MYCHEL RAONY PAIVA TEIXEIRA MORAIS

Estudo da matriz extracelular metanéfrica e dos efeitos do diabetes *mellitus* materno sobre o desenvolvimento renal em camundongos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular, Tecidual e do Desenvolvimento

Orientador: Profa. Dra. Telma Maria Tenório Zorn

Coorientador: Prof. Dr. Sebastián San Martín

Versão parcial corrigida

São Paulo

2019

RESUMO

MORAIS, M. R. P. T. M. **Estudo da matriz extracelular metanéfrica e dos efeitos do diabetes *mellitus* materno sobre o desenvolvimento renal em camundongos.** 2019. 199 f. Tese (Doutorado em Biologia de Sistemas) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O desenvolvimento renal em gestações diabéticas vem sendo amplamente investigado, porém, pouco se sabe sobre as alterações na matriz extracelular (MEC) metanéfrica nesta condição. A MEC exerce um papel essencial no desenvolvimento renal, portanto, alterações na sua composição, organização e propriedades físico-químicas durante a gestação hiperglicêmica podem ter efeitos negativos sobre este órgão. Nossa hipótese é a de que o diabetes *mellitus* (DM) materno restringe o desenvolvimento dos rins e altera a composição e *turnover* da MEC metanéfrica. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do DM materno sobre a estrutura dos rins e função urinária em fetos pré-termo, bem como caracterizar a composição, organização e alterações na MEC metanéfrica, usando um modelo de gestação complicada por DM tipo 1 induzido com aloxana (40 mg/kg, dose única) em camundongos, sem tratamento insulínico. Neste modelo, fêmeas normoglicêmicas (controle) e diabéticas foram acasaladas com machos normoglicêmicos entre o 30º e 50º dia pós-indução, e os fetos de mães normoglicêmicas e diabéticas (FMN e FMD, respectivamente) foram coletados no 19º dia embrionário para análise. Comparados aos FMN, os FMD foram hiperglicêmicos, e sofreram restrição de crescimento intrauterino caracterizado por retardo do desenvolvimento corpóreo em relação ao desenvolvimento da cabeça. A análise do líquido amniótico revelou a ocorrência de polidrâmnio decorrente de poliúria e glicosúria fetal no grupo diabético. Os FMD subdesenvolvidos apresentaram rins com massa e volume significativamente menores em comparação aos FMN. A análise estereológica mostrou redução da proporção volumétrica do córtex renal e dilatação da pelve renal nos FMD. Observamos redução do número de néfrons (maduros e imaturos), associado a um aumento do volume corpuscular e dilatação dos túbulos contorcidos nos FMD comparados aos FMN. A análise ultraestrutural da barreira de filtração glomerular por microscopia eletrônica de transmissão revelou espessamento segmentar da membrana basal glomerular (MBG) e perda da morfologia típica dos pés terminais dos podócitos nos glomérulos maduros dos FMD. A composição do matrisoma

metanéfrico foi investigada pela primeira vez em camundongos por espectrometria de massas em tandem usando amostras enriquecidas para proteínas de MEC. Identificamos 86 proteínas estruturais (colágenos, glicoproteínas adesivas e proteoglicanos) e 75 associadas à MEC (reguladoras, afiliadas e fatores secretados), incluindo marcadores de maturação da MBG. A análise proteômica mostrou aumento de emilina-3 e COL6A6 nos rins dos FMD, validado posteriormente por *immunoblot*. A análise pela PCR em tempo real e por imunomarcacão mostrou acúmulo de colágeno IV nos rins de FMD, particularmente de COL4A1 nos glomérulos maduros. Também observamos um discreto aumento de panlaminina e redução de perlecan nos glomérulos maduros, e acúmulo de agrin na superfície apical dos túbulos contorcidos de FMD por imunohistoquímica. Zimografia em gel e *immunoblot* revelaram ativação reduzida de MMP-2 e MT1-MMP, respectivamente, nos rins de FMD. Verificamos também aumento nos níveis de TIMP-2 por PCR em tempo real, *immunoblot* e imunohistoquímica. Concluimos que o DM materno restringiu o desenvolvimento renal intrauterino em camundongos e promoveu acúmulo de MEC nos rins fetais, particularmente de colágeno IV e VI, devido ao desbalanço na expressão e *turnover* de suas proteínas.

Palavras-chave: *Diabetes mellitus*. Desenvolvimento renal. Proteômica. Matriz extracelular. Camundongo.

ABSTRACT

MORAIS, M. R. P. T. M. **Study of the metanephric extracellular matrix and the effects of maternal diabetes *mellitus* on kidney development in mice.** 2019. 199 p. PhD thesis (System Biology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Kidney development in diabetic pregnancies has been widely studied, however, little is known about the alterations on the metanephric extracellular matrix (ECM) in this gestational condition. The ECM plays an essential role during kidney development, therefore, changes in its composition, organization and physicochemical properties must have a negative effect on this organ. We hypothesize that the maternal diabetes *mellitus* (DM) restricts kidney development and alters metanephric ECM composition and turnover. Thus, this study aimed to investigate the effects of the maternal DM on the kidney structure and urinary production rate of pre-term fetuses, as well as to globally characterize the composition, organization and alterations on the metanephric ECM, using a model of pregnancy complicated by type 1 diabetes induced by a dose of alloxan (40 mg/kg) in mice, without insulin therapy. In this model, normoglycemic (control) and diabetic females were mated with normoglycemic males from the 30th to the 50th day post-induction, and fetuses of normoglycemic and diabetic mothers (FNM and FDM, respectively) were collected on the 19th embryonic day (E19). Compared to FNM, we observed that FDM were severely hyperglycemic and asymmetrically growth restricted characterized by retarded body growth in relation to head development. Growth-restricted FDM had kidneys with reduced mass and volume compared to normal FNM. Amniotic fluid analysis revealed polyhydramnios due to fetal polyuria and glycosuria in the diabetic group. Stereological analysis showed reduced volumetric proportion of the renal cortex and pelvis dilation in FDM. We observed reduced nephron endowment associated to increased corpuscular volume and dilation of convoluted tubules in FDM compared to FNM. Ultrastructural analysis of the glomerular filtration barrier by transmission electron microscopy revealed segmental thickening of the glomerular basement membrane (GBM) and morphological alterations of the foot processes of podocytes in mature glomeruli of FDM. The metanephric matrisome in mice was investigated for the first time by tandem mass spectrometry using samples enriched for ECM proteins. We identified 86 structural (collagens, adhesive glycoproteins and proteoglycans) and 75 ECM-associated

proteins (regulatory, affiliated and secreted factors), including known markers of GMB maturity. The proteomic analysis showed increased levels of EMILIN-3 and COL6A6 in FDM kidneys, which was further validated by immunoblot. Real-time PCR and immunostaining analyses showed accumulation of collagen IV in FDM kidneys, particularly of COL4A1 in mature glomeruli. We also found a discrete increase of panlaminin and reduction of perlecan in mature glomeruli, besides accumulation of agrin on the apical surface of convoluted tubules of FDM by immunohistochemistry. In gel zymography and immunoblot revealed reduced activation of MMP-2 and MT1-MMP, respectively, in FDM kidneys. We also verified increased levels of TIMP-2 by real-time PCR, immunoblot and immunohistochemistry. These analyses allowed us to conclude that the maternal DM restricted intrauterine kidney development in mice and promoted ECM accumulation in the fetal kidney, particularly of collagen, due to a misbalanced expression and turnover of its proteins.

Keywords: *Diabetes mellitus*. Kidney development. Proteomics. Extracellular matrix. Mouse.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Matriz Extracelular

A matriz extracelular (MEC) é um componente integral da maioria dos tecidos de organismos multicelulares, formada por moléculas multiméricas, ricas em múltiplos domínios altamente conservados entre as espécies, sintetizadas pelas células e secretadas no meio extracelular para formar um intrincado arcabouço com propriedades mecânicas e biológicas tecido-específicas (HYNES, 2009; HYNES; NABA, 2012; NABA; CLAUSER; HOERSCH; LIU *et al.*, 2012). A MEC é composta primordialmente por colágenos, glicoproteínas adesivas, proteoglicanos (PG) e glicosaminoglicanos (GAG), os quais associam-se por meio de ligações químicas covalentes e não-covalentes para formar um complexo intersticial, estruturalmente estável, que envolve as células do tecido conjuntivo, ou membranas basais (MB) que são malhas proteicas extremamente complexas formadas a partir da fusão de uma lâmina basal (LB) e uma lâmina reticular ou de duas LB, e que sustentam células epiteliais, musculares, adiposas e nervos periféricos (MOUW; OU; WEAVER, 2014; SULEIMAN; ZHANG; ROTH; HEUSER *et al.*, 2013; YURCHENCO; SCHITTNY, 1990).

