mg/kg) foram injetados intraperitonealmente e mais amostras de sangue foram coletadas para análise em 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção. Os dados foram plotados em um gráfico de dispersão e os resultados analisados como área sob a curva.

3.10 **Secreção estática de insulina**

Grupos de 5 ilhotas foram pré-incubados em solução de Krebs Hanseleit (KH) adicionada de glicose (5,6 mM) por 30 minutos. Posteriormente, a solução foi retirada e substituída por soluções KH adicionada de 0,1% albumina bovina sérica contendo glicose nas concentrações 2,8 e 16, 7 mM. Após o período de incubação, 400 µl do sobrenadante foi removido e estocado a -20 °C. O conteúdo total de insulina nas ilhotas foi obtido após ruptura das ilhotas em solução etanol/água/ácido clorídrico v/v/v (52/17/1). A concentração de insulina nas soluções e cálculo da taxa de secreção foram aferidos após radioimunoensaio utilizando insulina marcada [¹²⁵I (PerkinElmer, Turku, Finlândia)].

Para o radioimunoensaio, uma quantidade conhecida de hormônio radioativamente marcado foi adicionada à solução obtida do ensaio de secreção. Quanto mais insulina não radioativa esteve presente, menos hormônios marcados se ligaram aos anticorpos. O complexo insulina anticorpo foi então precipitado com polietilenoglicol e dosado em contador gama (PerkinElmer, Turku, Finlândia). Uma curva padrão foi utilizada para a determinação de insulina nas amostras

3.11 Cultura de linhagens celulares

Células da linhagem HepG2, derivadas de hepatocarcinoma humano, foram mantidas em meio de cultura (DMEM, acrescido de 5,6 mM de glicose, 10% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina e 0,1 mg/ml de estreptomicina) em atmosfera com 5% CO₂, a 37 °C, até confluência aproximada de 90%.

3.11.1 Transfecção de oligonucleotídeos miméticos do hsa-miR-424-5P

Para as transfecções com o mimético do ortólogo do rno-miR-322-5P em humanos, o hsa-miR-424-5P, utilizamos dois kits de transfecção distintos. Em ambos os casos, o meio foi retirado e as células ressuspensas por ação de tripsina (0,25%) agindo por 6 minutos a 37 °C. Quando utilizamos o reagente de transfecção Lipofectamine® 2000 *Reagent* [(0,1%) Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos], neutralizamos a tripsina com mesmo volume de DMEM acrescido de 10% soro fetal bovino (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) e distribuímos $1,2 \times 10^6$ células em placa de cultura de 12 poços com volume final de 1000 µl de meio para cada poço. Após 1 dia de pré-tratamento, as células foram transfectadas com oligonucleotídeos miméticos do hsa-miR-424-5P (30 nm) ou com pequenos RNAs randômicos (30 nm) (Ambion mirVana™ miRNA mimic ID: MC10306 e mirVana™ miRNA mimic Negative Control #1, Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Para a transfecção usando o reagente Lipofectamine® RNAiMAX, as células foram transfectadas com os oligonucleotídeos no momento da distribuição das células na placa de cultura, não havendo pré-tratamento.

3.12 Análise fenotípica das células transfectadas

3.12.1 Índice de proliferação

Após a tripsinização, $1,2 \times 10^6$ células foram alocadas em tubo de experimentação de 15 ml com tampa e expostas a 5 μ M de éster succinimidil de carboxifluoresceína diacetato (CFSE), composto que se difunde passivamente para o meio intracelular. As células foram incubadas por 1 hora a 37 °C e centrifugadas a 450 g/5 min/25 °C. Posteriormente, elas foram ressuspensas com meio de cultura sem antibióticos e procedeu-se a transfecção com os miméticos do miR-424-5P usando-se Lipofectamine® RNAiMAX, como já descrito. Ao final do terceiro dia, as células foram tripsinizadas novamente e a fluorescência do CFSE em cada célula de um total de 30 mil contagens foi avaliada em citômetro de fluxo FACS Calibur no canal FL1. Os dados provenientes da citometria foram interpretados e representados graficamente através de *software* específico (Cell Quest). A partir dessa análise, determinamos o índice de proliferação de células transfectadas com o mimético do miR-424-5P ou com o controle negativo, em relação à taxa proliferativa de células não submetidas à transfecção.

3.12.2 Viabilidade celular

Ao final do terceiro dia de transfecção, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 450 g/5 min/25 °C. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* de células foi ressuspenso em 400 μ l de PBS acrescido de 40 μ l de tampão de viabilidade 10x. A fluorescência do iodeto de propídio em cada célula de um total de 10 mil contagens foi avaliada em citômetro de fluxo FACS Calibur em canal FL2. Os dados foram interpretados e representados graficamente pelo *software* Cell Quest.

3.12.3 Fragmentação do DNA

Durante a tripsinização descrita no tópico anterior, células expostas ao mesmo tratamento foram ressuspensas em 400 μ l de tampão de fragmentação, lisadas por pipetagem e mantidas em repouso a 25 °C por 90 minutos. A fluorescência do iodeto de propídio foi avaliada em citômetro de fluxo FACS Calibur em canal FL2. Os dados foram interpretados e representados graficamente pelo *software* Cell Quest.

3.13 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente por teste *T Student* ou, no caso de mais de duas variantes, utilizou-se Análise de Variância (ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para variantes com distribuição gaussiana). Em todos os resultados se adotou 5% como limite de significância estatística ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Ganho ponderal materno e da prole

Com base na figura 3, observamos que o ganho ponderal das ratas prenhes no período do último terço da gestação diferiu entre os grupos experimentais, de modo que o tratamento com 100 $\mu\text{g/kg}$ de dexametasona provocou menor ganho de massa do que o observado em animais controle. A administração de uma dose maior (200 $\mu\text{g/kg}$ peso corpóreo) provocou interrupção do ganho ponderal durante o período de tratamento.

Figura 3 – Tratamento com dexametasona reduz o ganho de massa corporal em ratas prenhes.

Ganho ponderal nos últimos 7 dias gestacionais de ratas prenhes tratadas (DEX100 e DEX200) ou não (CTL) com dexametasona na água de beber por 7 dias. CTL = controle, DEX100 = dexametasona (100 $\mu\text{g/kg}$ peso corpóreo/dia), DEX200 = dexametasona (200 $\mu\text{g/kg}$ peso corpóreo/dia). * $P < 0,05$; $N = 6$ a 8 .

Paralelamente à redução do ganho de peso gestacional, observamos que filhotes de matrizes tratadas com dexametasona apresentaram baixo peso ao nascer, denotando o efeito da dexametasona sobre a restrição do crescimento intrauterino (Figura 4).

Figura 4 – Prole de ratas tratadas com dexametasona durante a gestação exibe menor massa corporal.

Peso de filhotes de mães tratadas (DEX100 e DEX200) ou não (CTL) com dexametasona na água de beber por 7 dias. CTL = controle, DEX100 = dexametasona (100 µg/kg peso corpóreo/dia) DEX200 (200 µg/kg peso corpóreo/dia). $P<0,05$; Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes; N=10 a 18.

Adicionalmente, o ganho de peso de animais tratados intrauterinamente com 200 µg/kg de dexametasona foi inferior ao registrado em animais controle (Figura 5).

Figura 5 – Animais submetidos à restrição do crescimento intrauterino por excesso de glicocorticoides não exibem *catch up growth*.

Ganho ponderal individual de filhotes de ratas prenhes tratadas (DEX) ou não (CTL) com dexametasona na água de beber (200 µg/kg peso corpóreo/dia) por 7 dias. CTL = controle, DEX = dexametasona (200 µg/kg peso corpóreo/dia). * $P<0,05$; N=11 a 18.

4.2 Caracterização metabólica da prole em curto, médio e longo prazo

Uma vez constatado que os efeitos mais pronunciados na prole ocorreram entre animais tratados com a dose mais alta de dexametasona (200 $\mu\text{g/kg}$), decidimos estudar o perfil metabólico apenas desses animais.

A figura 6 exibe a regulação de alguns marcadores bioquímicos registrados em animais neonatos (1 dia de vida). A partir dela, podemos observar redução significativa nas concentrações de glicose e de triacilgliceróis em animais DEX.

Figura 6 – Animais submetidos à restrição do crescimento intrauterino por excesso de glicocorticoides apresentam menores concentrações de glicose e de triacilgliceróis ao nascer.

Concentrações séricas de glicose (A), proteínas totais (B), Triacilgliceróis (C) e colesterol total (D) em filhotes neonatos de ratas prenhes tratadas (DEX) ou não (CTL) com dexametasona na água de beber (200 $\mu\text{g/kg}$ peso corpóreo/dia) por 7 dias. CTL = controle, DEX = dexametasona (200 $\mu\text{g/kg}$ peso corpóreo/dia). * $P < 0,05$; $N = 3$ a 7.

No período do desmame, estudamos a tolerância dos animais à administração intraperitoneal de glicose, de insulina e de piruvato. Animais de ambos os sexos tratados com dexametasona apresentaram intolerância à glicose (Figura 7), mas não desenvolveram resistência à insulina (Figura 8). Quando desafiados com piruvato, animais machos do grupo

DEX apresentaram maior resposta glicêmica, indicando maior gliconeogênese do que os animais CTL (Figura 9).

Figura 7 – Ratos nascidos com baixo peso são intolerantes à glicose no período do desmame.

Teste de tolerância à glicose e área sob a curva de animais recém desmamados machos (A) e fêmeas provenientes (B) de ratas tratadas (DEX) ou não (CTL) com dexametasona na água de beber (200 µg/kg peso corpóreo/dia) por 7 dias. CTL = controle, DEX = dexametasona (200 µg/kg peso corpóreo/dia). * $P < 0,05$; N=3.

Figura 8 – Ratos que apresentam baixo peso ao nascer não exibem resistência à insulina no período do desmame.

Teste de tolerância à insulina e KITT de animais recém desmamados machos (A) e fêmeas provenientes (B) de ratas tratadas (DEX) ou não (CTL) com dexametasona na água de beber (200 µg/kg peso corpóreo/dia) por 7 dias. CTL = controle, DEX = dexametasona (200 µg/kg peso corpóreo/dia). * $P < 0,05$; $N = 3$.

Figura 9 - Ratos nascidos com baixo peso têm maior potencial gliconeogênico no desmame.

Teste de tolerância ao piruvato área sobre a curva de animais recém-desmamados machos provenientes de ratas tratadas (DEX) ou não (CTL) com dexametasona na água de beber (200 $\mu\text{g/kg}$ peso corpóreo/dia) por 7 dias. CTL = controle, DEX = dexametasona (200 $\mu\text{g/kg}$ peso corpóreo/dia). * $P < 0,05$; $N = 10$.

Semelhante ao observado em animais recém-desmamados (21 dias de vida), ratos machos expostos à dexametasona no período pré-natal continuaram intolerantes à glicose na vida adulta [90 dias de vida (Figura 10)], não desenvolveram resistência à insulina (Figura 11) e apresentam maior síntese de glicose a partir do piruvato (Figura 12).

Figura 10 – Ratos nascidos com baixo peso são intolerantes à glicose na vida adulta.

Teste de tolerância à glicose e área sobre a curva de animais adultos (90 d) machos provenientes de ratas tratadas (DEX) ou não (CTL) com dexametasona na água de beber (200 µg/kg peso corpóreo/dia) por 7 dias. CTL = controle, DEX = dexametasona (200 µg/kg peso corpóreo/dia). * $P < 0,05$; $N = 4$.

Figura 11 – Ratos que apresentam baixo peso ao nascer não exibem resistência à insulina na vida adulta.

Teste de tolerância à insulina e KITT de animais adultos (90 d) machos provenientes de ratas tratadas (DEX) ou não (CTL) com dexametasona na água de beber (200 µg/kg peso corpóreo/dia) por 7 dias. CTL = controle, DEX = dexametasona (200 µg/kg peso corpóreo/dia). * $P < 0,05$; $N = 5-6$.

Figura 12 – Ratos nascidos com baixo peso mantém o maior potencial gliconeogênico quando adultos.

Teste de tolerância ao piruvato e área sobre a curva de animais adultos (90 d) machos provenientes de ratas tratadas (DEX) ou não (CTL) com dexametasona na água de beber (200 µg/kg peso corpóreo/dia) por 7 dias. CTL = controle, DEX = dexametasona (200 µg/kg peso corpóreo/dia). * $P < 0,05$; $N = 6$.

Em relação às concentrações séricas de corticosterona, observamos valores superiores em animais adultos tratados com dexametasona quando comparados aos animais CTL (Figura 13).

Figura 13 – Animais DEX apresentam maiores concentrações de corticosterona plasmática na vida adulta.

Concentrações plasmáticas de animais adultos (90 d) machos provenientes de ratas tratadas (DEX) ou não (CTL) com dexametasona na água de beber (200 µg/kg peso corpóreo/dia) por 7 dias. CTL = controle, DEX = dexametasona (200 µg/kg peso corpóreo/dia). * $P < 0,05$; $N = 5-6$.

Apesar da alta concentração de corticosterona observada nos animais DEX, suas ilhotas não apresentaram alteração na taxa de secreção de insulina (Figura 14).

Figura 14 – Secreção de insulina induzida por glicose de ilhotas pancreáticas isoladas de ratos adultos não é afetada pelo tratamento precoce com dexametasona.

Taxa de secreção de insulina por ilhotas pancreáticas isoladas de animais adultos (90 d) machos provenientes de ratas tratadas (DEX) ou não (CTL) com dexametasona na água de beber (200 µg/kg peso corpóreo/dia) por 7 dias em resposta à exposição a diferentes concentrações de glicose. CTL = controle, DEX = dexametasona (200 µg/kg peso corpóreo/dia). N=4.

Dado que os animais estudados desenvolveram distúrbios metabólicos na vida adulta e que esse fenótipo parece estar associado com a capacidade metabólica do fígado, buscamos avaliar a funcionalidade desse órgão em animais adultos. Como o exposto na figura 15, os animais expostos à dexametasona no período pré-natal não apresentaram diferença na fosforilação da Akt, avaliada por *western blotting*, em resposta à infusão de insulina via veia porta. Todavia, a fosforilação do receptor de insulina em animais DEX esteve aumentada em condições basais e apresentou redução em 30 segundos após a infusão de insulina.

A expressão da PEPCK no fígado de ratos adultos DEX esteve reduzida (Figura 16A). Inversamente, após jejum noturno de 12 horas, a expressão desse gene foi alterada, de modo que animais DEX apresentaram regulação positiva (Figura 16C).

Figura 15 – Fosforilação da Akt no fígado de ratos adultos não é afetada pela exposição à dexametasona durante a gestação.

Conteúdo hepático de pAkt[Ser473]/Akt (A), taxa de fosforilação em tirosina do receptor de insulina no fígado (B) e figura representativa de blots (C) de animais adultos (90 d) machos provenientes de ratas tratadas (DEX) ou não (CTL) com dexametasona na água de beber (200 µg/kg peso corpóreo/dia) por 7 dias, submetidos a jejum de 12 horas com posterior infusão de insulina. CTL = controle, DEX = dexametasona (200 µg/kg peso corpóreo/dia), - = pré infusão, + = 30 segundos pós infusão. * P<0,05; ** P<0,01; N=4-8.

Figura 16 – Expressão da PEPCK no fígado é aumentada no jejum de ratos expostos à dexametasona durante a gestação.

Figura 12. Conteúdo hepático (A, C) e figura representativa de blots (B, D) de PEPCK de animais adultos (90 d) machos provenientes de ratas tratadas (DEX) ou não (CTL) com dexametasona na água de beber (200 µg/kg peso corpóreo/dia) por 7 dias em estado alimentado (A, B) ou submetidos a jejum de 12 horas (C, D). * $P < 0,05$; $N = 4-8$.

4.3 Morfologia do tecido hepático dos animais neonatos

Dado que os animais estudados desenvolveram distúrbios metabólicos na vida adulta e que esse fenótipo parece estar associado com a funcionalidade hepática, buscamos avaliar a morfologia e a funcionalidade desse órgão em animais neonatos.

A partir da tabela 1, podemos observar redução significativa do peso absoluto e relativo do fígado de animais DEX.

Tabela 1. Peso absoluto do fígado e peso relativo ao peso corporal de animais neonatos provenientes de ratas tratadas (DEX) ou não (CTL) com dexametasona na água de beber.

Grupo	CTL	DEX
Fígado (mg)	249,20 ± 15,14	132,30 ± 3,66***
Fígado (g/kg)	38,07 ± 2,21	27,86 ± 2,35*

CTL = controle, DEX = dexametasona (200 µg/kg peso corpóreo/dia); * P<0,05; *** P<0,001; N=4-11.

A figura 17 apresenta imagens representativas de cortes histológicos do fígado dos animais CTL e DEX, nas quais observamos aparente redução no acúmulo de células hematopoiéticas.

Figura 17 – Exposição ao excesso de glicocorticoides sintéticos durante último terço da gestação afeta a morfologia hepática no início da vida.

Figuras representativas de cortes histológicos do fígado de ratos CTL e DEX corados com hematoxilina e eosina. Setas brancas indicam acúmulo de células hematopoiéticas. CTL = controle, DEX = dexametasona (200 µg/kg peso corpóreo/dia).