A MEC é fundamental para a integração das células com o meio extracelular e para a manutenção da homeostase intracelular. A maioria das moléculas de MEC se ligam a receptores de superfície celular (e.g., integrinas) e regulam processos celulares como proliferação, migração, adesão, diferenciação e morte celular (HYNES; NABA, 2012; YUE, 2014). Também podem se ligar a fatores de crescimento e outras citocinas para regular a difusão dessas pequenas moléculas no meio extracelular em gradientes estáveis durante fenômenos de desenvolvimento e remodelação tecidual (HYNES, 2009). Características físicas da MEC, como rigidez e elasticidade, também exercem um efeito importante sobre o comportamento e fenótipo celular (ABDALLAH; MARTIN; EL TAHCHI; BALME *et al.*, 2019; LIU; MIH; SHEA; KHO *et al.*, 2010; MILLER; JANMEY, 2015). Deste modo, entender a composição da MEC de um tecido específico, e o padrão de expressão e organização de suas moléculas é fundamental para entender sua função biológica e alterações relacionadas a doenças.

O colágeno é a proteína mais abundante em mamíferos. Sua função primária é conferir força tênsil e resiliência mecânica à MEC. Até o momento, já foram descritos 46 genes para cadeias α diferentes e diversas isoformas dos 28 tipos de colágenos (I-XXVIII) identificados (GORDON; HAHN, 2010; NABA; CLAUSER; HOERSCH; LIU

et al., 2012). O colágeno é uma proteína trimérica, formada por três cadeias α (idênticas ou não) arranjadas numa tripla-hélice rica em sequências Gly-X-Y (Gly: glicina, e X e Y geralmente prolina e 4-hidroxi-prolina, respectivamente), flanqueada por dois domínios não-helicais ou não colagenosos (NC, do inglês *non-collagenous*) em seus terminais amino e carboxil (N- e C-terminais, respectivamente). Neste domínio tripla-hélice, também conhecido como domínio colagenoso, a glicina presente a cada três aminoácidos na sequência polipeptídica das cadeias α está posicionada no interior da hélice e mantém a estrutura da tripla-hélice estável. De acordo com o modo como se organizam dentro da MEC, os colágenos são agrupados em *i*) colágenos fibrilares (e.g., I, II, III, V, XI, XXIV e XXVII); *ii*) colágenos associados à fibrilas (IX, XII, XIV, XIX, XX, XXI e XXII) ou FACITs (do inglês, *fibrillar-associated collagens with interrupted triple-helices*), os quais participam da regulação da fibrilogênese; *iii*) colágenos formadores de redes (e.g., IV, VI, VIII e X). Outras categorias incluem os colágenos formadores de fibrilas de ancoragem (VII), multiplexinas precursoras de endostatinas antiangiogênicas (XV e XVIII) e os colágenos do tipo transmembrana (XIII, XVII, XXIII e XXV) (RICARD-BLUM, 2011; SORUSHANOVA; DELGADO; WU; SHOLOGU *et al.*, 2019).

As glicoproteínas adesivas formam uma classe de mais de 200 proteínas multifuncionais complexas, compostas por múltiplos domínios distintos bem conservados entre os táxons, e associadas geralmente a um monossacarídeo ramificado (HYNES, 2009; NABA; CLAUSER; DING; WHITTAKER *et al.*, 2016). Essas moléculas formam pontes entre colágenos e PG para estabilizar estruturas supramoleculares, como MBs (MOUW; OU; WEAVER, 2014), e se ligam a receptores de superfície celular para ancorar e integrar as células à MEC, e regular processos importantes como adesão, migração, proliferação e diferenciação durante o desenvolvimento embrionário ou em doenças. Adicionalmente, essas moléculas se ligam a fatores solúveis para controlar sua taxa de difusão no meio extracelular (HYNES, 2009; HYNES; NABA, 2012; KLEIN; LANGEGER; TIMPL; EKBLOM, 1988; RETICKER-FLYNN; MALTA; WINSLOW; LAMAR *et al.*, 2012).

Os proteoglicanos (PG) são moléculas multifuncionais, formadas por um eixo proteico ligado covalentemente a cadeias laterais de glicosaminoglicanos (GAGs), polímeros lineares de unidades dissacarídicas repetidas. Além de seu papel estrutural, os PGs atuam como importantes reguladores morfogênicos capazes de interagir com outras moléculas da MEC como colágenos e glicoproteínas adesivas, fatores de

crescimento e outras citocinas, e com receptores celulares para controlar processos celulares tais como diferenciação, migração, adesão e proliferação (STEER; SHAH; BUSH; STUART *et al.*, 2004; TIMPL, 1989). Os PG podem ser encontrados no meio extracelular, mas também associados à superfície celular. Os principais proteoglicanos de MB são os proteoglicanos de heparan sulfato (HSPG, do inglês, *heparan-sulfate proteoglycans*), dos quais os mais importantes são perlecan e agrin (IOZZO, 2005).

1.1.1 O matrisoma

O conjunto de proteínas de MEC (colágenos, glicoproteínas adesivas e proteoglicanos) e proteínas associadas à MEC (reguladoras, afiliadas e fatores secretados) de um organismo é conhecido como matrisoma. Um esforço conjunto de grupos de pesquisa em MEC, tem sido feito para caracterizar a composição global da MEC dos tecidos de diversos organismos, em condições normais e patológicas, como câncer. Isso tem sido alcançado a partir de estudos proteômicos em muitos tecidos e tumores, linhagens celulares, e *in silico* por meio do escaneamento do genoma de diversas espécies em busca de proteínas que possuam domínios característicos de moléculas de MEC (HYNES; NABA, 2012; NABA; CLAUSER; DING; WHITTAKER *et al.*, 2016). Atualmente, já estão disponíveis listas matrisomais validadas para humanos, camundongos, *zebrafish*, *C. elegans* e para a mosca-das-frutas (disponível em: <<http://matrisomeproject.mit.edu>>). O matrisoma descrito para camundongos é composto por 1110 proteínas, que incluem 274 proteínas de MEC e 836 proteínas associadas, expressas de modo tecido-dependente (disponível em: <<http://matrisomeproject.mit.edu/other-resources/mouse-matrisome>>).

A seguir, apresentamos uma revisão de literatura sobre as moléculas de MEC de interesse para o presente estudo.

1.1.2 Colágenos: IV e VI

O colágeno IV é um componente ubíquo a todas as MBs. Em mamíferos, foram descritas 6 cadeias geneticamente distintas para o colágeno IV: $\alpha 1(\text{IV})$ a $\alpha 6(\text{IV})$. Cada cadeia tem ~ 180 kDa, apresentam um N-terminal 7S rico em cisteínas e lisinas, um

domínio colagenoso com ~ 20 interrupções, e um C-terminal globular NC1 (RICARD-BLUM, 2011; TIMPL, 1989). As cadeias α (IV) se associam em três heterotrímeros únicos: o trímero $\alpha1\alpha1\alpha2$ (IV) é o mais comum e amplamente distribuído pelos tecidos; os trímeros $\alpha3\alpha4\alpha5$ (IV) e $\alpha5\alpha5\alpha6$ (IV) são mais especializados e podem ser encontrados nos rins e em junções neuromusculares (GUNWAR; BALLESTER; NOELKEN; SADO *et al.*, 1998; MINER, 1999; SANES; ENGVALL; BUTKOWSKI; HUNTER, 1990). O heterotrímero $\alpha1\alpha1\alpha2$ (IV) é o primeiro a ser expresso durante o desenvolvimento embrionário, podendo ou não ser substituído posteriormente por $\alpha3\alpha4\alpha5$ (IV) ou $\alpha5\alpha5\alpha6$ (IV) para formar MBs com propriedades biomecânicas tecido-específicas (ABRAHAMSON; ST JOHN; STROGANOVA; ZELENCHUK *et al.*, 2013; MINER; SANES, 1994). Os heterotrímeros de colágeno IV se formam no interior retículo endoplasmático das células, e são secretados no meio extracelular onde se associam como dímeros via interação NC1-NC1, e como tetrâmeros via alinhamento lateral de seus domínios 7S. Estes oligômeros se unem covalentemente numa extensa malha proteica (Figura 1), que se conecta à receptores de superfície celular (integrinas) via complexos entactina-laminina, e ao estroma subjacente via fibrilas de ancoragem de colágeno VII (KHOSHNOODI; PEDCHENKO; HUDSON, 2008; MOUW; OU; WEAVER, 2014; TIMPL, 1989).

O colágeno IV regula diversos processos celulares tais como migração, adesão e diferenciação, e tem um papel fundamental para a estabilidade estrutural das MBs (KHOSHNOODI; PEDCHENKO; HUDSON, 2008). Mutações nos genes das cadeias α (IV) podem causar falhas na vascularização do cérebro e dos rins durante o desenvolvimento (FAVOR; GLOECKNER; JANI; KLEMP *et al.*, 2007; GATSEVA; SIN; BREZZO; VAN AGTMAEL, 2019), e doenças hereditárias importantes como a síndrome de Hanac decorrente da mutação no gene *Col4a1* (CHEN; MIGEON; VERPONT; ZAIDAN *et al.*, 2016), e a síndrome de Alport decorrente de mutações nos genes *Col4a3*, *Col4a4* e *Col4a5* (HARVEY; ZHENG; SADO; NAITO *et al.*, 1998; XIE; WU; REN; WANG *et al.*, 2014; ZHOU; BARKER; HOSTIKKA; GREGORY *et al.*, 1991), ambas com complicações vasculares, oftálmicas e renais decorrente de falhas na formação de MBs (CHEW; LENNON, 2018).

Figura 1 - Organização supramolecular do colágeno IV

A ilustração mostra como heterotrímeros $\alpha_3\alpha_4\alpha_5(\text{IV})$, encontrado na membrana basal glomerular, se organizam em redes supramoleculares. As cadeias α se associam em heterotrímeros no meio intracelular e são secretadas para o meio extracelular onde se associam como dímeros antiparalelos via interação covalente de seus domínios NC1, ou como tetrâmeros via alinhamento lateral (também por ligação covalente) de seus domínios 7S. Por meio de interações complexas e alinhamento lateral, esses blocos formam uma rede tridimensional de colágeno IV (painel inferior), à qual outras moléculas de MEC serão integradas para formar as membranas basais.

O colágeno VI é uma proteína ubíqua à MEC da maioria dos tecidos conjuntivos, e também encontrada no tecido muscular esquelético e cardíaco, rins, pele, gônadas e cartilagem, formando uma rede microfibrilar associada às MBs (FITZGERALD; HOLDEN; HANSEN, 2013; HESSLE; ENGVALL, 1984). Atualmente, são conhecidas 6 cadeias α distintas do colágeno VI: as cadeias $\alpha_1(\text{VI})$, $\alpha_2(\text{VI})$ e $\alpha_3(\text{VI})$ são as mais bem caracterizadas, e formam um heterotrímero considerado a unidade básica do colágeno VI, cuja distribuição é ubíqua no organismo; as cadeias $\alpha_4(\text{VI})$ a $\alpha_6(\text{VI})$ foram descobertas recentemente, apresentam distribuição mais restrita, podendo ser detectadas no sistema musculoesquelético, coração, pele, trato

gastrointestinal, gônadas, rins e pulmões em níveis variáveis de acordo com a idade, porém, muito pouco se sabe sobre sua função e organização na MEC (FITZGERALD; HOLDEN; HANSEN, 2013; GARA; GRUMATI; SQUARZONI; SABATELLI *et al.*, 2011; GARA; GRUMATI; URCIUOLO; BONALDO *et al.*, 2008). Todas as cadeias α (VI) possuem um domínio colagenoso longo (336 aminoácidos) e um resíduo único de cisteína importante para estabilidade em arranjos supramoleculares, porém, diferem entre si quanto seu comprimento total e ao número de domínios similares ao fator de von Willebrand A em seus terminais (FITZGERALD; HOLDEN; HANSEN, 2013).

Seu arranjo supramolecular é constituído por heterotrímeros $\alpha 1\alpha 2\alpha 3$ (VI) que formam dímeros antiparalelos dentro das células, os quais se associam como tetrâmeros e são secretados para o meio extracelular, onde irão interagir via seus N-terminais para formar uma rede microfibrilar semelhante a um cordão de contas subjacente à MB (Figura 2). Ainda não se sabe como as cadeias $\alpha 4$ (VI)- $\alpha 6$ (VI) interagem, mas sugere-se que essas novas cadeias possam substituir a cadeia $\alpha 3$ (VI) para formar heterotrímeros $\alpha 1\alpha 2\alpha 4$ (VI), $\alpha 1\alpha 2\alpha 5$ (VI) e $\alpha 1\alpha 2\alpha 6$ (VI) em alguns tecidos (FITZGERALD; HOLDEN; HANSEN, 2013; GARA; GRUMATI; SQUARZONI; SABATELLI *et al.*, 2011; GORDON; HAHN, 2010). O colágeno VI serve para manter a estrutura da matriz fibrilar intersticial, ancorar grandes estruturas como vasos, nervos e epitélio ao estroma adjacente. Adicionalmente, este colágeno tem um papel regulador de adesão célula-MEC e do ciclo celular. O colágeno VI também é importante para a integridade do tecido muscular e renal. Mutações nos genes *Col6a1*, *Col6a2* e *Col6a3* estão relacionadas com distrofias musculares congênitas associadas a falhas na produção e organização da rede microfibrilar de colágeno VI no tecido muscular (LAMPE; BUSHBY, 2005). Acúmulo de colágeno VI nos rins de pacientes diabéticos com glomeruloesclerose foi descrito por Nerlich e colaboradores (1994).

Figura 2 - Organização supramolecular do colágeno VI

A ilustração mostra que heterotrímeros $\alpha1\alpha2\alpha3(VI)$ se associam como dímeros antiparalelos no meio intracelular, os quais formam tetrâmeros que são secretados para o meio extracelular, onde formam, via interação amino-terminal, uma rede de microfibrilar de colágeno VI localizada logo abaixo das membranas basais. Fonte: Adaptado de (LAMPE; BUSHBY, 2005).

1.1.3 Glicoproteínas adesivas: Lamininas, fibronectina e emilinas

A laminina é uma proteína ubíqua de MB, tem alta massa molecular (400 a 900 kDa) sendo composta por três cadeias distintas (α , β e γ) que formam uma molécula cruciforme estável, montada dentro da célula e secretada no meio extracelular. As lamininas se ligam a outras moléculas de MEC, como entactina, perlecan e colágeno IV, formando pontes intermoleculares dentro das MBs e em alguns compartimentos mesenquimais, contribuindo para a estabilidade estrutural da MEC. As lamininas também podem se ligar a receptores de superfície celular (e.g., integrinas e

distroglicans) via domínios específicos nos terminais amino e carboxil da cadeia α , promovendo adesão celular, e modulando diversos processos celulares e morfogênicos (SULEIMAN; ZHANG; ROTH; HEUSER *et al.*, 2013; YAO, 2017). Peptídeos produzidos a partir da proteólise da laminina têm efeitos biológicos importantes em condições fisiológicas ou em doenças como câncer (FREITAS; JAEGER, 2002; FREITAS; VILAS-BOAS; PIMENTA; LOUREIRO *et al.*, 2007; SMUCZEK; SANTOS; SIQUEIRA; PINHEIRO *et al.*, 2017). Atualmente, já foram descritas 5 cadeias α , 4 cadeias β e 3 cadeias γ , arranjadas em 20 combinações em mamíferos. A nomenclatura atual das lamininas baseia-se na combinação dessas cadeias, por exemplo, as lamininas 111 e a 521 são formadas pela combinação das cadeias $\alpha1\beta1\gamma1$ e $\alpha5\beta2\gamma1$, respectivamente (AUMAILLEY; BRUCKNER-TUDERMAN; CARTER; DEUTZMANN *et al.*, 2005; TIMPL; BROWN, 1994; YAO, 2017).