4.4 Expressão de GR e atividade de seus alvos

Na figura 18 estão representados os resultados de conteúdo de GR, MKP1, MKP2 e de pERK no fígado dos animais neonatos. Destacamos a regulação positiva de GR e de MKP2, a tendência de aumento da expressão de MKP1 e a redução na fosforilação de ERK 1/2.

Figura 18 – Exposição à dexametasona durante último terço da gestação provoca aumento da expressão de GR e de genes por ele regulados no fígado de ratos neonatos.

Conteúdo de GR (A), de MKP1 (B), de MKP2 (C) e de pERK (D) no fígado de animais neonatos provenientes de ratas tratadas (DEX) ou não (CTL) com dexametasona na água de beber (100 e 200 μ g/kg peso corpóreo/dia) por 7 dias e figuras representativas dos blots obtidos (E). CTL = controle, DEX = dexametasona. * $P < 0,05$; $N = 4-8$.

4.5 Conteúdo de RNAm de genes associados à regulação metabólica, proliferativa e epigenética no tecido hepático dos animais neonatos

A figura 19 mostra a expressão de diversos genes associados à regulação metabólica e epigenética no fígado dos animais tratados intrauterinamente com dexametasona. Adicionalmente, foram estudados genes classicamente regulados por glicocorticoides, em

especial aqueles associados com a homeostasia celular e desenvolvimento tecidual, e genes associados à regulação da taxa de proliferação de hepatócitos.

Figura 19 – Exposição à dexametasona durante último terço da gestação afeta o conteúdo de RNAm de diversos genes envolvidos na homeostasia celular, no desenvolvimento tecidual, na regulação da taxa de proliferação de hepatócitos e no metabolismo de glicocorticoides.

Conteúdo de RNAm de genes escolhidos por sua importância biológica no fígado de animais neonatos machos provenientes de ratas tratadas (DEX) ou não (CTL) com dexametasona na água de beber (200 µg/kg peso corpóreo/dia) por 7 dias. CTL = controle, DEX = dexametasona (200 µg/kg peso corpóreo/dia). * P<0,05; N=3-5.

4.6 Expressão de miRNAs no tecido hepático da prole

Na análise de expressão em larga escala de miRNAs no tecido hepático da prole no primeiro dia de vida, identificamos alteração no perfil de expressão dessas moléculas (Figura 20) e regulação positiva na expressão de 46 e redução na de 23 transcritos em animais DEX (Tabela 2). Esses resultados estão em concordância com o maior conteúdo da enzima Dicer identificado no tecido estudado (Figura 21). Todavia, no intuito de prevenir a ocorrência de falsos positivos em nossa análise, excluímos quaisquer resultados provenientes do PCR array que apresentassem CT superior a 35. Com isso, observamos a regulação positiva de 25 e a regulação negativa de 15 genes de miRNAs. A partir da tabela 3, observamos esses dados dispostos segundo a magnitude de regulação, enquanto a tabela 4 ranqueia os miRNAs regulados segundo o grau de expressão.

Figura 20 – Exposição à dexametasona durante último terço da gestação altera o perfil de expressão de miRNAs no fígado de ratos neonatos.

Heat Map construído a partir dos resultados obtidos no PCR *array* de miRNAs de animais neonatos provenientes de ratas tratadas (DEX) ou não (CTL) com dexametasona na água de beber (200 µg/kg peso corpóreo/dia) por 7 dias. CTL = controle, DEX = dexametasona (200 µg/kg peso corpóreo/dia). * $P < 0,05$ em relação ao grupo controle; N=6.

Tabela 2. MiRNAs regulados positiva ou negativamente no tecido hepático de ratos neonatos tratados intrauterinamente com dexametasona.

Expressão aumentada		Expressão reduzida	
miRNA	<i>Fold increase</i>	miRNA	<i>Fold decrease</i>
<i>rno-miR-30c-2*</i>	68.11	rno-miR-1*	0.03
<i>rno-miR-218*</i>	37.53	<i>rno-miR-471</i>	0.06
<i>rno-miR-9</i>	34.95	rno-miR-344-5p	0.08
rno-miR-92b	22.47	rno-miR-24-1*	0.11
rno-miR-671	15.78	<i>rno-let-7c</i>	0.13
rno-miR-1224	13.74	<i>rno-miR-34c</i>	0.15
<i>rno-miR-204*</i>	13.18	rno-miR-363	0.15
<i>rno-miR-935</i>	11.39	<i>rno-miR-653</i>	0.17
rno-miR-345-5p	11.16	rno-miR-1	0.19
rno-miR-322	8.06	rno-miR-201	0.21
rno-miR-484	8	rno-miR-124	0.23
rno-miR-542-3p	7.57	rno-miR-99a*	0.25
rno-miR-874	7.46	rno-miR-32	0.26
rno-miR-139-3p	6.92	rno-miR-325-5p	0.26
rno-miR-450a	6.87	rno-miR-802	0.27
rno-miR-423	6.66	<i>rno-miR-24-2*</i>	0.28

rno-miR-667	6.53	rno-miR-483	0.3
rno-miR-29a*	6.19	rno-miR-421	0.3
<i>rno-miR-489</i>	6.19	<i>rno-miR-708*</i>	0.3
rno-miR-877	6.11	<i>rno-let-7i*</i>	0.32
<i>rno-miR-412</i>	6.02	<i>rno-miR-297</i>	0.32
rno-miR-664	5.64	rno-miR-449a	0.32
<i>rno-miR-196a*</i>	5.46	rno-miR-220	0.33
rno-miR-153	5.21		
rno-miR-322*	5.13		
rno-miR-182	4.76		
rno-miR-370	4.72		
<i>rno-miR-196b</i>	4.66		
rno-miR-503	4.56		
<i>rno-miR-330</i>	4.26		
rno-miR-351	4.14		
<i>rno-miR-96</i>	4		
rno-miR-187	3.99		
rno-miR-341	3.94		
rno-miR-327	3.89		
rno-miR-760-5p	3.78		
rno-miR-212	3.68		
rno-miR-186	3.48		
rno-miR-666	3.48		
<i>rno-let-7b*</i>	3.41		
<i>rno-miR-743b</i>	3.27		
<i>rno-miR-204</i>	3.25		
<i>rno-miR-880</i>	3.2		
<i>rno-miR-196a</i>	3.12		
<i>rno-miR-29c*</i>	3.11		
<i>rno-miR-10b</i>	3.07		
rno-miR-542-5p	3.05		

MiRNAs identificados em negrito representam aqueles em cuja análise por PCR *array* identificamos CT superior a 35.

Tabela 3. MiRNAs regulados positiva ou negativamente no tecido hepático de ratos neonatos tratados intrauterinamente com dexametasona segundo a amplitude de regulação.

Expressão aumentada		Expressão reduzida	
miRNA	<i>Fold increase</i>	miRNA	<i>Fold decrease</i>
rno-miR-92b	22.47	rno-miR-1*	0.03
rno-miR-671	15.78	rno-miR-344-5p	0.08
rno-miR-1224	13.74	rno-miR-24-1*	0.11
rno-miR-345-5p	11.16	rno-miR-363	0.15
rno-miR-322-5P	8.06	rno-miR-1	0.19
rno-miR-484	8	rno-miR-201	0.21
rno-miR-542-3p	7.57	rno-miR-124	0.23
rno-miR-874	7.46	rno-miR-99a*	0.25
rno-miR-139-3p	6.92	rno-miR-32	0.26
rno-miR-450a	6.87	rno-miR-325-5p	0.26
rno-miR-423	6.66	rno-miR-802	0.27
rno-miR-667	6.53	rno-miR-483	0.3
rno-miR-29a*	6.19	rno-miR-421	0.3
rno-miR-877	6.11	rno-miR-449a	0.32
rno-miR-664	5.64	rno-miR-220	0.33
rno-miR-153	5.21		
rno-miR-322-3P	5.13		
rno-miR-182	4.76		
rno-miR-370	4.72		
rno-miR-503	4.56		
rno-miR-351	4.14		
rno-miR-187	3.99		
rno-miR-341	3.94		
rno-miR-327	3.89		
rno-miR-760-5p	3.78		
rno-miR-212	3.68		
rno-miR-186	3.48		
rno-miR-666	3.48		
rno-miR-542-5p	3.05		

Tabela 4. MiRNAs regulados positiva ou negativamente no tecido hepático de ratos neonatos tratados intrauterinamente com dexametasona segundo o grau de expressão calculado por qPCR.

Expressão aumentada		Expressão reduzida	
miRNA	<i>Fold increase</i>	miRNA	<i>Fold decrease</i>
rno-miR-1224	13.74	rno-miR-483	0.3
rno-miR-322	8.06	rno-miR-201	0.21
rno-miR-212	3.68	rno-miR-449a	0.32
rno-miR-345-5p	11.16	rno-miR-124	0.23
rno-miR-450a	6.87	rno-miR-32	0.26
rno-miR-667	6.53	rno-miR-802	0.27
rno-miR-666	3.48	rno-miR-325-5p	0.26
rno-miR-760-5p	3.78	rno-miR-1*	0.03
rno-miR-92b	22.47	rno-miR-1	0.19
rno-miR-322*	5.13	rno-miR-344-5p	0.08
rno-miR-671	15.78	rno-miR-99a*	0.25
rno-miR-874	7.46	rno-miR-24-1*	0.11
rno-miR-664	5.64	rno-miR-220	0.33
rno-miR-877	6.11	rno-miR-363	0.15
rno-miR-139-3p	6.92	rno-miR-421	0.3
rno-miR-341	3.94		
rno-miR-187	3.99		
rno-miR-542-3p	7.57		
rno-miR-484	8		
rno-miR-182	4.76		
rno-miR-542-5p	3.05		
rno-miR-370	4.72		
rno-miR-351	4.14		
rno-miR-186	3.48		
rno-miR-423	6.66		
rno-miR-503	4.56		
rno-miR-327	3.89		
rno-miR-153	5.21		
rno-miR-29a*	6.19		

Figura 21 – Animais com restrição no crescimento intrauterino exibem maior expressão de Dicer no fígado.

Conteúdo de Dicer no fígado de animais neonatos provenientes de ratas tratadas (DEX) ou não (CTL) com dexametasona na água de beber (200 µg/kg peso corpóreo/dia) por 7 dias e figuras representativas dos blots obtidos (B). CTL = controle, DEX = dexametasona. * $P < 0,05$; $N = 6$.

A figura 22 apresenta os dados referentes à validação dos miRNAs componentes do cluster policistrônico do miR-322-5P. Como pode ser observado, todos os resultados foram validados tanto em animais tratados com a dose mais baixa de dexametasona, quanto nos que foram tratados com a dose mais alta no período intrauterino.

Figura 22 – *Cluster* do miR-322 é regulado positivamente no fígado de ratos neonatos com RCIU.

Conteúdo de componentes do cluster miR-322 no fígado de animais neonatos provenientes de ratas tratadas (DEX) ou não (CTL) com dexametasona na água de beber (200 µg/kg peso corpóreo/dia) por 7 dias. CTL = controle, DL = dexametasona (100 µg/kg peso corpóreo/dia), DH (200 µg/kg peso corpóreo/dia). $P < 0,05$; Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes; $N = 3-5$.

Na figura 23 está representada a expressão relativa dos diferentes miRNAs estudados em animais DEX. A partir dela, observamos maior expressão do miR-322-5P do que dos demais transcritos estudados.

Figura 23 – MiR-322 é o mais expresso entre os componentes do *cluster*.

Esquema ilustrativo da diferença relativa no conteúdo dos miRNAs do cluster estudado no fígado de animais neonatos provenientes de ratas tratadas com dexametasona na água de beber (200 µg/kg peso corpóreo/dia) por 7 dias.

4.7 Expressão de alvos preditos do miR-322-5P e de PCNA

A busca por alvos putativos para o rno-miR-322-5P no algoritmo *on line Target Scan* (release 6,2) resultou nas figuras 24, 25 e 26, nas quais estão representados os sítios de ligação conservados entre diferentes espécies, o tipo de complementariedade e a *probability of conserved targeting* (P_{CT}) atribuídos entre os componentes da família do miR-322-5P e os RNAm de CCND1, de Akt3 e de INSR, respectivamente.

Figura 24 – CCND1 é alvo do miR-322-5P.

Conserved

		predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	seed match	site-type contribution	3' pairing contribution	local AU contribution	position contribution	TA contribution	SPS contribution	context+ score	context+ score percentile	conserved branch length	P _{CT}
Position 1787-1793 of CCND1 3' UTR	5'	...GGCUCUUUACAGC--GCUGCUA...	7mer-1A	-0.074	-0.013	0.050	0.060	0.019	-0.066	-0.02	14	2.790	0.84
mo-miR-497	3'	 AUGUUUGGUGUACACGACGAC											
Position 1787-1793 of CCND1 3' UTR	5'	...GGCUCUUUACAGCGCUGCUA...	7mer-1A	-0.074	-0.006	0.050	0.060	0.019	-0.066	-0.02	14	2.790	0.84
mo-miR-195	3'	 CGGUUAUAAAGACA--CGACGAU											
Position 1787-1793 of CCND1 3' UTR	5'	...GGCUCUUUACAGCGCUGCUA...	7mer-1A	-0.074	-0.002	0.050	0.060	0.019	-0.066	-0.01	13	2.790	0.84
mo-miR-16	3'	 GCGGUUAUAAUGCAGCAGAU											
Position 1787-1793 of CCND1 3' UTR	5'	...GGCUCUUUACAGCGCUGCUA...	7mer-1A	-0.074	0.001	0.050	0.060	0.019	-0.066	-0.01	11	2.790	0.84
mo-miR-322	3'	 AGGUUUUGUACUUAACGACGAC											
Position 1787-1793 of CCND1 3' UTR	5'	...GGCUCUUUACAGCGCUGCUA...	7mer-1A	-0.074	0.001	0.050	0.060	0.019	-0.066	-0.01	11	2.790	0.84
mo-miR-15b	3'	 ACAUUUGGUACUACACGACGAU											
Position 1864-1870 of CCND1 3' UTR	5'	...UUUCAUGUUGUUUUGCUGCUAU...	7mer-1A	-0.074	-0.002	-0.023	0.051	0.019	-0.066	-0.10	43	2.899	0.84
mo-miR-16	3'	 GCGGUUAUAAUGCAGCAGAU											
Position 1864-1870 of CCND1 3' UTR	5'	...UUUCAUGUUGUUUUGCUGCUAU...	7mer-1A	-0.074	-0.002	-0.023	0.051	0.019	-0.066	-0.10	42	2.899	0.84
mo-miR-195	3'	 CGGUUAUAAAGACAACGACGAU											
Position 1864-1870 of CCND1 3' UTR	5'	...UUUCAUGUUGUUUUGCUGCUAU...	7mer-1A	-0.074	-0.002	-0.023	0.051	0.019	-0.066	-0.10	40	2.899	0.84
mo-miR-322	3'	 AGGUUUUGUACUUAACGACGAC											
Position 1864-1870 of CCND1 3' UTR	5'	...UUUCAUGUUGUUUUGCUGCUAU...	7mer-1A	-0.074	-0.002	-0.023	0.051	0.019	-0.066	-0.10	39	2.899	0.84
mo-miR-15b	3'	 ACAUUUGGUACUACACGACGAU											
Position 1864-1870 of CCND1 3' UTR	5'	...UUUCAUGUUGUUUUGCUGCUAU...	7mer-1A	-0.074	0.008	-0.023	0.051	0.019	-0.066	-0.09	35	2.899	0.84
mo-miR-497	3'	 AUGUUUGGUGUACACGACGAC											

Context+ score and features that contribute to the context+ score are evaluated as in Garcia et al., 2011.
Conserved branch lengths and P_{CT} are evaluated as in Friedman et al., 2008.

Esquema ilustrativo dos possíveis sítios de ligação dos componentes da família miR-322-5P na região 3'UTR do RNAm que codifica ciclina D1.

Figura 25 – Akt3 é alvo putativo do miR-322-5P.

Conserved

		predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	seed match	site-type contribution	3' pairing contribution	local AU contribution	position contribution	TA contribution	SPS contribution	context+ score	context+ score percentile	conserved branch length	P _{CT}
Position 231-238 of AKT3 3' UTR	5'	...AAGGUCUCAUGCUGUUGCUGCUA...	8mer	-0.247	-0.029	-0.002	-0.056	0.032	-0.085	-0.39	98	1.149	0.28
mo-miR-322	3'	 AGGUUUUGUACUUA--ACGACGAC											
Position 231-238 of AKT3 3' UTR	5'	...AAGGUCUCAUGCUGUUGCUGCUA...	8mer	-0.247	-0.029	-0.002	-0.056	0.032	-0.085	-0.39	98	1.149	0.28
mo-miR-15b	3'	 ACAUUUGGUACUAC--ACGACGAU											
Position 231-238 of AKT3 3' UTR	5'	...AAGGUCUCAUGCUGUUGCUGCUA...	8mer	-0.247	0.003	-0.002	-0.056	0.032	-0.085	-0.36	97	1.149	0.28
mo-miR-497	3'	 AUGUUUGGUGUACACGACGAC											
Position 231-238 of AKT3 3' UTR	5'	...AAGGUCUCAUGCUGUUGCUGCUA...	8mer	-0.247	0.003	-0.002	-0.056	0.032	-0.085	-0.36	97	1.149	0.28
mo-miR-16	3'	 GCGGUUAUAAUGCAGCAGAU											
Position 231-238 of AKT3 3' UTR	5'	...AAGGUCUCAUGCUGUUGCUGCUA...	8mer	-0.247	0.003	-0.002	-0.056	0.032	-0.085	-0.36	97	1.149	0.28
mo-miR-195	3'	 CGGUUAUAAAGACAACGACGAU											
Position 2883-2890 of AKT3 3' UTR	5'	...UCAGUGUACACACUUUGCUGCUA...	8mer	-0.247	-0.029	0.024	0.265	0.032	-0.085	-0.04	19	1.593	0.71
mo-miR-497	3'	 AUGUUUGGUGUACACGACGAC											
Position 2883-2890 of AKT3 3' UTR	5'	...UCAGUGUACACACUUUGCUGCUA...	8mer	-0.247	-0.018	0.024	0.265	0.032	-0.085	-0.03	16	1.593	0.71
mo-miR-322	3'	 AGGUUUUGUACUUAACGACGAC											
Position 2883-2890 of AKT3 3' UTR	5'	...UCAGUGUACACACUUUGCUGCUA...	8mer	-0.247	0.003	0.024	0.265	0.032	-0.085	> -0.03	12	1.593	0.71
mo-miR-16	3'	 GCGGUUAUAAUGCAGCAGAU											
Position 2883-2890 of AKT3 3' UTR	5'	...UCAGUGUACACACUUUGCUGCUA...	8mer	-0.247	0.003	0.024	0.265	0.032	-0.085	> -0.03	11	1.593	0.71
mo-miR-195	3'	 CGGUUAUAAAGACAACGACGAU											
Position 2883-2890 of AKT3 3' UTR	5'	...UCAGUGUACACACUUUGCUGCUA...	8mer	-0.247	0.003	0.024	0.265	0.032	-0.085	> -0.03	11	1.593	0.71
mo-miR-15b	3'	 ACAUUUGGUACUACACGACGAU											

Context+ score and features that contribute to the context+ score are evaluated as in Garcia et al., 2011.
Conserved branch lengths and P_{CT} are evaluated as in Friedman et al., 2008.

Esquema ilustrativo dos possíveis sítios de ligação dos componentes da família miR-322-5P na região 3'UTR do RNAm que codifica Akt3.

Figura 26 – INSR é alvo putativo do miR-322-5P.

Conserved

		predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	seed match	site-type contribution	3' pairing contribution	local AU contribution	position contribution	TA contribution	SPS contribution	context+ score	context+ score percentile	conserved branch length	PCT
Position 609-615 of INSR 3' UTR	5'	...AAAUUGACCAAUAGCUGCUGCU... 	7mer-m8	-0.120	-0.025	-0.032	0.024	0.019	-0.048	-0.18	78	2.643	0.75
mo-miR-497	3'	AUGUUUGGUGUCACACGACGAC											
Position 609-615 of INSR 3' UTR	5'	...AAAUUGACCAAUAGCUGCUGCU... 	7mer-m8	-0.120	-0.025	-0.032	0.024	0.019	-0.048	-0.18	77	2.643	0.75
mo-miR-15b	3'	ACAUUUGGUGUCACACGACGAC											
Position 609-615 of INSR 3' UTR	5'	...AAAUUGACCAAUAGCUGCUGCU... 	7mer-m8	-0.120	-0.016	-0.032	0.024	0.019	-0.048	-0.17	76	2.643	0.75
mo-miR-16	3'	GCGGUUAUAAAUAGCAGACGAC											
Position 609-615 of INSR 3' UTR	5'	...AAAUUGACCAAUAGCUGCUGCU... 	7mer-m8	-0.120	-0.016	-0.032	0.024	0.019	-0.048	-0.17	75	2.643	0.75
mo-miR-195	3'	GCGGUUAUAAAUAGCAGACGAC											
Position 609-615 of INSR 3' UTR	5'	...AAAUUGACCAAUAGCUGCUGCU... 	7mer-m8	-0.120	0.003	-0.032	0.024	0.019	-0.048	-0.15	68	2.643	0.75
mo-miR-322	3'	AGGUUUUGUACUUAACGACGAC											
Position 1280-1286 of INSR 3' UTR	5'	...AAUUAUACCAAUUA-GCUGCUAG... 	7mer-1A	-0.074	-0.020	0.004	0.090	0.019	-0.066	-0.05	21	2.512	0.83
mo-miR-497	3'	AUGUUUGGUGUCACACGACGAC											
Position 1280-1286 of INSR 3' UTR	5'	...AAUUAUACCAAUUA-GCUGCUAG... 	7mer-1A	-0.074	-0.002	0.004	0.090	0.019	-0.066	-0.03	17	2.512	0.83
mo-miR-16	3'	GCGGUUAUAAAUAGCAGACGAC											
Position 1280-1286 of INSR 3' UTR	5'	...AAUUAUACCAAUUA-GCUGCUAG... 	7mer-1A	-0.074	-0.009	0.004	0.090	0.019	-0.066	-0.04	17	2.512	0.83
mo-miR-322	3'	AGGUUUUGUACUUAACGACGAC											
Position 1280-1286 of INSR 3' UTR	5'	...AAUUAUACCAAUUA-GCUGCUAG... 	7mer-1A	-0.074	-0.002	0.004	0.090	0.019	-0.066	-0.03	17	2.512	0.83
mo-miR-195	3'	GCGGUUAUAAAUAGCAGACGAC											
Position 1280-1286 of INSR 3' UTR	5'	...AAUUAUACCAAUUA-GCUGCUAG... 	7mer-1A	-0.074	-0.009	0.004	0.090	0.019	-0.066	-0.04	17	2.512	0.83
mo-miR-15b	3'	ACAUUUGGUGUCACACGACGAC											
Position 4388-4392 of INSR 3' UTR	5'	...UCUUUGUAUCAAAGUGUGCUGC... 	7mer-m8	-0.120	-0.016	-0.007	-0.023	0.019	-0.048	-0.20	81	2.036	0.72
mo-miR-16	3'	GCGGUUAUAAAUAGC-ACGACGAC											
Position 4388-4392 of INSR 3' UTR	5'	...UCUUUGUAUCAAAGUGUGCUGC... 	7mer-m8	-0.120	-0.016	-0.007	-0.023	0.019	-0.048	-0.20	81	2.036	0.72
mo-miR-195	3'	GCGGUUAUAAAUAGC-ACGACGAC											
Position 4388-4392 of INSR 3' UTR	5'	...UCUUUGUAUCAAAGUGUGCUGC... 	7mer-m8	-0.120	0.003	-0.007	-0.023	0.019	-0.048	-0.18	76	2.036	0.72
mo-miR-497	3'	AUGUUUGGUGUCACACGACGAC											
Position 4388-4392 of INSR 3' UTR	5'	...UCUUUGUAUCAAAGUGUGCUGC... 	7mer-m8	-0.120	0.003	-0.007	-0.023	0.019	-0.048	-0.18	75	2.036	0.72
mo-miR-15b	3'	ACAUUUGGUGUCACACGACGAC											
Position 4388-4392 of INSR 3' UTR	5'	...UCUUUGUAUCAAAGUGUGCUGC... 	7mer-m8	-0.120	0.003	-0.007	-0.023	0.019	-0.048	-0.18	75	2.036	0.72
mo-miR-322	3'	AGGUUUUGUACUUAACGACGAC											

Context+ score and features that contribute to the context+ score are evaluated as in Garcia et al., 2011.
Conserved branch lengths and PCT are evaluated as in Friedman et al., 2008.

Esquema ilustrativo dos possíveis sítios de ligação dos componentes da família miR-322-5P na região 3'UTR do RNAm que codifica o receptor de insulina.

A figura 27 apresenta os resultados obtidos com a análise de conteúdo de AKT3, INSR e CCND1 no fígado dos ratos neonatos. Para todos os genes, detectamos menor expressão em resposta à exposição precoce à dexametasona.

A análise de conteúdo de PCNA no fígado dos neonatos também indicou regulação negativa em resposta à exposição à droga (figura 28).

Figura 27 – Expressão de genes alvo do miR-322-5P é reduzida no fígado de animais DEX ao nascer.

Conteúdo de INSR (A), de Akt3 (B) e de CCND1 (C) no fígado de animais neonatos provenientes de ratas tratadas (DEX) ou não (CTL) com dexametasona na água de beber (100 e 200 $\mu\text{g/kg}$ peso corpóreo/dia) por 7 dias e figuras representativas dos blots obtidos (D). CTL = controle, DEX = dexametasona. * $P < 0,05$; N=7-8.

Figura 28 – Expressão de PCNA no fígado de ratos neonatos é reduzida com a exposição intrauterina à dexametasona.

Conteúdo de PCNA (A) no fígado de animais neonatos provenientes de ratas tratadas (DEX) ou não (CTL) com dexametasona na água de beber (200 $\mu\text{g/kg}$ peso corpóreo/dia) por 7 dias e figuras representativas dos blots obtidos (B). CTL = controle, DEX = dexametasona. * $P < 0,05$; N=7-8.

Posteriormente, o conteúdo hepático dos mesmos miRNAs investigados no fígado de ratos neonatos foi avaliado na vida adulta de animais machos tratados com a dose mais alta de dexametasona (200 $\mu\text{g/kg}$). Observamos que houve redução significativa destes, com exceção

dos dois transcritos do miR-542 (Figura 29). Quando analisada a expressão de dois genes possivelmente regulados pela expressão do miR-322-5P no fígado dos animais adultos (CCND1 e HIF-1 α), observamos que apenas a expressão de HIF-1 α , um alvo indireto do miR-322-5P/-424-5P validado experimentalmente em estudos anteriores foi reprogramada pelo tratamento precoce com dexametasona (Figura 30).

Figura 29 – Expressão de componentes do *cluster* do miR-322 no fígado de ratos adultos também sofre efeito da exposição precoce a glicocorticoides.

Conteúdo de miRNA no fígado de animais adultos machos provenientes de ratas tratadas (DEX) ou não (CTL) com dexametasona na água de beber (200 μ g/kg peso corpóreo/dia) por 7 dias. CTL = controle, DEX = dexametasona (200 μ g/kg peso corpóreo/dia). * P<0,05; N=3-5.

Figura 30 – Expressão de CCND1 não é afetada pela regulação do miR-322-5P no fígado de ratos adultos.

Conteúdo de CCND1 (A) e de HIF-1 α (B) no fígado de animais neonatos provenientes de ratas tratadas (DEX) ou não (CTL) com dexametasona na água de beber (200 μ g/kg peso corpóreo/dia) por 7 dias e figuras representativas dos blots obtidos (C). CTL = controle, DEX = dexametasona. * P<0,05; N=7-8.

A análise do miR-322-5P ainda apresentou regulação em resposta a um jejum prolongado [60 horas (Figura 31)].

Figura 31 – Expressão de miR-322-5P em fígados de ratos expostos precocemente a glicocorticoides sofre efeito da exposição ao jejum prolongado.

Conteúdo de miR-322-5P no fígado de animais adultos machos provenientes de ratas tratadas (DEX) ou não (CTL) com dexametasona na água de beber (200 µg/kg peso corpóreo/dia) por 7 dias, submetidos a um jejum curto (12 horas) ou prolongado (60 horas). CTL = controle, DEX = dexametasona (200 µg/kg peso corpóreo/dia). * $P < 0,05$; $N = 4-6$.

4.8 Transfecção de HEPG2 com miméticos do miR-424-5P

Para avaliar a importância da superexpressão do miR-424-5P sobre o fenótipo de hepatócitos, vários experimentos foram conduzidos em uma linhagem de hepatocarcinoma humano (HEPG2) transfectada com o mimético do ortólogo do miR-322-5P em humanos, o miR-424-5P. Como é possível observar na figura 32, o índice de proliferação das células HEPG2 transfectadas com o mimético do miR-424-5P foi reduzido quando comparado àquelas transfectadas com RNA *scramble* após 3 dias de tratamento. A escolha por manter as células transfectadas por três dias baseou-se em um experimento prévio que demonstrou maior regulação de HIF-1 α nesse período (Figura 33).

Figura 32 – Superexpressão do miR-424-5P reduz a taxa proliferativa de células HEPG2.

Figura representativa da fluorescência de CFSE em células HEPG2 não transfectadas (CTL), transfectadas com 30 nM miRNA *scramble* (NC) ou transfectadas com 30 nM Hsa-miR-424-5P *mimic* (424) (A). Índice de proliferação relativo ao CTL de células HEPG2 transfectadas com miRNA *scramble* (NC *mimic*) ou transfectadas com o mimético do Hsa-miR-424-5P (miR-424-5P *mimic*) (B). CTL = controle. * $P < 0,05$; N=4.

Figura 33 – HIF-1 α é regulada positivamente em células HEPG2 após 72 horas de transfecção com mimético do hsa-miR-424-5P

Figura representativa dos blots de HIF1 α de células HEPG2 transfectadas com 3 ou 30 nM miRNA *scramble* (Mimic-NC) ou transfectadas com 3 ou 30 nM Hsa-miR-424-5P *mimic* (Mimic-424-5P). N=1.

Na análise da expressão das proteínas alvo do miR-322/424-5P, observamos redução significativa da expressão do receptor de insulina e tendência para redução da expressão de Akt3 e de ciclina D1 em células HEPG2 transfectadas com o mimético desse transcrito (Figura 34).

Figura 34 – Superexpressão do miR-424-5P regula negativamente a expressão de seus alvos preditos.

Conteúdo de INSR (A), de Akt3 (B) e de CCND1 (C) em células HEPG2 não transfectadas (CTL), transfectadas com 30 nM miRNA *scramble* (NC) ou transfectadas com 30 nM Hsa-miR-424-5P *mimic* (424) e figuras representativas dos blots obtidos (D). * $P < 0,05$; N=2-4.

A partir da figura 35, observamos aumento da fluorescência média emitida por iodeto de propídio, bem como aumento do volume celular avaliado por citometria de fluxo em células HEPG2 transfectadas com o mimético do miR-424-5P. Todavia, não observamos alteração qualitativa na viabilidade celular. O resultado quantitativo é proveniente de seis experimentos independentes.

Figura 35 – Superexpressão do miR-424-5P afeta o fenótipo celular.

Figura representativa da fluorescência de PI em células HEPG2 transfectadas com 30 nM miRNA *scramble* (NC) ou transfectadas com 30 nM Hsa-miR-424-5P *mimic* (424) (A). Média geométrica da intensidade da fluorescência de PI em células HEPG2 transfectadas com miRNA *scramble* (NC *mimic*) ou transfectadas com o mimético do Hsa-miR-424-5P (miR-424-5P *mimic*) (B). Figuras representativas do *density plot* relativo ao tamanho (FSC – eixo x) e à granulosidade (SSC – eixo y) celular de HEPG2 transfectadas com miRNA *scramble* [NC *mimic* (C)] ou com o mimético do Hsa-miR-424-5P [miR-424-5P *mimic* (D)]. * $P < 0,05$; N=6.

Apesar da redução na taxa de proliferação e a alteração do fenótipo observados em resposta ao tratamento com o mimético do miR-424-5P, não detectamos alteração na fragmentação de DNA nessas células (Figura 36). O resultado quantitativo é proveniente de seis experimentos independentes.

Figura 36 – Superexpressão do miR-424-5P não provoca fragmentação do DNA em células HEPG2.

Figura representativa da fluorescência de PI em células HEPG2 lisadas, previamente transfectadas com 30 nM miRNA *scramble* (NC) ou com 30 nM Hsa-miR-424-5P *mimic* (424) (A). Taxa de fragmentação de DNA de células HEPG2 transfectadas com miRNA *scramble* (NC *mimic*) ou com o mimético do Hsa-miR-424-5P (miR-424-5P *mimic*) (B). * $P < 0,05$; N=6.

Ao analisarmos o efeito da dexametasona e da privação de soro fetal bovino sobre o padrão de expressão do miR-424-5P em células HEPG2, não observamos alteração significativa nos diferentes tratamentos (Figura 37). O resultado quantitativo é proveniente de três experimentos independentes.

Figura 37 – Exposição à dexametasona e à privação de soro fetal bovino não afeta a expressão do miR-424-5P em células HEPG2.

Conteúdo de miR424-5P em células HEPG2 tratadas ou não com dexametasona (1 μ M) e que foram ou não privadas de soro fetal bovino (10%). SFB = soro fetal bovino. * $P < 0,05$; N=3.

Após verificarmos o efeito da transfecção com o mimético do miRNA estudado, verificamos o efeito direto da dexametasona sobre a proliferação de HEPG2. Como pode ser observado na figura 38, não houve influência do GC sobre o índice de proliferação das células.

Figura 38 – Tratamento com dexametasona não afeta efeitos provocados pela superexpressão do miR-424-5P sobre a taxa proliferativa de células HEPG2.