A fibronectina (FN) é uma das principais glicoproteínas de MEC, ubíqua aos tecidos conjuntivos dos vertebrados, e codificada por um único gene que pode sofrer *splicing* para gerar diferentes isoformas desta proteína, sendo a isoforma plasmática e a celular as mais comuns. A FN possui múltiplos domínios que lhe conferem a capacidade de se ligar simultaneamente à receptores de superfície celular para regular adesão, migração e diferenciação celular; e à outras moléculas de MEC como colágenos, HSPGs e outras moléculas de FN, criando pontes moleculares que estabilizam as estruturas supramoleculares tridimensionais da MEC, sendo, portanto, considerada a proteína “organizadora” da MEC. A FN também se liga diversos fatores de crescimento e moléculas sinalizadoras para regular sua difusão no meio extracelular. A FN é primariamente sintetizada por fibroblastos como monômeros grandes (230 a 270 kDa) que se associam covalentemente como dímeros solúveis que são secretados no meio extracelular. A FN pode ser encontrada na MEC como dímeros solúveis, ou organizada como uma rede estável de fibrilas intersticiais insolúveis (principal forma funcional de FN) cuja formação depende de interação entre dímeros de FN e integrinas via o domínio RGD (R: arginina, G: glicina, D: aspartato) e consequente ativação celular. Durante o desenvolvimento embrionário, a síntese e deposição de FN é essencial para regular processos morfogênicos iniciais, como a gastrulação, que se baseiam em migração celular (HYNES; NABA, 2012; MOUW; OU; WEAVER, 2014; SCHWARZBAUER; DESIMONE, 2011).

As emilinas (proteínas de interface de microfibrilas de elastinas) pertencem a uma família de glicoproteínas que contém um domínio EMI altamente conservado composto por ~ 80 aminoácidos, que contém 7 cisteínas regularmente posicionadas. Junto com as multimerinas, as emilinas formam um grupo de proteínas triméricas caracterizadas por um domínio EMI no N-terminal, um longo domínio tripla-hélice, um domínio curto único à cada proteína, e uma região homóloga ao domínio gC1q no C-terminal com sítios de ligação para integrinas e moléculas de MEC. As funções biológicas das emilinas incluem formação de fibras elásticas, regulação da angiogênese, controle da pressão sanguínea arterial e regulação de adesão, migração, proliferação celular e apoptose (COLOMBATTI; SPESSOTTO; DOLIANA; MONGIAT *et al.*, 2011).

Nos mamíferos foram identificadas multimerina-1 e -2, e emilina-1, -2 e -3 (BRAGHETTA; FERRARI; DE GEMMIS; ZANETTI *et al.*, 2004). Emilina-3 é a única que não possui um domínio gC1q (SCHIAVINATO; BECKER; ZANETTI; CORALLO *et al.*, 2012). Essas proteínas são predominantemente encontradas na MEC, geralmente associadas às fibras elásticas na parede dos vasos sanguíneos e no tecido conjuntivo. As emilinas formam homotrímeros que se associam como agregados homotípicos de alta massa molecular (COLOMBATTI; SPESSOTTO; DOLIANA; MONGIAT *et al.*, 2011). Essas proteínas são expressas desde as fases iniciais do desenvolvimento (mórula e blastocisto), e detectadas ao longo do desenvolvimento em níveis estáveis no endotélio de vasos sanguíneos decíduais e do sistema cardiovascular fetal, com exceção da emilina-3. Logo após o nascimento, as emilinas podem ser detectadas na pele, rins, gônadas, alguns órgãos do trato gastrointestinal e ao tecido muscular, contudo, o nível de expressão reduz ao longo do envelhecimento (BRAGHETTA; FERRARI; DE GEMMIS; ZANETTI *et al.*, 2004). Emilina-1 e emilina-3 também atuam como inibidores extracelulares diretos do fator de crescimento transformante β (TGF- β , do inglês, *transforming growth factor β*) (SCHIAVINATO; BECKER; ZANETTI; CORALLO *et al.*, 2012; ZACCHIGNA; VECCHIONE; NOTTE; CORDENONSI *et al.*, 2006).

1.1.4 Perlecan e agrin

O perlecan é o principal HSPG encontrado nas MB e nos espaços pericelulares. Possui um core proteico de ~ 470 kDa, composto por 5 domínios

diferentes, associado lateralmente à três ou quatro cadeias de heparam sulfato e a numerosos oligossacarídeos O-ligados, que contribuem para uma massa final > 800 kDa, tornando o perlecam uma das maiores moléculas de MEC observadas em vertebrados e invertebrados. O perlecam também pode estar associado a outros GAGs, como dermatam sulfato ou condroitim sulfato (IOZZO, 2005). O perlecam é uma das primeiras moléculas de MB a ser sintetizada durante o desenvolvimento embrionário, tornando-se mais tarde ubiquamente expresso em todo o organismo. Contudo, o nível de expressão de perlecam é tecido-dependente, e seus principais produtores são os fibroblastos (IOZZO; COHEN; GRÄSSEL; MURDOCH, 1994). O perlecam se liga a uma gama de fatores secretados e controla a sua difusão no meio extracelular. Também se liga a colágeno IV, laminina e fibronectina por meio de suas cadeias de heparam sulfato, e contribui pro estabelecimento do perfil aniônico das MBs. Durante o desenvolvimento embrionário, o perlecam regula angiogênese, migração, proliferação e diferenciação celular (IOZZO, 2005; KANWAR; CARONE; KUMAR; WADA *et al.*, 1997; KANWAR; LIU; KUMAR; USMAN *et al.*, 1996; STEER; SHAH; BUSH; STUART *et al.*, 2004; WADA; KANWAR; MAKINO, 2002).

O agrim possui um core proteico de ~ 200 kDa associado a duas cadeias laterais de heparam sulfato ou condroitim sulfato. O agrim é expresso em MBs especializadas, como a MBG nos rins, a MB das junções neuromusculares, microvasculatura e nos pulmões. Em murinos, o agrim é expresso em duas isoformas distintas que variam quanto à localização sub-celular, distribuição tecidual e função. Ambas as isoformas partilham um core idêntico, composto por ~ 1.900 aa. A isoforma encontrada em MBs de tecidos nervoso e outros (renal e muscular) possui um N-terminal mais longo (150 aminoácidos); a isoforma transmembrana possui um N-terminal mais curto (49 aminoácidos) e é seletivamente expressa no tecido nervoso (BURGESS; SKARNES; SANES, 2000; RAATS; VAN DEN BORN; BAKKER; OPPERS-WALGREEN *et al.*, 2000; STEER; SHAH; BUSH; STUART *et al.*, 2004). O agrim pode se ligar à laminina para imobilizar as GAGs de heparam-sulfato dentro da MB, e contribui para o perfil aniônico das MBs. Também regula o transporte de moléculas através das MBs, tendo um papel importante para filtração e permeabilidade renal. Durante o desenvolvimento embrionário, regula proliferação e diferenciação celular via interação com receptores de superfície celular, tais como α -dystroglicam e integrina $\alpha3\beta1$. Estudos apontam o agrim como modulador de morfogênese por ramificação nos rins e nos pulmões (GROFFEN; VEERKAMP;

MONNENS; VAN DEN HEUVEL, 1999; RAATS; BAKKER; HOCH; TAMBOER *et al.*, 1998; SULEIMAN; ZHANG; ROTH; HEUSER *et al.*, 2013). Um fragmento de 22 kDa produzido a partir do C-terminal do agrim foi identificado no epitélio tubular renal humano (BENITO-MARTIN; UCERO; ZUBIRI; POSADA-AYALA *et al.*, 2013), e está relacionado à progressão de lesões glomerulares em indivíduos diabéticos (DARYADEL; HAUBITZ; FIGUEIREDO; STEUBL *et al.*, 2016; DEVETZIS; DARYADEL; ROUMELIOTIS; THEODORIDIS *et al.*, 2015).

1.1.5 Metaloproteinases de matriz e seus inibidores teciduais

As metaloproteinases de matriz (MMP), também conhecidas como matrixinas, são endopeptidases altamente homólogas, dependentes de zinco, solúveis ou transmembranas, implicadas na hidrólise de diversas proteínas de MEC para regular a abundância, composição, estrutura e remodelação da MEC em condições biológicas variadas (BONNANS; CHOU; WERB, 2014). As MMPs também hidrolisam outras proteínas associadas à MEC, e regulam a concentração de uma gama de peptídeos bioativos produzidos pela proteólise de proteínas de MEC que influenciam o comportamento celular (CUI; HU; KHALIL, 2017; SMUCZEK; SANTOS; SIQUEIRA; PINHEIRO *et al.*, 2017). A estrutura clássica das MMPs (forma inativa, recém-sintetizadas) inclui um peptídeo sinal, um propeptídeo com o domínio inibidor, um sítio catalítico associado a um íon zinco catalítico e outros íons estruturais, um peptídeo conector e um domínio hemopexina (Hpx) que determina a especificidade do substrato da MMP. O grupo sulfidril da cisteína no domínio inibidor do propeptídeo quelar o íon zinco no domínio catalítico e mantém as MMPs na forma inativa (proMMP). Nos vertebrados, já foram identificadas 28 MMPs, das quais 23 são encontradas em humanos (CUI; HU; KHALIL, 2017).