Figura representativa da fluorescência de CFSE em células HEPG2 não transfectadas (CTL), transfectadas com 30 nM miRNA *scramble* (NC) ou transfectadas com 30 nM Hsa-miR-424-5P *mimic* (424) (A). Índice de proliferação relativo ao CTL de células HEPG2 transfectadas com miRNA *scramble* (NC *mimic*) ou transfectadas com o mimético do Hsa-miR-424-5P (miR-424-5P *mimic*) (B). CTL = controle, DEX = dexametasona (1 μ M). * $P < 0,05$; N=4.

5 DISCUSSÃO

A exposição ao estresse farmacológico durante o período fetal provoca comprometimento do crescimento corporal e de alguns órgãos em detrimento a outros. Com este trabalho, buscamos contribuir para a elucidação dos mecanismos envolvidos no prejuízo do desenvolvimento hepático em resposta à RCIU induzida por excesso de glicocorticoides.

Inicialmente, observamos que a administração de dexametasona – um glicocorticoide sintético amplamente utilizado para o combate de doenças autoimunes e condições inflamatórias – na água de beber dos animais experimentais durante o último terço da gestação induziu a RCIU e o consequente baixo peso ao nascer. Esse efeito já foi anteriormente documentado e reflete, entre outros fatores, a ação direta do GC nos tecidos e a redução no aporte de substrato para o feto em formação, devido à menor capacidade de transporte de nutrientes pela barreira hemato-placentária e à menor vascularização de tecidos periféricos (DUMORTIER et al., 2011; MCMILLEN; ROBINSON, 2005; WYRWOLL et al., 2008). Um exemplo desse fenômeno é a redução no aporte de glicose provocada por menor expressão de GLUT3 na placenta, bem como pela redução na massa desse tecido (WYRWOLL et al., 2008).

Assim como em outros estudos com administração de dexametasona via água de beber, os animais tratados não apresentaram o ganho de peso excessivo pós-útero, característico de estudos epidemiológicos de RCIU, e sempre apresentaram massa corporal reduzida em relação aos animais controle (WADDELL et al., 2010). Geralmente, o ganho de peso excessivo durante o crescimento envolve a exposição a um ambiente obesogênico, com condições ambientais que incluam baixo índice de atividade física e consumo excessivo de alimentos ricos em ácidos graxos saturados e em carboidratos de alto índice glicêmico (OZANNE et al., 2004). Ademais, Hermann et al. (2009) descreveu que 50% dos camundongos expostos a uma dieta materna pobre em proteínas passam pelo *catch up growth* no período neonatal, e que este ainda previne o ganho de peso excessivo na vida adulta quando da exposição a uma dieta hiperlipídica.

Todavia, o retardo no crescimento fetal, mesmo na ausência de ganho de peso excessivo, é geralmente acompanhado de distúrbios metabólicos e de hipercorticosteronemia em longo prazo (HERMANN et al., 2009; WADDELL et al., 2010). No presente trabalho, observamos a reprogramação fisiológica e metabólica da prole DEX, caracterizadas por maiores concentrações plasmáticas de corticosterona e por menor tolerância à glicose na vida adulta. A alteração no padrão da curva glicêmica após a infusão intraperitoneal de glicose está

usualmente atrelada à menor capacidade de captação desse substrato pelos tecidos adiposo e muscular esquelético e ao prejuízo da regulação hepática do metabolismo glicêmico, fato associado a possíveis defeitos na secreção e na ação da insulina.

No entanto, dois experimentos subsequentes demonstraram que os animais DEX, apesar de intolerantes à glicose, não apresentavam resistência à insulina e ainda possuíam ilhotas pancreáticas funcionalmente ativas, tanto em concentrações baixas quanto altas de glicose (2,8 e 16,7 mM, respectivamente).

A alteração dos resultados do GTT e do PTT, e a ausência de modulação dos testes de tolerância à insulina e de secreção estática de insulina, revelaram a possível disfunção hepática característica de modelos de RCIU a partir do período lactacional. Essa constatação foi apoiada pela superexpressão de PEPCK (MOFFAT et al., 1998) – enzima que catalisa uma das reações irreversíveis da gliconeogênese – durante o jejum e a desregulação na resposta do receptor de insulina observadas no fígado em resposta à exposição precoce à dexametasona, tornando esse órgão nosso principal objeto de estudo.

Iniciamos nossa investigação estudando a atividade de diversos genes no tecido hepático dos animais neonatos, buscando caracterizar os possíveis mecanismos associados com as alterações morfofuncionais e epigenéticas que poderiam participar no estabelecimento do fenótipo. Assim, analisando o conteúdo de RNAm de diversos genes associados com reprogramação epigenética, com regulação metabólica e com desenvolvimento e maturação do fígado, descobrimos que a expressão de grande número deles é sensível às condições induzidas pela exposição à dexametasona. Acreditamos que muitos desses genes sejam regulados de forma indireta, em resposta à restrição no aporte de substratos, enquanto outros são regulados por ação direta do receptor de glicocorticoides (GR, *glucocorticoid receptor*), o qual responde positivamente a glicocorticoides artificiais como a dexametasona (DOBOS et al., 2011). Duas fosfatases de MAP quinases, *mkp1* e *mkp2*, são exemplos de genes alvo de GR (VANDEVYVER et al., 2012) que foram regulados positivamente pelo tratamento com dexametasona.

A regulação de alguns desses genes estudados nos ajuda a entender o perfil metabólico apresentado na prole DEX já no início da vida. Nesse sentido, a maior expressão de *nr4a1* (*nuclear receptor-4A1*), estimulador da expressão de UCP1 (KUMAR et al., 2008), e de *cpt1* (*Carnitine palmitoyltransferase I*) pode estar relacionada com o aumento da metabolização intracelular de ácidos graxos saturados de cadeia longa, levando à redução observada nas concentrações séricas desse substrato. Também detectamos que marcadores de reprogramação

fenotípica como *dnmt1* (*DNA methyl transferase 1*), *hdac1* (*histone deacetylase 1*) e *ogt* (*O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase*) (BASU *et al.*, 2013; MCDEVITT, 2012) estiveram regulados negativamente, fato que nos leva a crer em possíveis alterações epigenéticas induzidas no tecido hepático, contribuindo para os distúrbios metabólicos observados em médio e em longo prazo.

Da mesma forma que o observado em genes codificadores, a expressão de mais de 60 miRNAs foi regulada no fígado dos animais DEX no período perinatal. Esse resultado não provoca surpresa, dado que grande parte desses transcritos pode ser encontrada em regiões codificantes do genoma, sendo regulada diretamente com o gene hospedeiro, e o restante possui região promotora com elementos responsivos a fatores transcricionais ou é passível de regulação por remodelamento da cromatina (FERLAND-MCCOLLOUGH *et al.*, 2012; GRAVES; ZENG, 2012). Assim, como em outros estudos, observamos que a regulação da atividade de genes de miRNAs é sensível ao ambiente intrauterino (FERLAND-MCCOLLOUGH *et al.*, 2012). Em nosso modelo, 67% dos miRNAs regulados foram mais expressos em animais DEX do que em animais CTL.

Há relação interessante do padrão de expressão dos miRNAs com o da enzima *dicer*, a qual também foi mais expressa em resposta à exposição à dexametasona. Alguns estudos demonstram que, em determinadas condições, existe relação positiva entre concentração intracelular de *dicer* e a expressão de miRNAs e que a alteração na disponibilidade dessa enzima está associada a condições fisiopatológicas severas, como câncer de mama, leucemia e complicações cardiometabólicas do diabetes (CHAVALI; TYAGI; MISHRA, 2014; FAGGAD *et al.*, 2010; KHOSHNAW *et al.*, 2012; ZHU *et al.*, 2012). Todavia, cabe ressaltar que nem todos os miRNAs são produzidos pela via canônica – que envolve a ação de *drosha*, *dicer* e exportina 5 – e que, para estes, o aumento na expressão de *dicer* não representa agente causal relevante (HAVENS *et al.*, 2012)

Como citado na introdução deste manuscrito, grande parte dos genes de miRNAs de mamíferos são encontrados em *clusters* policistrônicos e sua regulação tende a ser correlata (BASKERVILLE; BARTEL, 2005; SEWER *et al.*, 2007). Em nosso trabalho, a administração de dexametasona provocou aumento da expressão dos miRNAs pertencentes ao *cluster* policistrônico do miR-322 (miR-322-5P, -322-3P, 350, 451a, 503, 542-3P e 542-5P) no fígado da prole no primeiro dia de vida. Uma pesquisa na base de dados PUBMED revelou que alguns desses miRNAs possivelmente participam do processo de diferenciação de células pluripotentes em hepatócitos maduros (CUI *et al.*, 2013) mas há aparente ausência de estudos

sobre demais efeitos funcionais desses miRNA sobre o tecido hepático ou sobre linhagens permanentes de hepatócitos. Todavia, estudos envolvendo outros tecidos e tipos celulares demonstram a importância desse *cluster* para o controle do crescimento e diferenciação celulares, para o remodelamento do epitélio da glândula mamária e para a regulação negativa do potencial angiogênico (CAPORALI et al., 2011; LIU et al., 2014; LLOBET-NAVAS et al., 2014; ZHANG et al., 2014).

Caporali et al. (2011), mimetizando a isquemia endotelial induzida pelo *diabetes mellitus* em experimentos *in vitro*, descreveram o aumento da expressão do miR-503 e a consequente redução da expressão da Cdc25A em resposta à privação de nutrientes e fatores de crescimento, fato associado à menor taxa de proliferação de células endoteliais. Semelhantemente, outros trabalhos já demonstraram que o processo isquêmico também aumenta a expressão do miR-322-5P e de seu ortólogo em humanos (miR-422-5P) em diferentes células endoteliais, havendo ação direta desse miRNA sobre o remodelamento vascular e sobre a taxa de proliferação celular (CHAMORRO-JORGANES et al., 2011; GHOSH et al., 2010; LLOBET-NAVAS et al., 2014). Sarkar, Dey & Dutta (2010) demonstraram ainda que a hiperexpressão dos miR-503 e -322 induz a redução da atividade da Cdk2 via regulação negativa da Cdc25A em mioblastos, levando à repressão do ciclo celular e à diferenciação dessas células em miotúbulos. Finalmente, cabe destacar que o potencial antiproliferativo e pró-diferenciativo desses dois miRNAs já foi confirmado em monócitos e que essa característica em comum parece derivar da similaridade de suas sequências *seed* (FORREST et al., 2010; ROSA et al., 2007).

Além dos possíveis efeitos biológicos induzidos pela regulação do *cluster*, cabe destacar que o miR-322-5P foi um dos 5 miRNAs com maior regulação positiva em nosso estudo e que, dentre os transcritos modulados, ele é o segundo mais expresso. Por essa razão, escolhemos estudar os componentes do *cluster* miR-322, validando os resultados obtidos na análise da expressão global de miRNA e verificando possíveis efeitos sobre o desenvolvimento hepático. Nesse sentido, iniciamos o estudo validando a expressão diferencial desses transcritos no fígado dos animais neonatos tratados com uma das doses de partida.

O aumento na expressão do miR-322-5P e dos demais transcritos de seu *cluster* veio acompanhada pela menor expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA, *proliferating cell nuclear antigen*) no tecido hepático dos animais neonatos. Uma vez que o PCNA é reconhecido como importante marcador de proliferação celular em diferentes

organismos por ser essencial à replicação de DNA (CITTERIO et al., 1992; CONNOLLY; BOGDANFFY, 1993), passamos a acreditar que, semelhantemente ao que ocorre em outros tipos celulares, a maior expressão desses miRNAs no início da vida pode comprometer o desenvolvimento morfofuncional do tecido hepático, contribuindo para a alteração permanente da sua capacidade metabólica. Essa hipótese é pautada nas primeiras observações clínicas, nas quais se observava redução na razão circunferência da cintura:circunferência da cabeça em indivíduos programados por conta do menor volume hepático (BARKER, 1995).

De fato, apesar da menor massa corporal, observamos menor massa relativa do fígado de animais DEX, fato já documentado em outros estudos com tratamento semelhante (DUMORTIER et al., 2011). Além disso, observamos também menor capacidade hematopoiética representada pela menor densidade de células precursoras, o que pode estar relacionado com o prejuízo do desenvolvimento tecidual, uma vez que a principal função do tecido hepático no período perinatal de roedores é a hematopoese (PAYUSHINA, 2012). Em condições diferentes das estudadas pelo nosso grupo, Tamiolakis et al. (2004) correlacionam a redução na eritropoiese no fígado fetal com a pré-eclampsia, fazendo um paralelo com a alta morbidade e mortalidade observadas em crianças expostas à hipertensão materna.

Decidimos então estudar mais profundamente o possível efeito do miR-322-5P sobre a capacidade proliferativa de células hepáticas. A escolha desse miRNA foi arbitrária, mas não trivial. Além de possuir o maior número de alvos validados entre os genes que controlam a taxa de proliferação e o ciclo celular, o miR-322 foi o transcrito mais regulado desse *cluster* em resposta à RCIU, apresentando também a maior expressão global. Além disso, observamos que o conteúdo de três proteínas proliferativas cujos RNAm são alvos do miR-322-5P (ciclina D1, receptor de insulina e Akt3) foi reduzido no fígado dos animais neonatos DEX, bem como seu RNAm, o que denota o possível decaimento induzido no processo de silenciamento.

Para estudarmos esse possível efeito, utilizamos uma linhagem celular de hepatocarcinoma humano, a HEPG2. Essas células mantidas em cultura foram transfectadas com miméticos do ortólogo do rno-miR-322-5P (rno, acrônimo de *Rattus norvegicus*) em humanos, o hsa-miR-424-5P (hsa, acrônimo de *Homo sapiens*) e, após três dias de tratamento, tiveram suas proteínas extraídas ou foram submetidas a análises fenotípicas. A utilização de um ortólogo com identificação diferente foi necessária porque não existe correspondência entre o rno-miR-322-5P e o hsa-miR-322-5P, mas sim entre os escolhidos para o presente estudo (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location).

O ensaio de proliferação com células transfectadas com o mimético do hsa-miR-424-5P demonstrou o potencial desse transcrito para a redução do processo proliferativo nas células HEPG2. Essa propriedade do miR-322-5P/424-5P já foi demonstrada em outros tipos celulares e tem sido estudada em diferentes condições patológicas que provocam o aumento ou a redução da expressão de seu gene (FORREST et al., 2010; MERLET et al., 2013; SARKAR; DEY; DUTTA, 2012). Acredita-se que a superexpressão ou o silenciamento desse miRNA nessas condições seja um mecanismo necessário para o estabelecimento das doenças (MERLET et al., 2013).

Com relação à redução na capacidade mitótica, observamos menor expressão dos possíveis genes alvos do miR-424-5P em resposta à transfecção. Dentre esses alvos, o único já validado até o momento é o CCND1 (FORREST et al., 2010, MERLET et al., 2013), enquanto os demais ainda são alvos putativos e demandam que mais experimentos corroborem a hipótese de que estes são regulados de forma direta pelo miRNA estudado.

A redução na taxa proliferativa em resposta à transfecção ainda veio acompanhada da hipertrofia dos hepatócitos em cultura, verificada na análise por citometria de fluxo. Com a redução na sinalização induzida por estímulos mitogênicos associados aos genes estudados, as células apresentaram redução na expressão do PCNA que, juntamente com a menor disponibilidade de ciclina D1, provavelmente provocou o atraso na transição G1/S e pausa no ciclo celular (FORREST et al., 2010). Com isso, as células tendem a se manter em G1, período no qual ocorre o crescimento celular, fato que justificaria o aumento relativo do volume das HEPG2 transfectadas com o mimético do miR-424-5P.

Assim, com os dados obtidos até o momento, propusemos que o miR-322-5P deve contribuir para as alterações morfofuncionais do fígado dos roedores expostos à dexametasona.

Todavia, está bem estabelecido que o próprio excesso de GC reduz a atividade de vias de sinalização intracelulares que regulam o ciclo e a divisão celulares. Destaca-se, nesse contexto, a atividade da via das ERKs, componentes das MAPK, que podem ser indiretamente reguladas pela atividade do GR. O GR tem ação de fator transcricional que regula direta ou indiretamente a atividade de diversos genes, dentre os quais os das MKPs 1 e 2 (CLARK; LASA, 2003; NICOLETTI-CARVALHO et al., 2010). Estes genes codificam fosfatases que atuam desfosforilando as ERKs, o que provoca uma alteração conformacional nessas proteínas, a redução da sua atividade e o consequente prejuízo do estímulo mitogênico (NICOLETTI-CARVALHO et al., 2011).

Nosso estudo demonstrou que a expressão do GR está aumentada e que, consequentemente, a abundância de RNAm que codifica a MKP1 e da proteína (embora sem significância estatística até o momento) está aumentada em animais DEX, o que pode ter levado à menor fosforilação das ERKs 1 e 2 observada. Um estudo prévio de nosso grupo demonstrou que, no pâncreas endócrinos de animais lactentes, ambas as ERKs são reguladas por MKP1 induzida por GC, e que essa condição experimental está associada à redução na taxa de proliferação de células beta *in vitro* (NICOLETTI-CARVALHO et al., 2010). Por conta dessas observações, sugerimos que esse mecanismo também pode estar relacionado à repressão da proliferação de células hepáticas e contribuir para a redução no desenvolvimento do fígado em animais expostos precocemente ao excesso de GC.