As MMPs são sintetizadas principalmente por fibroblastos, endotélio, células do sistema imunológico e uteroplacentárias, e em escala menor por outras células. Em condições fisiológicas normais, a atividade das MMPs é baixa, mas aumenta durante reparo e remodelação tecidual, ou em condições patológicas como câncer, fibrose e inflamação. Durante o desenvolvimento embrionário, as MMPs são expressas de forma temporal e espacialmente regulada em diversos órgãos, como rins, pulmões, TGI entre outros. As MMPs são importantes para crescimento por ramificação,

angiogênese e vasculogênese, dentre outros fenômenos morfogênicos (BONNANS; CHOU; WERB, 2014; TANNEY; FENG; POLLOCK; LOVETT, 1998). As MMPs são reguladas em diferentes níveis: expressão gênica, ativação proteolítica, interação com substratos específicos e com inibidores endógenos. Elas são secretadas no meio extracelular como zimogênios e ativadas a partir da remoção proteolítica do propeptídeo inibidor por outras proteases extracelulares com furinas, serino-proteases e outras MMPs (YAMAMOTO; MURPHY; TROEBERG, 2015).

As MMP-2 (63 kDa) e MMP-9 (86 kDa) e a MMP-14 transmembrana, também conhecida como MT1-MMP, são importantes para a remodelação de MBs. As MMP-2 e MMP-9 (gelatinases A e B, respectivamente) hidrolisam diversos colágenos fibrilares e de MB, glicoproteínas de MEC, PGs, gelatina, elastina e vários fatores de crescimento (e.g., TFG- β). A MMP-2 cliva a MMP-9 ativa. A MT1-MMP (56 kDa) hidrolisa moléculas depositadas ao redor das MBs, como colágenos fibrilares (I, II e III), gelatina, glicoproteínas de MEC, PGs, fatores de crescimento, e promove indiretamente a degradação de colágeno IV via ativação da MMP-2 (CUI; HU; KHALIL, 2017; ITOH, 2015).

A atividade das MMPs é diretamente regulada pela interação com seus inibidores teciduais, TIMPs (do inglês, *tissue inhibitors of metalloproteinases*), moléculas pequenas (21 a 29 kDa) que se ligam às MMPs e outras proteases de MEC, numa proporção estequiométrica 1:1, formando complexos que são fagocitados por macrófagos. São descritos 4 isoformas de TIMPs em vertebrados (TIMP-1 a TIMP-4), os quais possuem um N-terminal inibitório de MMPs, e um C-terminal que liga os TIMPs a seus substratos. Os TIMPs inibem a maioria das MMPs, com exceção do TIMP-1 que é menos eficiente em inibir as MMPs transmembranas. A proporção entre MMPs e TIMPs, em termos de concentração, num contexto tecido-dependente determina a extensão da degradação proteolítica e remodelação da MEC em condições fisiológicas e patológicas (ARPINO; BROCK; GILL, 2015; LU; TAKAI; WEAVER; WERB, 2011).

1.1.5.1 Mecanismo de ativação da MMP-2

A MT1-MMP e o TIMP-2 são importantes para a ativação da MMP-2. Monômeros de MT1-MMP ancorados à membrana plasmática das células formam dímeros por meio de interações covalentes entre seus domínios *Hpx* e TM. Uma das

MT1-MMP no homodímero liga-se ao N-terminal inibitório do TIMP-2, sendo inativada. O domínio hemopexina da proMMP-2 tem alta afinidade pelo C-terminal do TIMP-2, assim, a proMMP-2 acaba ligando-se a esse complexo ternário (MT1-MMP)₂-TIMP-2. A outra MT1-MMP ativa no homodímero cliva a proMMP-2 em seu propeptídeo disparando a ativação auto-catalítica desta enzima que é então liberada do complexo ternário como MMP-2 ativa. Deste modo, cria-se um gradiente local de MMP-2. Para que esse fenômeno aconteça, as concentrações de TIMP-2 e MT1-MMP devem estar balanceadas, caso contrário, o excesso de TIMP-2 satura os sítios de ligação à MT1-MMP e diminui a concentração local de MMP-2 ativa (ITOH, 2015).

1.2 Os rins

Os principais órgãos de excreção do sistema urinário são os rins, cujas principais funções incluem manter a homeostase hídrico-eletrolítica do organismo, e regular o volume e pH do fluido corpóreo por meio da filtração do sangue, reabsorção de água, sais e eletrólitos, e remoção e excreção de produtos do metabolismo pela urina. Os rins também secretam eritropoietina que estimula a produção de hemácias, renina que participa da regulação da pressão sanguínea, e ativam a 1,25-hidroxicalciferol que regula a reabsorção e retenção de cálcio no corpo. Os rins humanos filtram ~ 1,25 litros de sangue por minuto, e produzem 180 litros de filtrado glomerular num período de 24 h (125 ml/min), do qual 178,5 litros é reabsorvido pelos túbulos renais e apenas 1,5 litros é excretado na forma de urina (KIERSZENBAUM; TRES, 2012; REECE, 2014).

Os mamíferos possuem dois rins, localizados por trás do peritônio, aderidos à parede posterior da cavidade abdominal e dispostos em ambos os lados da coluna vertebral, logo abaixo do diafragma. Os rins têm uma coloração marrom-avermelhada, formato similar a um grão de feijão (formato reniforme), e possuem um hilo por onde penetram vasos sanguíneos e de onde se origina o ureter. São revestidos por uma cápsula renal fibrosa bem vascularizada. Os rins possuem um córtex que se divide em zona externa e junção corticomedular, e uma região medular. Em humanos, a medula renal é formada por massas cônicas ou pirâmides renais, cujas bases são voltadas para a junção corticomedular, e os ápices (ou papilas) são revestidos por uma área crivosa, perfurada, por onde a urina é excretada. As papilas renais desembocam no lúmen dos cálices menores, os quais convergem em cálices maiores

que se unem para formar a pelve renal, uma extensão afunilada da extremidade proximal do ureter que drena a urina dos rins (FAWCETT, 1986; LINDSTRÖM; MCMAHON; GUO; TRAN *et al.*, 2018; REECE, 2014). Cada pirâmide renal junto com a zona cortical adjacente forma um lobo renal. Os lobos são delimitados pelas colunas renais, que se formam a partir da fusão dos lobos renais durante o desenvolvimento dos rins. O rim humano possui de 5 a 11 lobos, enquanto roedores de laboratório (camundongos e ratos) possuem apenas 1 lobo (FAWCETT, 1986; LINDSTRÖM; MCMAHON; GUO; TRAN *et al.*, 2018; MCMAHON, 2016).

O sangue oxigenado é levado aos rins pela artéria renal que penetra pelo hilo renal e divide-se em numerosas artérias interlobares e interlobulares, a partir das quais surgem milhares de arteríolas eferentes que se unem à rede de capilares nos glomérulos renais, onde o sangue será filtrado, e conduzido para fora do glomérulo renal por uma arteríola eferente, formando assim, um sistema porta arterial. Na zona externa do córtex, as arteríolas eferentes formam uma rede de capilares fenestrados peritubulares que convergem em veia interlobulares; na junção corticomedular, as arteríolas eferentes dividem-se em veias mais delgadas paralelas às alças de Henle (*vasa recta*) que se estendem até a medula renal e retornam em direção à junção corticomedular, formando capilares fenestrados que estabelecem um sistema de trocas de íons, eletrólitos e água com os túbulos renais durante a formação da urina. O sangue é drenado do rim pelas veias interlobares que se conectam com a veia renal, a qual deixa o rim pelo hilo (FAWCETT, 1986; MCMAHON, 2016).

1.2.1 Os nefróns e os túbulos coletores

Os nefróns são as unidades multifuncionais dos rins, primariamente responsáveis pela filtração do sangue, reabsorção de eletrólitos e metabólitos presentes no filtrado glomerular, e pela produção, modificação e excreção de urina. Cada néfron é composto por um corpúsculo renal conectado a um longo túbulo renal segmentado, o qual se conecta por sua extremidade distal à rede de túbulos coletores (Figura 3). Os néfrons e túbulos coletores compõem o parênquima epitelial dos rins, o qual é sustentado por um delicado estroma bem vascularizado, e por membranas basais cuja composição molecular varia de acordo com cada segmento néfrico (MINER, 1999; REECE, 2014).