Assim, decidimos estudar o efeito da exposição à alta dose de dexametasona (1 μ M) sobre a capacidade proliferativa das células HEPG2. Observamos, todavia, que o tratamento isolado com a droga não influenciou o índice de proliferação dessas células, bem como não proporcionou efeito sinérgico ou antagônico à transfecção do miR-424-5P. Em posse desses dados, acreditamos que a dexametasona não provoca restrição do desenvolvimento morfológico hepático por vias diretas, mas que a regulação de efetores secundários – tais como miRNAs – podem representar mecanismos indiretos que estariam relacionados a esse efeito.

6 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos, podemos afirmar que a RCIU induzida por dexametasona altera o padrão expressão de diversos genes que codificam miRNAs no tecido hepático de ratos albinos. A maior expressão do miR-322-5P pode ser um agente causal na redução da taxa de proliferação e, conseqüentemente, do desenvolvimento morfológico hepático via repressão da expressão de genes proliferativos como Akt3, CCND1 e IR. Ainda estudaremos a real contribuição desse transcrito na regulação desses genes; todavia, já propomos uma ligação entre a expressão aberrante do miR-322-5P e a reduzida taxa de proliferação detectada no tecido hepático em desenvolvimento, o que pode contribuir para as alterações morfofuncionais e para o estabelecimento do fenótipo em longo prazo.

REFERÊNCIAS¹

- ANDRADE, C. L. T.; SZWARCOWALD, C. L.; CASTILHO, E. A. Baixo peso ao nascer no Brasil de acordo com as informações sobre nascidos vivos do Ministério da Saúde. **Cad. Saúde Pública**, v. 24, n. 11, p. 2564-2572, 2008.
- BARIK, S. An intronic microRNA silences genes that are functionally antagonistic to its host gene. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 36, p. 5232-5241, 2008.
- BARKER, D. J.; OSMOND, C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. **Lancet**, v. 10, p. 1077-1081, 1986.
- BARKER D. J. The intrauterine origins of cardiovascular disease. **Acta Paediatr.**, v. 391 p. 93-99, 1993.
- BARKER, D. J. P.; MARTYN, C. N.; OSMOND, C.; WIELD, G. A. Abnormal liver growth in utero and death from coronary heart disease. **Br. Med. J.**, v. 310, p. 703-704, 1995.
- BASKERVILLE, S.; BARTEL, D. P. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. **RNA**, v. 11, n. 3, p. 241-247, 2005.
- BERGMAYER, H. U. ed. **Methods of enzymatic analysis** 2. ed. New York: Academic Press, 1974.
- BHATTACHARYYA, S. N.; HABERMACHER, R.; MARTINE, U.; CLOSS, E. I.; FILIPOWICZ, W. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. **Cell**, v. 125, n. 6, p.1111-1124, 2006.
- BORT, R.; SIGNORE, M.; TREMBLAY, K.; MARTINEZ BARBERA, J. P.; ZARET, K. S. Hex homeobox gene controls the transition of the endoderm to a pseudostratified, cell emergent epithelium for liver bud development. **Dev. Biol.**, v. 290, p. 44-56, 2006.
- BROMATI, C. R.; LELLIS-SANTOS, C.; YAMANAKA, T. S.; NOGUEIRA, T. C.; LEONELLI, M.; CAPERUTO, L. C.; GORJÃO, R.; LEITE, A. R.; ANHÊ, G. F.; BORDIN, S. UPR induces transient burst of apoptosis in islets of early lactating rats through reduced AKT phosphorylation via ATF4/CHOP stimulation of TRB3 expression. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 300, n. 1, p. 92-100, 2011.
- CAPORALI, A.; MELONI, M.; VÖLLENKLE, C.; BONCI, D.; SALA-NEWBY, G. B.; ADDIS, R.; SPINETTI, G.; LOSA, S.; MASSON, R.; BAKER, A. H.; AGAMI, R.; LE SAGE, C.; CONDORELLI, G.; MADEDDU, P.; MARTELLI, F.; EMANUELI, C. Deregulation of microRNA-503 contributes to diabetes mellitus-induced impairment of endothelial function and reparative angiogenesis after limb ischemia. **Circulation**, v. 123, n. 3, p. 282-291, 2011.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CHAMORRO-JORGANES, A.; ARALDI, E.; PENALVA, L.O.; SANDHU, D.; FERNÁNDEZ-HERNANDO, C.; SUÁREZ, Y. MicroRNA-16 and microRNA-424 regulate cell-autonomous angiogenic functions in endothelial cells via targeting vascular endothelial growth factor receptor-2 and fibroblast growth factor receptor-1. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.31, n. 11, p.2595-2606, 2011.

CHAVALI, V.; TYAGI, S. C.; MISHRA, P. K. Differential Expression of Dicer, miRNAs, and Inflammatory Markers in Diabetic Ins2^{+/-} Akita Hearts. **Cell Biochem. Biophys.**, v. 68, n. 1, p. 25-35, 2014.

CHEN, L.; CUI, J.; HOU, J.; LONG, J.; LI, C.; LIU L. A novel negative regulator of adipogenesis: microRNA-363. **Stem Cells**, v. 32, n. 2, p. 510-520, 2014.

CIANFARANI, S.; AGOSTONI, C.; BEDOGNI, G.; BERNI CANANI, R.; BRAMBILLA, P.; NOBILI, P.; PIETROBELLI, A. Effect of intrauterine growth retardation on liver and long-term metabolic risk. **Int. J. Obes.**, v. 36, n. 10, p. 1270-1277, 2012.

CITTERIO, S.; SGORBATI, S.; LEVI, M.; COLOMBO, B. BM.; SPARVOLI, E. PCNA and total nuclear protein content as markers of cell proliferation in pea tissue. **J. Cell Sci.**, v. 102, p. 71-78, 1992.

CLARK, A. R.; LASA, M. Crosstalk between glucocorticoids and mitogen-activated protein kinase signalling pathways. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 3, p. 404-411, 2003.

CONNOLLY, K. M.; BOGDANFFY, M. S. Evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as an endogenous marker of cell proliferation in rat liver: a dual-stain comparison with 5-bromo-2'-deoxyuridine. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 41, n. 1, p.1-6, 1993.

CUI, L.; S H I, Y.; ZHOU, X.; WANG, X.; WANG, J.; LAN, Y.; WANG, M.; ZHENG, L.; LI, H.; WU, Q.; ZHANG, J.; FAN, D.; HAN, Y. A set of microRNAs mediate direct conversion of human umbilical cord lining-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes. **Cell Death Dis.**, v. 14, n. 4, p. e918, 2013.

CULLEN, B. R. Transcription and processing of human microRNA precursors. **Mol. Cell**, v. 16, p. 861-865, 2004.

DAVID, S.; MELTZER, S. J. MicroRNA involvement in esophageal carcinogenesis. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v.11, n. 6, p.612-616, 2011.

DE VRIES, A.; HOLMES, M. C.; HEIJNIS, A.; SEIER, J. V.; HEERDEN, J.; LOUW, J.; et al. Prenatal dexamethasone exposure induces changes in nonhuman primate offspring cardiometabolic and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. **J. Clin. Invest.**, v. 117, p. 1058-1067, 2007.

DOBOS, J.; KENESSEY, I.; TÍMÁR, J.; LADÁNYI, A. Glucocorticoid receptor expression and antiproliferative effect of dexamethasone on human melanoma cells. **Pathol. Oncol. Res.**, v. 17, n. 3, p. 729-34, 2011.

DUMORTIER, O.; BLONDEAU, B.; DUVILLIÉ, B.; REUSENS, B.; BRÉANT, B.; REMACLE, C. Different mechanisms operating during different critical time-windows reduce rat fetal beta cell mass due to a maternal low-protein or low-energy diet. **Diabetologia**, v. 50, n. 12, p. 2495-503, 2007.

DUMORTIER, O.; THEYS, N.; AHN, M T.; REMACLE, C.; REUSENS, B. Impairment of rat fetal beta-cell development by maternal exposure to dexamethasone during different time-windows. **PLoS One**, v. 6, n. 10 p. 1-10, 2011.

FABIAN, M. R.; SONENBERG, N.; FILIPOWICZ, W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 79, p. 351-379, 2010.

FAGGAD, A.; BUDCZIES, J.; TCHERNITSA, O.; DARB-ESFAHANI, S.; SEHOULI, J.; MÜLLER, B. M.; WIRTZ, R.; CHEKEROV, R.; WEICHERT, W.; SINN, B.; MUCHA, C.; ELWALI, N. E.; SCHÄFER, R.; DIETEL, M.; DENKERT, C. Prognostic significance of Dicer expression in ovarian cancer-link to global microRNA changes and oestrogen receptor expression. **J. Pathol.**, v. 220, n. 3, p.382-391, 2010.

FERLAND-MCCOLLOUGH, D.; FERNANDEZ-TWINN, D. S.; CANNELL, I. G.; DAVID, H.; WARNER, M.; VAAG, A. A.; BORK-JENSEN, J.; BRØNS, C.; GANT, T. W.; WILLIS, A. E.; SIDDLE, K.; BUSHELL, M.; OZANNE, S. E. Programming of adipose tissue miR-483-3P and GDF-3 expressuin by maternal diet in DM2. **Cell Death Diff.**, v. 19, p.1003-1012, 2012.

FERNANDEZ-VALVERDE, S. L.; TAFT, R. J.; MATTICK, J. S. MicroRNAs in β -cell biology, insulin resistance, diabetes and its complications. **Diabetes**, v. 60, n. 7, p. 1825-1831, 2011.

FORREST, A. R.; KANAMORI-KATAYAMA, M.; TOMARU, Y.; LASSMANN, T.; NINOMIYA, N.; TAKAHASHI, Y.; DE HOON, M. J.; KUBOSAKI, A.; KAIHO, A.; SUZUKI, M.; YASUDA, J.; KAWAI, J.; HAYASHIZAKI, Y.; HUME, D. A.; SUZUKI, H. Induction of microRNAs, mir-155, mir-222, mir-424 and mir-503, promotes monocytic differentiation through combinatorial regulation. **Leukemia**, v. 24, n. 2, p.460-466, 2010.

FOWDEN, A. L.; MIJOVIC, J.; SILVER, M. The effects of cortisol on hepatic and renal gluconeogenic enzyme activities in the sheep fetus during late gestation. **J. Endocrinol.**, v. 137, n. 2, p. 213-22, 1993.

GHOSH, G.; SUBRAMANIAN, I. V.; ADHIKARI, N.; ZHANG, X.; JOSHI, H. P.; BASI, D.; CHANDRASHEKHAR, Y. S.; HALL, J. L.; ROY, S.; ZENG, Y.; RAMAKRISHNAN, S. Hypoxia-induced microRNA-424 expression in human endothelial cells regulates HIF- α isoforms and promotes angiogenesis. **J. Clin. Invest.**, v. 120, n. 11, p. 4141-4154, 2010.

GRAVES, P.; ZENG, Y. Biogenesis of mammalian microRNAs: a global view. **Genomics Proteomics Bioinformatics.**, v. 10, n. 5, p. 239-245, 2012.

GRIFFITHS-JONES, S.; SAINI, H. K.; VAN DONGEN, S.; ENRIGHT, A.J. miRBase: Tools for microRNA genomics. **Nucleic Acids Res.**, v. 36, p. 154-158, 2008.

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

HAVENS, M. A.; REICH, A. A.; DUELLI, D. M.; HASTINGS, M. L. Biogenesis of mammalian microRNAs by a non-canonical processing pathway. **Nucleic Acids Res.**, v. 40, n. 10, p. 4626-4640, 2012.

HE, C.; LI, Z.; CHEN, P.; HUANG, H.; HURST, L. D.; CHEN, J. Young intragenic miRNAs are less coexpressed with host genes than old ones: implications of miRNA-host gene coevolution. **Nucleic Acids Res.**, v. 40, p. 4002-4012, 2012.

HEERMAN, W. J.; BIAN, A.; SHINTANI, A. BARKIN, S. L. Interaction between maternal prepregnancy body mass index and gestational weight gain shapes infant growth. **Acad Pediatr.**, v. 14, n. 5, p. 463-470, 2014.

HERMANN, G. M.; MILLER, R. L.; ERKONEN, G. E.; DALLAS, L. M.; HSU, E.; ZHU, V.; ROGHAI, R. D. Neonatal catch up growth increases diabetes susceptibility but improves behavioral and cardiovascular outcomes of low birth weight male mice. **Pediatr. Res.**, v. 66, n. 1, p. 53-58, 2009.

HOUBAVIY, H. B.; MURRAY, M. F.; SHARP, P. A. Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. **Dev. Cell**, v. 5, p. 351-358, 2003.

HYATT, M. A.; BUDGE, H.; SYMONDS, M.E. Early developmental influences on hepatic organogenesis. **Organogenesis**, v. 4, n. 3, p. 170-175, 2008.

IKEZAWA, Y.; YAMATANI, K.; OGAWA, A.; OHNUMA, H.; IGARASHI, M.; DAIMON, M.; et al. Effects of glucagon on glycogenolysis and gluconeogenesis are region-specific in periportal and perivenous hepatocytes. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 132, p. 547-555, 1998.

JOCHHEIM, A.; CIESLAK, A.; HILLEMANN, T.; CANTZ, T.; SCHARF, J.; MANNS, M. P.; OTT, M. Multi-stage analysis of differential gene expression in BALB/C mouse liver development by high-density microarrays. **Differentiation**, v. 71, p. 62-72, 2003.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Órgãos associados ao trato digestivo. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica** 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan LTDA, 2013. p. 311-32.

KHOSHNAW, S. M.; RAKHA, E. A.; ABDEL-FATAH, T. M.; NOLAN, C. C.; HODI, Z.; MACMILLAN, D. R.; ELLIS, I. O.; GREEN, A. R. Loss of Dicer expression is associated with breast cancer progression and recurrence. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 135, n. 2, p. 403-413, 2012.

KHVOROVA, A.; REYNOLDS, A.; JAYASENA, S. D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. **Cell**, v. 115, p. 209-16, 2003.

KUMAR, N.; LIU, D.; WANG, H.; ROBIDOUX, J.; COLLINS, S. Orphan nuclear receptor NOR-1 enhances 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent uncoupling protein-1 gene transcription. **Mol. Endocrinol.**, v. 22, n. 5, p. 1057-1064, 2008.

LAU, N. C.; LIM, L. P.; WEINSTEIN, E. G.; BARTEL, D. P. An Abundant Class of Tiny RNAs with Probable Regulatory Roles in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v. 294, p. 858-862, 2001.

LAUTT, W. W.; MACEDO, M. P.; SADRI, P.; TAKAYAMA, S.; DUARTE RAMOS, F.; LEGARE, D. J. Hepatic parasympathetic (HISS) control of insulin sensitivity determined by feeding and fasting. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 281, n. 1, p. 29-36, 2001.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, p. 843-854, 1993.

LEMAIGRE, F. P. Mechanisms of liver development: concepts for understanding liver disorders and design of novel therapies. **Gastroenterol.**, v. 137, n. 1, p. 62-79, 2009.

LI, S.; CHEN, X.; ZHANG, H.; LIANG, X.; XIANG, Y.; YU, C.; ZEN, K.; LI, Y.; ZHANG, C. Y. Differential expression of microRNAs in mouse liver under aberrant energy metabolic status. **J. Lipid. Res.**, v. 50, n. 9, p. 1756-1765, 2009.

LIU, W.; GONG, Q.; LING, J.; ZHANG, W.; LIU, Z.; QUAN, J. Role of miR-424 on angiogenic potential in human dental pulp cells. **J. Endod.**, v. 40, n. 1, p. 76-82, 2014.

LLOBET-NAVAS, D.; RODRÍGUEZ-BARRUECO, R.; CASTRO, V.; UGALDE, A. P.; SUMAZIN, P.; JACOB-SENDER, D.; DEMIRCAN, B.; CASTILLO-MARTÍN, M.; PUTCHA, P.; MARSHALL, N.; VILLAGRASA, P.; CHAN, J.; SANCHEZ-GARCIA, F.; PE'ER, D.; RABADÁN, R.; IAVARONE, A.; CORDÓN-CARDÓ, C.; CALIFANO, A.; LÓPEZ-OTÍN, C.; EZHKOVA, E.; SILVA, J. M. The miR-424(322)/503 cluster orchestrates remodeling of the epithelium in the involuting mammary gland. **Genes Dev.**, v. 28, n. 7, p. 765-782, 2014.

LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. **Ciba Found. Symp.**, v. 156, p. 38-55, 1991.

MCMILLEN, I. C.; ROBINSON, J. S. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. **Physiol. Rev.**, v. 85, p. 571-633, 2005.

MERLET, E.; ATASSI, F.; MOTIANI, R. K.; MOUGENOT, N.; JACQUET, A.; NADAUD, S.; CAPIOD, T.; TREBAK, M.; LOMPRÉ, A. M.; MARCHAND, A. MiR-424/322 regulates vascular smooth muscle cell phenotype and neointimal formation in the rat. **Cardiovasc Res.** v. 98, n. 3, p. 458-468, 2013.

MINENO, J.; OKAMOTO, S.; ANDO, T.; SATO, M.; CHONO, H.; IZU, H.; TAKAYAMA, M.; ASADA, K.; MIROCHNITCHENKO, O.; INOUE, M.; KATO, I. The expression profile of microRNAs in mouse embryos. **Nucleic Acids Res.**, v. 34, p. 1765-1771, 2006.

MOFFAT, J.; NYIRENDA, M. J.; LINDSA, R. S.; KENYON, C. J.; BURCHELL, A.; SECKL, J. R. Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. **J. Clin. Invest.**, v. 101, p. 2174-2181, 1998.

NICOLETTI-CARVALHO, J. E.; LELLIS-SANTOS, C.; YAMANAKA, T. S.; NOGUEIRA, T. C.; CAPERUTO, L. C.; LEITE, A. R.; ANHÊ, G. F.; BORDIN, S. MKP-1 mediates glucocorticoid-induced ERK1/2 dephosphorylation and reduction in pancreatic β -cell proliferation in islets from early lactating mothers. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 299, n. 6, p. E1006-E1015, 2010.

NIU, Q. W.; LIN, S. S.; REYES, J. L.; CHEN, K. C.; WU, H. W.; YEH, S. D.; CHUA, N. H. Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance. **Nat. Biotechnol.**, v. 24, p. 1420-1428, 2006.

NOGUEIRA, T. C.; LELLIS-SANTOS, C.; JESUS, D. S.; TANEDA, M.; RODRIGUES, S. C.; AMARAL, F. G.; LOPES, A. M.; CIPOLLA-NETO, J.; BORDIN, S.; ANHÊ, G. F. Absence of melatonin induces night-time hepatic insulin resistance and increased gluconeogenesis due to stimulation of nocturnal unfolded protein response. **Endocrinology**, v. 152, n. 4, p. 1253-1263, 2011.

OZANNE, S. E.; LEWIS, R.; JENNINGS, B. J.; HALES, C. N. Early programming of weight gain in mice prevents the induction of obesity by a highly palatable diet. **Clin. Sci.**, v. 106, n. 2, p. 141-145, 2004.

PARK, J. K.; LIU, X.; STRAUSS, T. J.; MCKEARIN, D. M.; LIU, Q. The miRNA pathway intrinsically controls self renewal of *Drosophila* germline stem cells. **Curr. Biol.**, v. 17, p. 533-538, 2007.

PAYUSHINA, O. V. Hematopoietic microenvironment in the fetal liver: roles of different cell populations. **Cell Biology**, v. 2012, 1-7, 2012.

PETKOV, P. M.; ZAVADIL, J.; GOETZ, D.; CHU, T.; CARVER, R.; ROGLER, C. E.; BOTTINGER, E. P.; SHAFRITZ, D. A.; DABEVA, M. D. Gene expression pattern in hepatic stem/progenitor cells during rat fetal development using complementary DNA microarrays. **Hepatology**, v. 39, p. 617-627, 2004.

PILLAI, R. S.; BHATTACHARYYA, S. N.; FILIPOWICZ, W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? **Trends Cell Biol.**, v. 17, n. 3, p. 118-126, 2007.

PIVA, R.; SPANDIDOS, D. A.; GAMBARI, R. From microRNA functions to microRNA therapeutics: Novel targets and novel drugs in breast cancer research and treatment. **Int. J. Onc.**, v. 43, n. 4, p. 985-994, 2013.

QUISTORFF, B. Gluconeogenesis in periportal and perivenous hepatocytes of rat liver, isolated by a new high-yield digitonin/collagenase perfusion technique. **Biochem. J.**, v. 229, n. 1, p. 221-226, 1985.

RAVELLI, G. P.; STEIN, Z. A.; SUSSER, M. W. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. **N. Engl. J. Med.**, v. 295, n. 7, p. 349-353, 1976.

RIGGS, A. D.; RUSSO, V. E. A.; MARTIENSSSEN, R. A. **Epigenetic mechanisms of gene regulation**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996.

ROSA, A.; BALLARINO, M.; SORRENTINO, A.; STHANDIER, O.; DE ANGELIS, F. G.; MARCHIONI, M.; MASELLA, B.; GUARINI, A.; FATICA, A.; PESCHLE, C.; BOZZONI, I. The interplay between the master transcription factor PU.1 and miR-424 regulates human monocyte/macrophage differentiation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 104, n. 50, p. 19849-19854, 2007.

ROWLANDS, D. S.; PAGE, R. A.; SUKALA, W. R.; GIRI, M.; GHIMBOVSCHI, S. D.; HAYAT, I.; CHEEMA, B. S.; LYS, I.; LEIKIS, M.; SHEARD, P. W.; WAKEFIELD, S. J.; BREIER, B.; HATHOUT, Y.; BROWN, K.; MARATHI, R.; ORKUNOGLU-SUER, F. E.; DEVANEY, J. M.; LEIKEN, B.; MANY, G.; KREBS, J.; HOPKINS, W. G.; HOFFMAN, E. P. Multi-omic integrated networks connect DNA methylation and miRNA with skeletal muscle plasticity to chronic exercise in Type 2 diabetic obesity. **Physiol. Genomics**, v. 46, n. 20, p. 747-765, 2014.

SARKAR, S.; DEY, B. K.; DUTTA, A. MiR-322/434 are induced during muscle differentiation and promote cell cycle quiescence and differentiation by down-regulation of Cdc25A. **Mol. Biol. Cell**, v. 21, n. 13, p. 2138-2149, 2010.

SCHWARZ, D. S.; HUTVAGNER, G.; DU, T.; XU, Z.; ARONIN, N.; ZAMORE, P. D. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. **Cell**, v. 115, p. 199-208, 2003.

SECKL, J. R.; MEANEY, M. J. Glucocorticoid programming. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1032, p. 63-84, 2004.

SEWER, A.; PAUL, N.; LANDGRAF, P.; ARAVIN, A.; PFEFFER, S.; BROWNSTEIN, M. J.; TUSCHL, T.; VAN NIMWEGEN, E.; ZAVOLAN, M. Identification of clustered microRNAs using an ab initio prediction method. **BMC Bioinformatics**, v. 6, p. 267-282, 2005.

SIEGA-RIZ A. M.; LARAIA B. The implications of maternal overweight and obesity on the course of pregnancy and birth outcomes. **Matern. Child Health J.**, v. 10, n. 5, p. S153-S156, 2006. Suppl.

STEIN, Z. A.; SUSSER, M.; SAENGER, G.; MAROLLA, F. **Famine and human development: the dutch hunger winter of 1944-1945**. New York: Oxford University Press, 1975.

TAMIOAKIS, D.; VENIZELOS, I.; LAMBROPOULOU, M.; EFTHYMIADOU, A.; ARVANITIDOU, V.; TSIKOURAS, P.; KOUTSOUGERAS, G.; CHIMONIS, G.; KARAMANIDIS, D.; BARBAGADAKI, S.; NIKOLAIDOU, S.; SELINIOTAKI, E.; BOGLOU, P.; PAPADOPOULOS, N. Altered intrahepatic hematopoiesis in neonates from women with pregnancy induced hypertension/pre-eclampsia. **Acta Medica**, v. 47, n. 2, p. 119-123, 2004.

TEUTSCH, H. F. Regionality of glucose-6-phosphate hydrolysis in the liver lobule of the rat: metabolic heterogeneity of "portal" and "septal" sinusoids. **Hepatology**, v. 8, p. 311-317, 1988.

THEOGARAJ, E.; JOHN, C. D.; CHRISTIAN, H. C.; MORRIS, J. F.; SMITH, S. F.; BUCKINGHAM, J. C. Perinatal glucocorticoid treatment produces molecular, functional, and

morphological changes in the anterior pituitary gland of the adult male rat. **Endocrinology**, v. 146, n. 11, p. 4804-4813, 2005.

TOMARI, Y.; ZAMORE, P. D. Perspective: machines for RNAi. **Genes Dev.**, v. 19, p. 517-529, 2005.

TREMBLAY, K. D.; ZARET, K. S. Distinct populations of endoderm cells converge to generate the embryonic liver bud and ventral foregut tissues. **Dev. Biol.** v. 280, n. 1, p. 87-99, 2005.

VAN ROOIJ, E.; SUTHERLAND, L. B.; QI, X.; RICHARDSON, J. A.; HILL, J.; OLSON, E. N. Control of stress- dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. **Science**, v. 316, p. 575-579, 2007.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol.**, v. 3, n. 7:RESEARCH0034, 2002.

VANDEVYVER, S.; DEJAGER, L.; VAN BOGAERT, T.; KLEYMAN, A.; LIU, Y.; TUCKERMANN, J.; LIBERT, C. Glucocorticoid receptor dimerization induces MKP1 to protect against TNF-induced inflammation. **J. Clin. Invest.**, v. 122, n. 6, p. 2130-2140, 2012.

VIANA, K. J.; TADDEI, J. A. A. C.; COCETTI, M.; WARKENTIN, S. Peso ao nascer de crianças brasileiras menores de dois anos. **Cad. Saúde Pública**, v. 29, n. 2, p. 349-356, 2013.

WADDELL, B. J.; BOLLEN, M.; WYRWOLL, C. S.; MORI, T. A.; MARK, P. J. Developmental programming of adult adrenal structure and steroidogenesis: effects of fetal glucocorticoid excess and postnatal dietary omega-3 fatty acids. **J. Endocrinol.**, v. 205, n. 2, p. 171-178, 2010.

WANG, Y.; LEE, C. G. MicroRNA and cancer-focus on apoptosis. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 13, p. 12-23, 2009.

WIENHOLDS, E.; KLOOSTERMAN, W. P.; MISKA, E.; ALVAREZ-SAAVEDRA, E.; BEREZIKOV, E.; DE BRUIJN, E.; HORVITZ, H. R.; KAUPPINEN, S.; PLASTERK, R. H. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. **Science**, v. 309, p. 310-311, 2005.

WYRWOLL, C. S.; MARK, P. J.; MORI, T. A.; WADDELL, B. J. Developmental programming of adult hyperinsulinemia, increased proinflammatory cytokine production, and altered skeletal muscle expression of SLC2A4 (GLUT4) and uncoupling protein 3. **J. Endocrinol.**, v. 198, p. 571-579, 2008.

ZHANG, C. MicroRNA and vascular smooth muscle cell phenotype: new therapy for atherosclerosis? **Genome Med.**, v. 1, n. 9, p. 85, 2009.

ZHANG, Y.; LI, T.; GUO, P.; KANG, J.; WEI, Q.; JIA, X.; ZHAO, W.; HUAI, W.; QIU, Y.; SUN, L.; HAN, L. MiR-424-5p reversed epithelial-mesenchymal transition of anchorage-

independent HCC cells by directly targeting ICAT and suppressed HCC progression. **Sci. Rep.**, v. 4, p. 6248, 2014.

APÊNDICE A – Ratos expostos à dexametasona no início da vida exibem intolerância ao jejum prolongado

Além do perfil metabólico dos animais tratados precocemente com dexametasona apresentado no corpo deste manuscrito, observamos que grande parte dos animais DEX apresentavam tendência para menor glicemia de jejum antes dos testes funcionais. Com base nessa observação inicial, realizamos um experimento no qual os animais foram mantidos em jejum prolongado, buscando verificar o possível déficit na regulação do metabolismo glicêmico nessa condição.

Nesse sentido, com base nos dados da figura A1, observa-se menor concentração de glicose sanguínea nos animais DEX a partir de 48 horas de jejum.

Figura A1 – Ratos nascidos com baixo peso ao nascer são hiperglicêmicos no jejum prolongado.

Glicemia segundo o tempo de jejum de animais adultos machos provenientes de ratas tratadas (DEX) ou não (CTL) com dexametasona na água de beber (200 µg/kg peso corpóreo/dia) por 7 dias, CTL = controle, DEX = dexametasona (200 µg/kg peso corpóreo/dia). * $P < 0,05$; $N=4$.

Uma vez que a maior diferença entre os grupos se deu na 60ª hora de jejum, escolhemos esse período para analisarmos a funcionalidade do tecido hepático. Observamos que os animais DEX têm menor resposta glicêmica a um teste de tolerância à glicose (Figura A2), menor capacidade gliconeogênica no desafio com piruvato (Figura A3) e ainda apresentam resistência à insulina (Figura A4).

Figura A2 – Animais tratados intrauterinamente com dexametasona têm menor resposta glicêmica em um teste de infusão de glicose durante o jejum prolongado.

Teste de tolerância à glicose e área sob a curva de animais adultos machos provenientes de ratas tratadas (DEX) ou não (CTL) com dexametasona na água de beber (200 µg/kg peso corpóreo/dia) por 7 dias, CTL = controle, DEX = dexametasona (200 µg/kg peso corpóreo/dia). * P<0,05; N=4.

Figura A3 – Ratos adultos tratados intrauterinamente com dexametasona apresentam menor capacidade gliconeogênica durante o jejum prolongado.

Teste de tolerância ao piruvato e área sobre a curva de animais adultos (90 d) machos provenientes de ratas tratadas (DEX) ou não (CTL) com dexametasona na água de beber (200 µg/kg peso corpóreo/dia) por 7 dias submetidos a jejum de 60 horas. CTL = controle, DEX = dexametasona (200 µg/kg peso corpóreo/dia). * P<0,05; N=4.

Figura A4 – Ratos adultos tratados intrauterinamente com dexametasona são resistentes à insulina após 60 horas de jejum.

Teste de tolerância à insulina e KITT de animais adultos (90 d) machos provenientes de ratas tratadas (DEX) ou não (CTL) com dexametasona na água de beber (200 µg/kg peso corpóreo/dia) por 7 dias, submetidos a jejum de 60 horas. CTL = controle, DEX = dexametasona (200 µg/kg peso corpóreo/dia). * $P < 0,05$; $N = 3$.

Figura A5 – Ratos adultos tratados intrauterinamente com dexametasona apresentam maiores concentrações de corticosterona após 60 horas de jejum.

Concentrações plasmáticas de corticosterona de animais adultos (90 d) machos provenientes de ratas tratadas (DEX) ou não (CTL) com dexametasona na água de beber (200 µg/kg peso corpóreo/dia) por 7 dias, submetidos a jejum de 60 horas. CTL = controle, DEX = dexametasona (200 µg/kg peso corpóreo/dia). * $P < 0,05$; $N = 3-6$.

A análise de proteínas por *Western Blotting* revelou a redução do conteúdo de GR, o aumento da expressão de G6Pase e a maior fosforilação das ERK 1/2 (Figura A6). Ao analisarmos o RNAm de alguns genes, detectamos maior conteúdo de transcritos de MKP3 e de MRP2 e a redução do conteúdo de RNAm que codifica a iNOS (Figura A7). Acreditamos que a possível alteração na sensibilidade a glicocorticoides, associada à redução na expressão da iNOS, seja determinante para as alterações observadas no metabolismo glicêmico em condições de jejum prolongado em animais DEX. No presente momento, estamos tentando elucidar o mecanismo que permeia esses fenômenos.

Figura A6 – Tratamento precoce com dexametasona reduz a atividade da via dos glicocorticoides no fígado de ratos adultos no jejum prolongado e ativa a ERK.

Conteúdo hepático de proteínas de animais adultos (90 d) machos provenientes de ratas tratadas (DEX) ou não (CTL) com dexametasona na água de beber (200 $\mu\text{g/kg}$ peso corpóreo/dia) por 7 dias, submetidos a jejum de 60 horas. CTL = controle, DEX = dexametasona (200 $\mu\text{g/kg}$ peso corpóreo/dia). * $P < 0,05$; $N = 6$.

Figura A7 – Tratamento precoce com dexametasona afeta o conteúdo de RNAm no fígado de animais adultos durante o jejum prolongado.

Conteúdo hepático de RNAm de animais adultos (90 d) machos provenientes de ratas tratadas (DEX) ou não (CTL) com dexametasona na água de beber (200 µg/kg peso corpóreo/dia) por 7 dias, submetidos a jejum de 60 horas. CTL = controle, DEX = dexametasona (200 µg/kg peso corpóreo/dia). * $P < 0,05$ em relação ao grupo controle; Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ; N=4-8.

APÊNDICE B – Pesquisa desenvolvida durante o intercâmbio no laboratório da professora Suzan E. Ozanne.

A2.1 Introdução e objetivos

A epidemia de obesidade observada em países desenvolvidos e subdesenvolvidos firma-se como um dos maiores problemas de saúde pública do século 21, sendo que sua associação com morte prematura contribui para a inversão da tendência de maior expectativa de vida nas gerações subsequentes (FRANKS et al., 2010).