O número de néfrons ao nascimento é determinante para a função renal ao longo da vida (LUYCKX; BRENNER, 2005). Humanos adultos possuem, em média, cerca de 900 mil a 1 milhão de néfrons em cada rim (BERTRAM; DOUGLAS-DENTON; DIOUF; HUGHSON *et al.*, 2011), e camundongos adultos possuem aproximadamente 16 mil néfrons em cada rim (DAVIES; FOTHERINGHAM; FARAGHER, 1989), contudo, outros fatores como etnia, sexo e linhagens animais contribuem para uma variação entre indivíduos dentro de uma população. Déficit de néfrons ao nascimento é uma alteração permanente e decorre comumente de lesão glomerular, doenças renais associada a hipertensão ou diabetes, ou de alterações morfogênicas durante o desenvolvimento renal, estando associada a um declínio progressivo da função renal cedo na vida adulta (HOKKE; ARMITAGE; PUELLES; SHORT *et al.*, 2013; LINDSTRÖM; MCMAHON; GUO; TRAN *et al.*, 2018; LUYCKX; PERICO; SOMASCHINI; MANFELLOTTI *et al.*, 2017).

Os corpúsculos renais (Figura 4) são estruturas polarizadas, encontradas no córtex e ao longo da interface corticomedular dos rins. Cada corpúsculo é formado por um glomérulo revestido por uma cápsula de Bowman formada por um folheto parietal de células epiteliais pavimentosas e por um folheto visceral composto de células epiteliais especializadas chamadas podócitos. O filtrado produzido pelo glomérulo é depositado no espaço urinário entre a cápsula de Bowman e o glomérulo. O corpúsculo renal possui um polo vascular por onde as arteríolas aferente e eferente se conectam com o glomérulo, e um polo urinário onde a cápsula de Bowman torna-se contínua com a parede tubular (FAWCETT, 1986; OXBURGH, 2018).

Figura 3 - Representação ilustrativa da estrutura do néfron e do túbulo coletor, e da composição da MEC associada

Os quadros em cores diferentes mostram a possível composição das diferentes membranas basais e matriz intersticial associadas a essas estruturas em mamíferos (vermelho: corpúsculo renal; azul: túbulo renal; amarelo: túbulo coletor). As proteínas entre parênteses são observadas em apenas algumas espécies. MBG – membrana basal glomerular, CB – cápsula de Bowman, MES – matriz mesangial, TCP – túbulo contorcido proximal, TCD – túbulo contorcido distal, AH – alça de Henle, TC – túbulo coletor, $\alpha 1-6(\text{IV})$ – cadeias $\alpha 1-6$ do colágeno IV; Lam - laminina; E/N – entactina ou nidogem, P – perlecan, A – agrim. Fonte: Adaptado de (MINER, 1999).

Figura 4 - Representação ilustrativa da estrutura do corpúsculo renal maduro

Fonte: Adaptado de (KIERSENBAUM, TRES 2012).

O glomérulo renal (Figura 4) é um filtro altamente sofisticado, cuja função primária é produzir, a partir do plasma sanguíneo, um filtrado estéril, acelular e sem traços de proteína (ABRAHAMSON; WANG, 2003; WHITE, 2012). O diâmetro glomerular varia entre as espécies, sendo $\sim 200 \mu\text{m}$ em humanos (STEFFES; SCHMIDT; MCCRERY; BASGEN *et al.*, 2001; WHITE, 2012) e $\sim 65 \mu\text{m}$ em camundongos (DAVIES; FOTHERINGHAM; FARAGHER, 1989). O glomérulo é formado por células únicas, associadas a uma rede de capilares fenestrados, e por uma MEC que confere estabilidade estrutural e funcional ao glomérulo. Os capilares glomerulares são sustentados pelo mesângio, uma estrutura intersticial composta por células mesangiais e MEC mesangial. Na periferia do glomérulo são encontrados podócitos. Estas células têm uma arquitetura peculiar, caracterizada por processos

celulares longos e complexos que envolvem externamente os capilares glomerulares (ABRAHAMSON; WANG, 2003; RANGLES; COLLINSON; STARBORG; MIRONOV *et al.*, 2016).

O túbulo renal é formado por um túbulo contorcido proximal (TCP) e um túbulo contorcido distal (TCD), conectados pela alça de Henle (Figura 3). Esses túbulos regulam a osmolalidade urinária, o volume de fluido extracelular e a homeostase hidroeletrólítica. Os TCP e TCD são revestidos por um epitélio cúbico simples transportador de íons (FAWCETT, 1986; JUNQUEIRA; CARNEIRO; ABRAHAMSON, 2017). O TCP reabsorve cerca de dois terços da água, cloreto de sódio, fosfato, glicose e aminoácidos, dentre outros metabólitos presentes no fluido tubular, enquanto o TCD reabsorve em torno de 7 % do cloreto de sódio filtrado e participa da regulação endócrina da tonicidade e volume da urina (OLIVEIRA; UNWIN; WALSH, 2019; REECE, 2014). Em cortes histológicos, o TCD se distingue do TPC por ser revestido por um epitélio mais baixo, com células menos acidófilas e sem microvilosidades evidentes. A mácula densa é uma especialização da parede do TCD que está em contato com o corpúsculo renal, e faz parte do complexo justaglomerular, composto também por células musculares endócrinas da arteríola aferente, e pelo mesângio extraglomerular. O complexo justaglomerular está implicado na regulação da pressão sanguínea e manutenção da homeostase hídrico-eletrólítica (REECE, 2014; KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

A alça de Henle é um túbulo mais estreito, segmentados, revestido por um epitélio simples que varia de cúbico a pavimentoso, e cuja principal função é concentrar o filtrado tubular via reabsorção de água (no segmento descendente) e cloreto de sódio, potássio, cálcio e bicarbonato (no segmento ascendente), criando um gradiente hipertônico intersticial que determina a concentração do filtrado (JUNQUEIRA; CARNEIRO; ABRAHAMSON, 2017; KIERSZENBAUM; TRES 2012). Os túbulos coletores (Figura 3) se formam a partir do broto uretérico, uma estrutura epitelial que se origina do mesoderma intermediário. Os túbulos coletores formam uma rede de ductos que concentram e drenam a urina para a papila renal, onde a urina é excretada na pelve renal e conduzida pelo ureter até a bexiga. Os túbulos coletores são revestidos por um epitélio cúbico simples formado por numerosas células principais que reabsorvem cloreto de sódio, e células raras que regulam o pH da urina através de transportadores ácido-base (FAWCETT, 1986; MCMAHON, 2016).

1.2.2 A barreira de filtração glomerular

A estrutura da parede dos vasos glomerulares consiste em uma barreira de filtração glomerular (BFG; Figura 5) que retém moléculas presentes no sangue, evitando sua saída para o espaço urinário. A BFG é formada pelo endotélio glomerular, pela membrana basal glomerular (MBG) e por processos celulares dos podócitos (Figura 5). Qualquer dano estrutural a um destes três componentes resulta em defeitos de permeabilidade que levam à proteinúria (ABRAHAMSON; WANG, 2003). Para ser depositado no espaço urinário, o filtrado glomerular deve atravessar o endotélio glomerular, a MBG e uma camada de junções especializadas de filtração entre os processos celulares dos podócitos (ABRAHAMSON; WANG, 2003; RANGLES; COLLINSON; STARBORG; MIRONOV *et al.*, 2016).

Figura 5 - Ultraestrutura da barreira de filtração glomerular

A barreira de filtração glomerular (BFG) é composta pelo endotélio (E) dos capilares glomerulares (C), pela membrana basal glomerular (MBG) e por uma camada de pés terminais (cabeça de setas brancas) originados a partir de prolongamentos celulares dos podócitos (P). No fluxo normal, o filtrado glomerular é produzido a partir do plasma sanguíneo, atravessa as fenestras do endotélio glomerular (cabeça de seta escura), a MBG, e por fim, os diafragmas de filtração (setas escuras) entre os pés terminais dos podócitos, para ser por fim depositado no espaço urinário (U) e conduzido ao túbulo contorcido proximal. Fonte: Adaptado de (JUNQUEIRA; CARNEIRO; ABRAHAMSON, 2017).

As células endoteliais glomerulares são revestidas externamente por um glicocálice delicado e possuem fenestras abertas, por isso não constituem uma barreira de filtração efetiva, permitindo a passagem de moléculas diversas, inclusive proteínas plasmáticas. Deste modo, considera-se que as estruturas mais importantes da BFG são a MBG e os podócitos (ABRAHAMSON; WANG, 2003; RANGLES; COLLINSON; STARBORG; MIRONOV *et al.*, 2016).