De especial importância nesse contexto, está a crescente prevalência de obesidade entre mulheres em idade reprodutível, dado que grande número de evidências epidemiológicas e experimentais correlacionam a obesidade materna ao aparecimento de distúrbios metabólicos em longo prazo na prole (ALFARADHI; OZANNE 2011; NELSON; MATTHEWS; POSTON, 2010; POSTON, 2012). Esse conceito de reprogramação metabólica denota a importância da saúde materna para a prevenção de doenças crônicas na vida adulta da prole (LUCAS, 1991).

Com base nesses princípios, podemos afirmar que a maior prevalência de obesidade entre indivíduos cujos pais apresentam sobrepeso não pode ser explicada por mecanismos genéticos apenas, mas que há efeito da saúde materna sobre o fenótipo da prole em longo prazo (WHITAKER et al., 1997). Como exemplo, destacamos o comportamento materno nos períodos gestacional e lactacional como sendo crucial para a reprogramação fenotípica de sua prole, de modo que filhos de mães obesas apresentam maior risco para acúmulo de gordura quando comparados àqueles provenientes de pais obesos. Além disso, existe associação positiva independente entre o IMC materno e diversos marcadores na prole como composição corporal, adiposidade, hiperinsulinemia, pressão sanguínea e concentração de triacilgliceróis (BONEY 2005; CATALANO et al., 2009; GALE et al., 2007; HOCHNER et al., 2012; KOUPIIL; TOIVANEN, 2008; LAWLOR et al., 2007; MINGRONE, 2008; OKEN, 2009; QUEK; KOH; LEE, 1993; WHITAKER, 2004; WHITAKER et al., 2010).

Mesmo em situações nas quais a mãe é eutrófica, o consumo de dietas hiperlipídicas e o ganho de peso gestacional excessivo podem influenciar o desenvolvimento intrauterino e a composição corporal na vida adulta (BUCKLEY et al., 2005; CROZIER et al., 2010; HAUSMAN, 1991; LAWLOR et al., 2010; REYNOLDS et al., 2010; SIEGA-RIZ; LARAIA, 2006), valendo ressaltar que estudos demonstram que o período de amamentação é crítico para a programação do fenótipo obesogênico, da hiperleptinemia e da hipertensão na prole (PANTALEÃO et al., 2013; TAYLOR; POSTON, 2007).

O desenvolvimento da obesidade, independente da sua etiologia, frequentemente resulta no estabelecimento de distúrbios metabólicos característicos da síndrome metabólica, sendo que a sua manifestação no fígado, a esteatose hepática não alcoólica (EHNA), é a doença hepática mais frequente no hemisfério ocidental, com prevalência superior a 30% (LAZO; CLARK, 2008). Estudos utilizando modelos animais de obesidade materna observam a programação da EHNA em longo prazo na prole, demonstrando o potencial do ambiente intrauterino para a redefinição da capacidade metabólica desse órgão (BUCKLEY et al., 2005; OBEN et al., 2010). Todavia, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não estão totalmente descritos, representando um importante desafio para pesquisadores dessa área.

Assim, visto que a epidemia de obesidade afeta também mulheres em idade reprodutível e seus filhos, torna-se importante entender os mecanismos envolvidos na programação do fenótipo em longo prazo. Uma vez que miRNAs parecem estar envolvidos na fisiopatogênese de diferentes distúrbios metabólicos frequentemente associados ao estabelecimento da obesidade, é também relevante a investigação da possível conexão entre a obesidade materna e a participação desses transcritos no estabelecimento de distúrbios característicos da síndrome metabólica na prole, tais como a esteatose hepática não alcoólica.

Dada a necessidade da caracterização molecular dos mecanismos envolvidos no estabelecimento do fenótipo em longo prazo, o objetivo inicial do trabalho desenvolvido durante esse estágio foi identificar o repertório de miRNAs potencialmente relevantes para a disfunção hepática de camundongos expostos à dieta hiperlipídica no início da vida.

A2.2 Metodologia

A manipulação e o tratamento dos animais ocorre de forma contínua dentro das dependências do *Institute of Metabolic Sciences*, onde o grupo de pesquisas está alocado. Foram utilizados camundongos fêmeas primíparas da linhagem C57BL/6J obtidas das colônias de produção do *West Forvie Animal House*. A partir do final da lactação, os animais foram distribuídos em dois grupos segundo a dieta oferecida: Grupo obeso, recebeu ração palatável e obesogênica, consistindo de 23% de lipídeos, 40% de carboidratos (dos quais 10% sacarose), 23% de proteínas (28.43 kJ/g), com suplementação *ad libitum* com leite condensado (aproximadamente 55% de sacarose, 8% de gordura, 8% de proteína); grupo controle, recebeu dieta controle padrão, composta de 3% de lipídeos, 50% de carboidratos (dos quais 7% sacarose) e 15% de proteínas (FERNANDEZ-TWINN et al., 2012).

Para o experimento em questão, animais gestantes foram mantidas em suas respectivas dietas durante todo o período gestacional e lactacional. Ao final da lactação (21 dias), metade dos filhotes de cada ninhada passou a receber dieta comercial padrão e a outra metade recebeu a dieta obesogênica. As ninhadas foram padronizadas para 6 filhotes machos/mãe e o presente estudo contou com 4 grupos experimentais (CC, CO, OC, OO), segundo descrito na figura A8.

Figura A8: Desenho experimental.

As proles foram eutanasiadas por decapitação ao final da décima segunda semana de vida para remoção do tecido hepático que foi imediatamente processado para as análises descritas nos tópicos subsequentes.

A2.2.1 Análise do conteúdo lipídico do tecido hepático

Para a análise quantitativa do acúmulo de gordura hepática, o extrato etéreo de amostras de aproximadamente 100 mg de tecido hepático foi extraído por *Folch Assay*.

Inicialmente, as amostras de fígado foram homogeneizadas em 1 ml de solução de *Folch* (clorofórmio:metanol 2:1) com o auxílio de homogeneizador *ribolyser* e esferas de cerâmica em duas centrifugações de 30 segundos a 6000 rpm. Após centrifugação, adicionou-se 200 µl de água ao extrato e a mistura foi homogeneizada por *vortex* e por agitação orbital de 10 minutos em temperatura ambiente. Amostras foram então centrifugadas por 10 minutos a 13200 rpm e da fração superior gerada (correspondente ao clorofórmio), foram coletados 500 µl e transferidos para um tubo de vidro previamente pesado. Os tubos foram mantidos em banho seco *overnight* e pesados novamente.

A2.2.2 Análises histológicas

Fígados inteiros de animais adultos foram fixados em formalina até posterior confecção dos cortes histológicos. Após a fixação, o material passou por uma bateria de desidratação composta por uma lavagem de 1 hora em etanol 95%, três lavagens de 1 hora em etanol 100% e duas lavagens de 1 hora em xilol. Finalmente, as amostras foram mantidas em três banhos de 1 hora em parafina a 60 °C e foi incluídas em parafina usando formas de aço inox. Os blocos de parafina com os tecidos foram então desbastados em micrótomo automatizado [Fully Automated Rotary Microtome Leica RM2255 (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany)], removendo a sua região superficial. Posteriormente, cortes de 5 µm foram coletados em lâmina de vidro previamente higienizada em álcool 70% e preparada com poli-l-lisina.

A2.2.3 Hematoxilina e Eosina (HE)

Para as colorações, as lâminas foram desparafinizadas com lavagens de 3 minutos de xilol, etanol 100%, etanol 95%, etanol 70% e água corrente. Posteriormente, elas foram imersas em hematoxilina por 3 minutos, lavadas em água corrente por 5 minutos, diferenciadas rapidamente com solução 0,5% ácido clorídrico em álcool 70%, novamente lavadas com água corrente e contracoradas com eosina por 2 minutos. Posteriormente, os tecidos fixados foram novamente desidratados com uma bateria composta por etanol 95%, etanol 100%, xilol e xilol para montagem.

A2.2.4 Oil Red O (ORO)

Lâminas foram lavadas com água destilada e, posteriormente, imersas brevemente em 60% isopropanol. A coloração foi conduzida pela imersão das lâminas em solução filtrada de *Oil Red O* (1,5g *Oil Red O*; 300 ml isopropanol; 200 ml água destilada) por 15 minutos. Em seguida, elas foram lavadas rapidamente em 60% isopropanol e água corrente. Lâminas coradas com *Oil Red O* foram imersas em solução de hematoxilina de Mayer por 3 minutos e depois lavadas em água corrente pelo mesmo período. Procedeu-se a montagem das lâminas com solução de montagem sintética.

A2.2.5 *Picro-sirius Red (PSR)*

Lâminas foram lavadas com água destilada e, posteriormente, imersas em hematoxilina de Weigert por 8 minutos. Após essa primeira coloração, lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos. Ao final desse período, conduziu-se a coloração com picro-sirius red (Sigma Adrich) por 1 hora e as lâminas lavadas em água acidificada (0,5% ácido acético). Após secagem breve, procedeu-se a desidratação em três séries de etanol 100%, uma breve lavagem em xilol e a montagem das lâminas com solução de montagem sintética.

A2.2.6 *Conteúdo de glicogênio hepático*

Amostras de fígado (50 mg) em duplicata foram homogeneizadas em água destilada gelada usando-se almofariz e pestilo de vidro e transferidos para tubos de 1,5 ml. Amostras foram então incubadas em banho-maria a 55 °C por 10 minutos. Adicionou-se a cada tubo 0,3 ml de água deionizada, 0,1 ml de tampão acetato (0,05 M acetato de sódio em 0,931 ml ácido acético em 500 ml água deionizada) e 70 unidades de amiloglicosidase. Tubos foram agitados e incubados por 10 minutos a 55 °C. Após incubação, foram removidos do banho e à mistura adicionou-se 0,5 ml 0,3 M fosfato de zinco e 0,5 0,3 M hidróxido de bário para desproteinização das amostras. Tubos foram agitados por *flickering* e centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi então removido, transferido para outros 2 tubos. A concentração de glicogênio foi então mensurada por glicosímetro e calculada posteriormente.

A2.2.7 *Western Blotting*

A análise do conteúdo de proteínas no tecido hepático foi realizada por *western blotting* com metodologia de uso corrente no laboratório. Inicialmente, o fígado congelado foi homogeneizado em tampão de extração contendo 100 mM tampão TRIS (pH 7,00), 10 mM EDTA (pH 8,00), 1% SDS, 10 mM NaF. Para a homogeneização foi usado homogeneizador elétrico (Kinematica Polytron®, Newark, New Jersey, United States) na velocidade máxima. As amostras foram, então, centrifugadas por 20 minutos a 12.000 g e temperatura de 4 °C. Após a centrifugação, coletou-se o sobrenadante, que foi transferido para outro tubo. A concentração de proteínas do homogenato foi determinada através do ensaio de Bradford. Homogenatos provenientes de amostras de linhagens celulares permanentes tiveram a sua concentração de proteínas determinada pelo ensaio do ácido bicinonínico. As amostras foram

então combinadas com tampão de amostra contendo 240 mM Tris, (pH 6,8), 40% glicerol, 0,8% SDS, 10% beta-mercaptoetanol e 0,02% azul de bromofenol. Amostras contendo 25-35 µg de proteína foram submetidas à eletroforese no gel de poliacrilamida, inicialmente a 60 V. Uma vez que as proteínas atravessaram o gel de empilhamento, a voltagem foi aumentada para 120 V, sendo mantida até o final da corrida. A transferência de proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose foi realizada equipamento de transferência *semi-dry*, na presença de tampão de transferência, sob corrente de 400 mA, por 90-120 min. A eficiência da transferência foi verificada corando-se a membrana, por 5 min, com corante *Ponceau red* (1% ponceau, 1% ácido acético), seguida de lavagem com PBST [8% NaCl, 0,2% KCl, 0,2% KH₂(PO)₄, 1,15% Na₂H(PO)₄, 0,5% Tween]. Os sítios sem proteínas das membranas foram bloqueados com leite em pó desnatado 5%, em tampão PBST, por 60 min, sob agitação. O anticorpo específico para cada proteína de interesse foi diluído em PBST e utilizado para a incubação das membranas overnight, sob agitação em geladeira a 4 °C. Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes, por 10 min, com PBST e incubada com anticorpo anti-IgG, conjugado com peroxidase de raiz forte, diluído 1:10000 em PBST, por 1 h, sob agitação em geladeira. A membrana foi lavada 3 vezes, por 10 min, com agitação. Uma solução de revelação composta por luminol, tampão Tris, ácido p-cumárico e peróxido de hidrogênio foi utilizada para umedecer as membranas. Os blots foram visualizados por revelação em filmes para raios-X ou por revelação em câmara escura acoplada a uma câmera fotográfica de alta resolução.

A2.2.8 Análise do perfil transcricional por RNASeq

Inicialmente, foi analisado o perfil de expressão de RNAm no tecido hepático, utilizando a técnica de sequenciamento quantitativo de RNA (RNASeq). Para tanto, foi realizada a extração de RNA utilizando o reagente *Qiazol*® (Qiagen) e o kit comercial de purificação miRNeasy mini kit (Qiagen). Após extração, o RNA de 3 amostras de cada grupo experimental foi quantificado por espectrofotometria em nanodrop e submetido à eletroforese biofluida utilizando equipamento Bioanalyzer (Agilent Bioanalyzer 2100) para análise da integridade das frações ribossomais (Figura A9). O RNA proveniente dessas amostras foi então utilizado para a construção das *libraries* seguindo o protocolo proposto pelo fabricante do *TruSeq Sample Preparation Kit* e o posterior sequenciamento utilizando o sistema de sequenciamento HiSeq 2500.

Figura A9: Teste revela que amostras de RNA extraídas de fígados de animais adultos apresentam qualidade compatível com a análise do transcriptoma.

A2.2.9 Confirmação da expressão dos RNAm regulados por qPCR

Em posse dos dados provenientes do sequenciamento de RNA, conduzimos um processo de validação de expressão de RNAm escolhidos randomicamente. Do RNA total extraído e quantificado, realizamos a transcrição reversa a partir de 1 µg. Para tanto,

adicionamos 4 µl do tampão RT 5X, 1 µl de mistura de dNTP (10 mM cada nucleotídeo), 2,4 µl de solução de cloreto de magnésio (25 mM), 1 µl de transcriptase reversa [(Improm II Promega)] e q.s.p. 20 µl de água ultra pura. Após agitação, a mistura foi mantida a 25 °C por 5 min e a transcrição reversa ocorreu através de aquecimento a 42 °C por 60 min, seguida da inativação da enzima por aquecimento a 70 °C por 15 min. A amplificação seguiu protocolo padrão de qPCR com SYBR Green (ABI Biosciences): 2X Mastermix SYBR Green (6,25 µl por reação), 0,25 µl de primer sense (10 µM) e 0,25 µl de primer antisense (10 µM), 0,5 µl de cDNA e 5,25 µl de água ultra pura. Para a amplificação, essa mistura é aquecida a 95 °C por 3 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação (95 °C, 3 s) e anelamento/extensão (60 °C, 30 s). A média geométrica dos CTs obtidos na análise de conteúdo de RNAm de CDHA e de HPRT foi utilizada para normalização dos resultados. A escolha desses dois genes se deu pela análise dos CTs de cinco diferentes genes constitutivos através do software geNorm v3.4 pautado no algoritmo proposto por Vandesompele et al. (2002). A quantificação da expressão relativa dos RNAm estudados foi feita utilizando a equação de cálculo do $\Delta\Delta Ct$.

A2.2.10 Análise do perfil de microRNAs

Para a análise do perfil de expressão de miRNAs, também utilizamos o sequenciamento quantitativo de RNA (RNASeq). Todavia, para a construção das *libraries*, seguiu-se o protocolo proposto *TruSeq Small RNA Sample Preparation Kit*, que conta com um processo de enriquecimento e RNAs com tamanho inferior a 200 nucleotídeos. A validação do processo de enriquecimento foi realizada com *kit 2100 Expert Small RNA* para equipamento Bioanalyzer 2100 e está ilustrada na figura A10. Após os procedimentos de ligação de adaptadores e amplificação dos transcritos, a verificação das *libraries* por Bioanalyzer usando *kit High Sensitivity DNA* resultou nos eletroferogramas apresentados na figura A11. Os resultados obtidos de molaridade para fragmentos entre 140 e 160 bp foram usados para os cálculos do *pool*. Após isolamento em gel de poliacrilamida e concentração por precipitação, os *pools* foram testados e os resultados obtidos apresentados nas figuras A12 e A13.

Figura A10: Enriquecimento de RNA foi efetivo nas amostras de tecido hepático

A construção das *libraries* seguiu o protocolo do fabricante e, ao final, um processo de validação foi conduzido utilizando o *kit 2100 High sensitivity DNA* e a análise feita por equipamento Bioanalyzer 2100 (Figura A10). Novamente, seguiu-se o sequenciamento por HiSeq 2500.

Figura A11: Quantificação das libraries para posterior *pooling*.

Figura A12: Após isolamento de bandas entre 145 e 160 bp, eletroferograma apresenta fragmentos de tamanho correto, com, todavia, concentração baixa.

Figura A13: Processo de concentração de *pool* de libraries resulta em soluções com concentração de cDNA aumentada.