A MBG serve como um filtro seletivo que retém moléculas com massa molecular > 70 kDa. A MBG constitui a principal barreira para passagem de albumina do sangue para o filtrado glomerular (ABRAHAMSON; WANG, 2003; SUH; MINER, 2013; TANNER, 2009), contudo, tem sido sugerido um certo nível de permeabilidade da BFG à albumina plasmática em condições fisiológicas normais (RUSSO; SANDOVAL; MCKEE; OSICKA *et al.*, 2007). A MBG é aproximadamente duas vezes mais espessa que as demais MBs encontradas no organismo (~ 350 nm em humanos adultos, ~ 175 nm em camundongos adultos), e é composta por uma rede de colágeno IV [predominantemente $\alpha3\alpha4\alpha5(\text{IV})$; $\alpha1\alpha1\alpha2(\text{IV})$ pode ser encontrado no lado subendotelial], laminina-521, entactina-1 e -2; e por HSPG, principalmente agrim, e perlecan em menor quantidade (ABRAHAMSON; ST JOHN; STROGANOVA; ZELENCHUK *et al.*, 2013; CHEW; LENNON, 2018; MINER, 1999; SATO; SASAKI; ADACHI; GHAZIZADEH, 2010).

Essas moléculas estão distribuídas de maneira altamente ordenada dentro MBG, criando uma rede proteica polarizada entre os podócitos e as células endoteliais. Sugere-se que a estrutura da MBG seja mantida graças à presença de uma rede central de monômeros $\alpha3\alpha4\alpha5(\text{IV})$ (ABRAHAMSON; HUDSON; STROGANOVA; BORZA *et al.*, 2009; SULEIMAN; ZHANG; ROTH; HEUSER *et al.*, 2013). Mutações em várias das proteínas da MBG estão relacionadas com defeitos estruturais da BFG e com doenças renais graves (CHEN; MINER, 2012; CHEW; LENNON, 2018; MINER; LI, 2000). Os HSPG conferem uma carga negativa à MBG, tornando-a uma barreira aniônica à difusão de proteína (MASON; WAHAB, 2003), porém, já foi demonstrado que a redução de heparam-sulfato na MBG não afeta a taxa de filtração glomerular ou induz microalbuminúria em indivíduos diabéticos (MAKINO; YAMASAKI; HARAMOTO; SHIKATA *et al.*, 1993; YARD; KAHLERT; ENGELLEITER; RESCH *et al.*, 2001).

É interessante notar que a composição molecular da MBG é similar à da matriz mesangial, mas nesta, os monômeros $\alpha1\alpha1\alpha2(IV)$ são mais abundantes que os $\alpha3\alpha4\alpha5(IV)$, e as moléculas de MEC não se organizam como MBs. Recentemente, estudo proteômicos da MEC glomerular mostraram que a sua composição é muito mais complexa do que se pensava. Lennon e colaboradores (2014) identificaram 144 proteínas de MEC em glomérulos humanos adultos, incluindo as proteínas de MBG já conhecidas, e outras novas proteínas estruturais e reguladoras que ainda não haviam sido identificadas nos glomérulos (e.g., TINAG e colágeno VI). Em camundongos adultos, Randles e colaboradores (2015) identificaram 115 proteínas de MEC, das quais 49 foram identificadas em humanos, incluindo 29 proteínas de MB. Esses estudos sugerem que existe um core de proteínas de MEC, conservado entre as espécies, que contribui para a arquitetura do glomérulo renal. Um outro estudo proteômico mostrou que, embora podócitos e células endoteliais cultivados separadamente sejam capazes de secretar proteínas de MB no meio extracelular, a organização destas como uma MB polarizada similar à MBG depende da coexistência e interação destas células no mesmo nicho.

Os podócitos são células epiteliais altamente especializadas, caracterizadas por possuírem longos processos celulares que se ramificam para formar pequenos pés terminais (PT) que aderem os podócitos à MBG, e se interdigitam com PTs de podócitos adjacentes numa camada que reveste a maior parte da superfície externa da MBG (Figura 7). As células mesangiais revestem a MBG nas regiões onde dois capilares vizinhos se unem na base do tufo glomerular, mas não fazem parte da MBG (RANDLES; COLLINSON; STARBORG; MIRONOV *et al.*, 2016). Os PTs dos podócitos são revestidos externamente por um glicocálice e estão unidos entre si por diafragmas de filtração (Figura 5) que contribuem para a permeabilidade seletiva glomerular e polarização dos podócitos. Estes diafragmas (~ 40 nm comprimento) são o único tipo de junção celular observada em podócitos maduros, e se organizam de modo a criar fendas que permitem a passagem de moléculas pequenas presentes no fluido glomerular (e.g., água, glicose e íons), mas retêm células e moléculas maiores (proteínas). Os diafragmas de filtração são formados por proteínas adesivas como nefrina, NEPH1, podocina, ZO-1, P-caderina, CD2AP e α -actinina. Mutações nos genes que expressam estas proteínas causam desarranjo molecular do diafragma de filtração e consequente proteinúria em doenças glomerulares (AKANKWASA;

JIANHUA; GUIXUE; CHANGJUAN *et al.*, 2018; KAWACHI; MIYAUCHI; SUZUKI; HAN *et al.*, 2006; KOOP; EIKMANS; BAELDE; KAWACHI *et al.*, 2003).

Perda da morfologia clássica dos PTs dos podócitos e do diafragma de filtração, e alterações na espessura da MBG (Figura 7) são alterações comumente observadas em diversas doenças renais, como síndrome de Alport, doença renal diabética (DRD), nefropatia membranosa idiopática, síndrome nefrótica, glomeruloesclerose segmentar e focal, dentre outras doenças glomerulares (CHEW; LENNON, 2018; KOLSET; REINHOLT; JENSSEN, 2012; RANGLES; COLLINSON; STARBORG; MIRONOV *et al.*, 2016).

Figura 6 - Organização 3D da camada de pés terminais dos podócitos e da membrana basal glomerular em camundongos selvagens e mutantes

Reconstrução tridimensional da camada de pés terminais dos podócitos e da membrana basal glomerular em camundongos adultos selvagens e em camundongos com deleção para o gene *Col4a3* (modelo de síndrome de Alport). Os painéis superiores mostram os pés terminais como prolongamentos longitudinais, de comprimento e largura comparáveis, coloridos em rosa e verde para indicar que são pés terminais de podócitos adjacentes que se alternam para revestir a superfície externa da MBG (azul). Os painéis inferiores mostram uma alteração dramática da morfologia e desarranjo dos pés terminais dos podócitos, em associação com o espessamento segmentar e irregular da MBG. Fonte: Adaptado de (RANGLES; COLLINSON; STARBORG; MIRONOV *et al.*, 2016).

1.2.3 Desenvolvimento dos rins

A diferenciação renal em mamíferos começa no E8 em camundongos, e por volta do 22º dia de gestação em humanos, com a formação de um par de ductos pronéfricos (DP) e especificação do mesoderma nefrogênico (MN), ambos originados do mesoderma intermediário. O mesoderma nefrogênico dá origem, sucessivamente, a dois pares de rins transientes (pronéfro e mesonéfro) e a um par de rins definitivos (metanéfro). Os DPs são estruturas epiteliais curtas, bilaterais, que se formam a partir de células mesenquimais do mesoderma intermediário que sofreram uma transição mesênquimo-epitelial (DAVIDSON, 2009; THAM; SMYTH, 2019).

Ao mesmo tempo que se formam os DPs, 3 a 4 clusters de células do MN se diferenciam em túbulos epiteliais pronéfricos transitórios e não funcionais em mamíferos, que se degeneram por volta do E9 em camundongos e na 5ª semana gestacional em humanos (DAVIDSON, 2009). Os DPs crescem no sentido caudal, ao longo do eixo ântero-posterior do embrião, e induz a diferenciação do mesoderma nefrogênico em mesênquima mesonéfrico e metanéfrico. O mesonéfro se forma a partir do E9 em camundongos, e entre a 3ª e 4ª semana gestacional em humanos. O mesonéfro desenvolve néfrons funcionais e se torna um órgão de excreção temporário durante a vida embrionária em humanos, porém, se degenera entre a 5ª e 12ª semana gestacional. Em camundongos, o mesonéfro forma apenas néfrons imaturos, e regride entre o E14,5 e E15,5. Nas fêmeas, o metanéfro regride completamente, e nos machos, os túbulos mesonéfricos remanescentes dão origem aos ductos epididimários (DAVIDSON, 2009; KUURE; VUOLTEENAHONEN; VAINIO, 2000).