A2.3 Resultados

Inicialmente, observamos o aumento do depósito de gordura ectópica no tecido hepático de camundongos jovens (12 semanas de vida) expostos à obesidade materna e à dieta obesogênica pós lactacional (Grupo OO na figura A14) quando comparados a camundongos saudáveis (grupo CC) ou expostos à dieta hiperlipídica apenas no início da vida (grupo OC) ou após a lactação (grupo CO). Análises histológicas corroboram os dados quantitativos levantados (Figura A15). Essa primeira etapa do trabalho determinou o ponto de partida para as investigações subsequentes no laboratório de destino, tendo em vista que o impacto da obesidade materna parece ser potencializado pelo comportamento alimentar da prole após a lactação.

Figura A14 – Combinação de dieta hiperlipídica materna e pós-lactacional resulta em maior acúmulo de gordura hepática em ratos.

Peso do tecido hepático (A) e conteúdo de lipídeos expresso em percentual da massa do tecido (B) e em massa total (C) em fígados de animais controle (CC), de animais expostos à dieta obesogênica após a lactação (CO), de animais provenientes de mães obesas e que receberam dieta controle (OC) ou de animais provenientes de mães obesas e que receberam dieta obesogênica após a lactação (OO). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. N=6-9. CC/CO x OC/OO = efeito da dieta materna; CC/OC x CO/OO = efeito da dieta pós lactacional.

Figura A15 – Imagens histológicas confirmam o acúmulo de gordura no fígado de animais OO.

Figuras representativas de cortes histológicos do fígado de animais adultos expostos à dieta controle (CC), de animais expostos à dieta obesogênica após a lactação (CO), de animais provenientes de mães obesas e que receberam dieta controle (OC) ou de animais provenientes de mães obesas e que receberam dieta obesogênica após a lactação (OO). As amostras foram coradas com Oil Red O, Sudan Black ou Picrosirius red (C).

Dentre os experimentos investigativos conduzidos, a análise da expressão de genes lipogênicos revelou o maior conteúdo de FAS e de ACC e a maior abundância de RNAm que codifica para PPAR γ (Figura A16).

Figura A16 – Expressão de genes lipogênicos é aumentada no tecido hepático de animais provenientes de mães obesas e que receberam dieta hiperlipídica no período pós lactacional.

Conteúdo hepático de proteínas de animais adultos expostos à dieta obesogênica após a lactação (CO), de animais provenientes de mães obesas e que receberam dieta controle (OC) ou de animais provenientes de mães obesas e que receberam dieta obesogênica após a lactação (OO). * P<0,05; ** P<0,01; N=6. CC/CO x OC/OO =

efeito da dieta materna; Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes; CC/OC x CO/OO = efeito da dieta pós lactacional.

A análise da expressão de genes lipogênicos resultou na observação da menor expressão de ATGL no grupo OO e a regulação pela dieta obesogênica pós-lactacional da atividade gênica de PPARalpha (Figura A17).

Figura A17 – Exposição à dieta hiperlipídica durante a gestação e no período pós-lactacional induz a redução da expressão de ATGL no fígado de ratos adultos.

Conteúdo hepático de proteínas de animais adultos expostos à dieta obesogênica após a lactação (CO), de animais provenientes de mães obesas e que receberam dieta controle (OC) ou de animais provenientes de mães obesas e que receberam dieta obesogênica após a lactação (OO). * $P < 0,05$; $N = 6$. CC/CO x OC/OO = efeito da dieta materna; CC/OC x CO/OO = efeito da dieta pós lactacional.

O passo seguinte foi analisar a expressão de genes relacionados à via de sinalização da insulina. Como é possível observar na figura A18, não houve alteração na atividade gênica de INSR e de IRS1. Todavia, a análise do conteúdo de genes gliconeogênicos revelou a redução na expressão de PEPCK e de G6Pase em resposta à dieta hiperlipídica pós lactacional. Esse resultado ressalta o possível efeito sobre a atividade gliconeogênica no fígado desses animais.

Figura A18 – Exposição à dieta hiperlipídica durante a gestação e no período pós-lactacional induz a redução da expressão de PEPCK, mas não afeta a expressão de componentes da via de sinalização à insulina no fígado de ratos adultos.

Conteúdo hepático de proteínas de animais adultos expostos à dieta obesogênica após a lactação (CO), de animais provenientes de mães obesas e que receberam dieta controle (OC) ou de animais provenientes de mães obesas e que receberam dieta obesogênica após a lactação (OO). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; $N = 6$. CC/CO x OC/OO = efeito da dieta materna; CC/OC x CO/OO = efeito da dieta pós lactacional.

A investigação da atividade gênica e da fosforilação de GSK3, relacionado com a regulação da gliconeogênese corrobora a hipótese de regulação negativa da gliconeogênese no fígado de animais que receberam dieta hiperlipídica pós lactacional (Figura 19).

Figura A19 – Dieta hiperlipídica em diferentes etapas da vida afetam a expressão e a fosforilação de GS3K.

Conteúdo e fosforilação de GS3K no fígado de animais adultos expostos à dieta obesogênica após a lactação (CO), de animais provenientes de mães obesas e que receberam dieta controle (OC) ou de animais provenientes de mães obesas e que receberam dieta obesogênica após a lactação (OO). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; $N = 6$. $CC/CO \times OC/OO$ = efeito da dieta materna; $CC/OC \times CO/OO$ = efeito da dieta pós lactacional.

Finalmente, decidimos investigar a concentração de glicogênio hepático no fígado. Todavia, quando submetidos ao jejum de 12 horas, os animais não apresentam diferença nesse parâmetro (Figura 20).

Figura A20 – Concentração de glicogênio hepático não é afetada pelas diferentes dietas em animais jejuados por 12 horas.

Concentração de glicogênio hepático de animais expostos à dieta obesogênica após a lactação (CO), de animais provenientes de mães obesas e que receberam dieta controle (OC) ou de animais provenientes de mães obesas e que receberam dieta obesogênica após a lactação (OO).

Outro marcador não afetado pelas dietas utilizadas no estudo foi a expressão de $\text{TNF}\alpha$ (Figura A21).

Figura A21 – Dieta materna não afeta a expressão de $\text{TNF}\alpha$ no fígado de ratos com 12 semanas de vida

Conteúdo hepático $\text{TNF}\alpha$ de animais adultos expostos à dieta obesogênica após a lactação (CO), de animais provenientes de mães obesas e que receberam dieta controle (OC) ou de animais provenientes de mães obesas e que receberam dieta obesogênica após a lactação (OO). N=6. CC/CO x OC/OO = efeito da dieta materna; CC/OC x CO/OO = efeito da dieta pós lactacional.

Após a caracterização fenotípica do fígado dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais, iniciamos a análise do transcriptoma utilizando o sequenciamento quantitativo de RNA. Resultados encontram-se descritos nos diagramas de Venn apresentados nas figuras A22-24.

Figura A22 – Animais adultos pertencentes ao grupo OO têm o maior número de genes hepáticos regulados após jejum noturno quando comparado ao controle.

Figura A23 – Expressão de 1979 genes é afetada no fígado de animais OO quando comparados a animais CC.

Figura A24 – Animais adultos pertencentes ao grupo OO têm o maior número de genes hepáticos regulados após jejum noturno quando comparado ao grupo CO.

Figura A24 – Animais adultos pertencentes ao grupo OO têm o maior número de genes hepáticos regulados após jejum noturno quando comparado ao grupo OC.

A análise em larga escala do transcriptoma revelou a regulação de grande número de genes que participam de diferentes processos biológicos (Tabelas A1, A2 e A3). A análise cuidadosa desses dados revela o potencial da dieta materna na reprogramação da funcionalidade hepática (Tabela 2); Todavia, salta à vista a regulação de processos metabólicos e associados com a resposta imune no fígado de animais do grupo OO, fato que

corroborar a hipótese de maior efeito quando do uso de dieta hiperlipídica em animais previamente expostos à obesidade materna (Tabela 3).

Tabela A1. Processos biológicos mais afetados na comparação entre os grupos CC e CO e número de genes regulados.

Pathway name	# Entities found CC x CO
Metabolism	122
Immune System	63
Disease	53
Signal Transduction	47
Metabolism of lipids and lipoproteins	39
Cytokine Signaling in Immune system	32
Innate Immune System	30
Myoclonic epilepsy of Lafora	29
Glycogen storage diseases	29
Metabolism of carbohydrates	29

Tabela A2. Processos biológicos mais afetados na comparação entre os grupos CC e OC e número de genes regulados.

Pathway name	# Entities found CC x OC
Metabolism	35
Metabolism of lipids and lipoproteins	18
Signal Transduction	15
Disease	12
Developmental Biology	10
Immune System	9
Metabolism of amino acids and derivatives	8
Axon guidance	8
Transmembrane transport of small molecules	8
Cholesterol biosynthesis	7
Extracellular matrix organization	7
SLC-mediated transmembrane transport	7
Innate Immune System	7
Metabolism of proteins	7

Tabela A3. Processos biológicos mais afetados na comparação entre os grupos CC e OO e número de genes regulados.

Pathway name	# Entities found
	CC X OO
Metabolism	206
Immune System	172
Signal Transduction	140
Disease	98
Adaptive Immune System	87
Gene Expression	84
Metabolism of lipids and lipoproteins	79
Cytokine Signaling in Immune system	67
Innate Immune System	66
Hemostasis	59

A2.4 Referências

ALFARADHI, M. Z.; OZANNE, S. E. Developmental programming in response to maternal overnutrition. **Front. Genet.**, v. 2, n. 27, p. 2-27, 2011.

BASU, N.; HEAD, J.; NAM, D. H.; PILSNER, J. R.; CARVAN, M. J.; CHAN, H. M.; GOETZ, F. W.; MURPHY, C. A.; ROUVINEN-WATT, K.; SCHEUHAMMER, A. M. Effects of methylmercury on epigenetic markers in three model species: mink, chicken and yellow perch. **Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.**, v. 157, n. 3, p. 322-327, 2013.

BONEY, C. M.; VERMA, A.; TUCKER, R.; VOHR, B. R. Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity and gestational diabetes mellitus. **Pediatrics**, v. 115, n. 6, p. 290-296, 2005.

BOULPAEP, E. L.; BORON, W. F. **Medical physiology: a cellular and molecular approach**. 2nd ed. Saunders, 2009.

BUCKLEY, A. J.; KESERU, B.; BRIODY, J.; THOMPSON, M.; OZANNE, S. E.; THOMPSON, C. H. Altered body composition and metabolism in the male offspring of high fat-fed rats. **Metabolism**, v. 54, p. 500-507, 2005.

CATALANO, P. M.; FARRELL, K.; THOMAS, A.; HUSTON-PRESLEY, L.; MENCIN, P.; DE MOUZON, S. H.; AMINI, S. B. Perinatal risk factors for childhood obesity and metabolic dysregulation. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 90, p. 1303-1313, 2009.

CROZIER, S. R.; INSKIP, H. M.; GODFREY, K. M.; COOPER, C.; HARVEY, N. C.; COLE, Z. A.; ROBINSON, S. M. Weight gain in pregnancy and childhood body composition: findings from the Southampton Women's Survey. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 91, p. 1745-51, 2010.

FERNANDEZ-TWINN, D. S.; BLACKMORE, H. L.; SIGGENS, L.; GIUSSANI, D. A.; CROSS, C. M.; FOO, F. OZANNE, S. E. The programming of cardiac hypertrophy in the offspring by maternal obesity is associated with hyperinsulinemia, AKT, ERK and mTOR activation. **Endocrinology**, v. 153, p. 5961-5971, 2012.

FRANKS, P. W.; HANSON, R. L.; KNOWLER, W. C.; SIEVERS, M. L.; BENNETT, P. H.; LOOKER, H. C. Childhood obesity, other cardiovascular risk factors and premature death. **N. Engl. J. Med.**, v. 362, p. 485-493, 2010.

GALE, C. R.; JAVAID, M. K.; ROBINSON, S. M.; LAW, C. M.; GODFREY, K. M.; COOPER, C. Maternal size in pregnancy and body composition in children. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 92, p. 3904-3911, 2007

HOCHNER, H.; FRIEDLANDER, Y.; CALDERON-MARGALIT, R.; MEINER, V.; SAGY, Y.; AVGIL-TSADOK, M.; BURGER, A.; SAVITSKY, B.; SISCOVICK, D. S.; MANOR, O. Associations of maternal pre-pregnancy body mass index and gestational weight gain with adult cardiometabolic risk factors: the Jerusalem perinatal family follow-up study. **Circulation**, v. 125, p. 1381-1389, 2012.

KOUPIL, I.; TOIVANEN, P. Social and early-life determinants of overweight and obesity in 18-year old Swedish men. **Int. J. Obes.**, v. 32, p. 73-81, 2008.

LAWLOR, D. A.; BENFIELD, L.; LOGUE, J.; TILLING, K.; HOWE, L. D.; FRASER, A.; CHERRY, L.; WATT, P.; NESS, A. R.; SMITH, G.; SATTAR, N. Association between general and central adiposity in childhood, and change in these, with cardiovascular risk factors in adolescence: prospective cohort study. **BMJ**, v. 341, 2010.

LAWLOR, D. A.; SMITH, G. D.; O'CALLAGHAN, M.; ALATI, R.; MAMUN, A. A.; WILLIAMS, G. M.; NAJMAN, J. M. Epidemiological evidence for the fetal over-nutrition hypothesis: findings from the mater-university study of pregnancy and its outcomes. **Am. J. Epidemiol.**, v. 165, p. 418-424, 2007.

LAZO, M.; CLARK, J. M. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: a global perspective. **Seminars in Liver Disease**, v. 28, p. 339-350, 2008.

LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. **Ciba Found. Symp.**, v. 156, p. 38-55, 1991.

MINGRONE, G.; MANCO, M.; MORA, M. E.; GUIDONE, C.; IACONELLI, A.; GNIULI, D.; LECCESI, L.; CHIELLINI, C.; GHIRLANDA, G. Influence of maternal obesity on insulin sensitivity and secretion in offspring. **Diabetes Care**, v. 31, p. 1872-1876, 2008.

MCDEVITT M. A. Clinical applications of epigenetic markers and epigenetic profiling in myeloid malignancies. **Semin. Oncol.**, v. 39, n. 1, p. 109-122, 2012.

NELSON, S. M.; MATTHEWS, P.; POSTON, L. Maternal metabolism and obesity: modifiable determinants of pregnancy outcome. **Human Reprod.**, v. 16, p. 255-275, 2010

OBEN, J. A.; MOURALIDARANE, A.; SAMUELSSON, A. M.; MATTHEWS, P. J.; MORGAN, M. L.; MCKEE, C.; SOEDA, J.; FERNANDEZ-TWINN, D. S.; MARTIN-GRONERT, M. S.; OZANNE, S. E.; SIGALA, B.; NOVELLI, M.; POSTON, L.; TAYLOR, P. D. Maternal obesity during pregnancy and lactation programs the development of offspring non-alcoholic fatty liver disease in mice. **J. Hepatol.**, v. 52, n. 6, p. 913-920, 2010.

OKEN, E. Maternal and childhood obesity: the causal link. **Obstetrics and gynecology clinics of North America**, v. 36, p. 361-377, 2009.

PANTALEÃO, L. C.; TEODORO, G. F.; TORRES-LEAL, F. L.; VIANNA, D.; DE PAULA, T. D.; DE MATOS-NETO, E. M.; TRINDADE, M. C.; ROGERO, M. M.; BUENO, C. R. JR; TIRAPAGUI, J. Maternal postnatal high-fat diet, rather than gestational diet, affects morphology and mTOR pathway in skeletal muscle of weaning rat. **J. Nutr. Biochem.**, v. 24, n. 7, p. 1340-1348, 2013.

POSTON, L. Maternal obesity, gestational weight gain and diet as determinants of offspring long-term health. **Best Pract. Res. Clin Endocrinol. Metab.**, v. 26, p. 627-639, 2012.

QUEK, C. M.; KOH, K.; LEE, J. Parental body mass index: a predictor of childhood obesity? **Ann. Acad. Med. Singapore**, v. 22, p. 342-347, 1993.

REYNOLDS, R. M.; OSMOND, C.; PHILIPS, D. I.; GODFREY, K. M. Maternal BMI, parity and pregnancy weight gain: influences on offspring adiposity in young adulthood. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 95 p. 5365-5369, 2010.

TAYLOR, P. D.; POSTON, L. Developmental programming of obesity in mammals. **Exp Physiol.**, v. 92, n. 2, p. 287-298, 2006.

WHITAKER, K. L.; JARVIS, M. J.; BEEKEN, R. J.; BONIFACE, D.; WARDLE, J. Comparing maternal and paternal intergenerational transmission of obesity risk in a large population-based sample. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 91, p. 1560-1567, 2010.

WHITAKER, R. C. Predicting preschooler obesity at birth: the role of maternal obesity in early pregnancy. **Pediatrics**, v. 114, p. 29-36, 2004

WHITAKER, R. C.; WRIGHT, J. A.; PEPE, M. S.; SEIDEL, K. D.; DIETZ, W. H. Predicting obesity in young adulthood from childhood and parental obesity. **N. Engl. J. Med.**, v. 337, p. 869-873, 1997.