A formação do metanéfro inicia-se no E10,5 em camundongos, e na 4ª semana gestacional em humanos. Assim como ocorre para o mesonéfro, a metanefrogênese depende de interações indutivas recíprocas entre o DP e o mesênquima metanéfrico (MMt). As células do MMt secretam o fator de crescimento derivado da glia (GDNF, do inglês, *Glial-derived growth factor*) que se liga a receptores tirosino-quinase Ret nas células do DP e estimula o crescimento de uma ramificação colateral chamada broto uretérico (BU). Em camundongos, o BU invade o MMt no E11,5, e em humanos entre a 6ª e 8ª semana de gestação, quando começa a se ramificar num padrão dicotômico. Esse processo é mediado, parcialmente, pela ação proteolítica de gelatinases. Enquanto isso, as células nas extremidades das ramificações do BU induzem as células do MMt adjacente a se diferenciar em mesênquima *cap*, uma

população de células mesenquimais progenitoras com capacidade de auto-renovação que darão origem aos nefróns. As células do mesênquima *cap* expressam diversos fatores de transcrição e proteínas de MEC essenciais para a nefrogênese (DAVIDSON, 2009; KANWAR; WADA; LIN; DANESH *et al.*, 2004; LINDSTRÖM; MCMAHON; GUO; TRAN *et al.*, 2018; MCMAHON, 2016; STEER; SHAH; BUSH; STUART *et al.*, 2004).

O BU passa por mais 11 ou 12 ciclos de ramificação, formando uma árvore uretérica que cresce em direção a periferia do MMt. Essa estrutura formará os ductos coletores, as papilas e pelve renal. Em camundongos, a ramificação do BU acontece até o 2º dia pós-natal, e em humanos até a 15ª semana de gestação. À medida que se ramifica, o BU induz a diferenciação do mesênquima *cap*, o qual induz o BU a crescer e ramificar-se, num mecanismo de *feedback* estimulatório. A formação e auto-renovação do mesênquima *cap* é essencial para a diferenciação metanéfrica, e falhas nas interações indutivas entre o DP e o MMt inibe completamente a formação dos rins (LINDSTRÖM; MCMAHON; GUO; TRAN *et al.*, 2018; MCMAHON, 2016; SHORT; COMBES; LEFEVRE; JU *et al.*, 2014).

1.2.3.1 Nefrogênese

A nefrogênese se inicia no E11,5 em camundongos, e na 6ª semana gestacional em humanos. As células do mesênquima *cap* se condensam para formar os agregados pré-tubulares (APT), nichos de células progenitoras nefrogênicas que se formam abaixo das extremidades das pontas do BU. Sob estimulação parácrina do BU, as células dos APTs se diferenciam nas vesículas renais (VR) que corresponde ao primeiro estágio da diferenciação glomerular. As VRs são estruturas polarizadas, formadas por células epiteliais unidas por junções adesivas. As primeiras VR são observadas no E12,5 em camundongos, e na 6ª semana gestacional em humanos. Cada VR se desenvolve para formar, sequencialmente, corpúsculos em formato de vírgula e corpúsculos em formato de S, dentro de um período de 24 a 36 h. Neste período, estas estruturas embrionárias se distribuem ao longo da região periférica do cortex metanéfrico chamada de zona nefrogênica (LINDSTRÖM; MCMAHON; GUO; TRAN *et al.*, 2018; MCMAHON, 2016; SHORT; COMBES; LEFEVRE; JU *et al.*, 2014).

Os corpúsculos em formato de S possuem um segmento distal conectado ao broto uretérico que formará o TCD; um segmento médio que formará o TCP e a alça

de Henle; e um segmento proximal que originará partes do corpúsculo renal. As células precursoras glomerulares estão localizadas numa fenda entre o segmento proximal e o segmento médio do corpúsculo em S. Essas células secretam o fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF, do inglês, *vascular endothelial growth factor*) e angiopoietina-1, dentre outros fatores angiogênicos, que estimulam a migração de hemangioblastos originados do estroma metanéfrico para formar o endotélio glomerular (BALLERMANN, 2005; TUFRO; NORWOOD; CAREY; GOMEZ, 1999)

À medida que os capilares glomerulares se formam (estágio de *loop* capilar), os podócitos se diferenciam a partir de células epiteliais colunares que revestem internamente a fenda glomerular. Nesse processo de diferenciação, as junções de oclusão e adesão são reestruturadas e substituídas por diafragmas de filtração, e formam-se também os prolongamentos celulares típicos dos podócitos. O mesângio se origina de células precursoras que migram do estroma metanéfrico para a fenda glomerular (ABRAHAMSON; WANG, 2003; MAJUMDAR; DRUMMOND, 1999; SCHELL; WANNER; HUBER, 2014). O folheto parietal da cápsula de Bowman se origina das células epiteliais da superfície externa do segmento proximal do corpúsculo em S, que se achatam progressivamente para envolver o glomérulo em maturação (MCMAHON, 2016).

Ambos o endotélio glomerular e os podócitos contribuem com suas próprias lâminas basais que se fusionam para formar a MBG. Essa fusão ocorre de maneira gradual, e segmentos não fusionados da MBG podem ser observados em estágios menos avançados de maturação glomerular, mas não em glomérulos maduros. Porém, os podócitos e as células endoteliais continuam incorporando proteínas de MEC à MBG fusionada durante a maturação glomerular, e *loops* subepiteliais de MBG podem ser observados ao longo da parede vascular do glomérulo (ABRAHAMSON, 1987; MINER, 2011). A formação e remodelação da MBG é essencial para a função glomerular. Glomérulos maduros são detectados no metanéfro a partir do E14.0 em camundongos, e da 8ª semana gestacional em humanos (LINDSTRÖM; MCMAHON; GUO; TRAN *et al.*, 2018; SHORT; COMBES; LEFEVRE; JU *et al.*, 2014), contudo, ainda não se sabe exatamente quando os néfrons se tornam funcionais. Em humanos, se observa filtração glomerular a partir da 9ª semana gestacional, e atividade tubular entre a 10ª e a 11ª semana (LINDSTRÖM; MCMAHON; GUO; TRAN *et al.*, 2018), período que coincide com a época em que os rins começam a contribuir para a

formação do líquido amniótico (BRACE; WOLF, 1989). Em camundongos, filtração glomerular começa a ser detectada a partir do E16,5, contudo, a função renal só se estabelece completamente semanas após o nascimento (MCMAHON, 2016).

Em humanos, a nefrogênese se consolida por volta da 36ª semana gestacional e o número final de néfrons é determinado antes do nascimento (MCMAHON, 2016). Em camundongos, a nefrogênese se estende até a primeira semana pós-natal, com aproximadamente metade dos néfrons se formando entre o nascimento e 4º dia pós-natal (DPN) (SHORT; COMBES; LEFEVRE; JU *et al.*, 2014). Dado o constante recrutamento para formação de novos néfrons durante o período intrauterino, os rins de fetos de camundongos no E19 (Figura 7) constituem mosaicos de néfrons em diferentes estágios de diferenciação e néfrons maduros já funcionais, e possibilitam investigar a dinâmica de diferenciação glomerular em condições normais e patológicas.

1.2.3.2 O estroma metanéfrico

As células do estroma metanéfrico (EM) tem um papel morfogênico essencial para o desenvolvimento renal. O EM se origina do tecido mesenquimal localizado ao redor do mesênquima *cap*, que se distinguem pela expressão marcadores como vimentina, α -SMA e N-caderina. Além de dar origem às células endoteliais glomerulares e às células mesangiais, as células do EM secretam moléculas sinalizadoras, como o ácido retinoico e FOXD1, que regulam a ramificação do BU, e a proliferação e capacidade de auto-renovação das células do mesênquima *cap*. Em camundongos, o EM se organiza em três camadas, distinguíveis a partir do E14.0, a saber: *i*) o EM capsular formado por uma camada de células mesenquimais alongadas distribuídas ao longo da periferia cortical; *ii*) o EM cortical localizado ao redor do mesênquima *cap* e das extremidades do BU; *iii*) e o EM medular (DAVIDSON, 2009).

Figura 7 - Organização histológica do rim de feto de camundongo Swiss no E19

BU: broto uretérico; CR: corpúsculo renal; CS: corpúsculo em S; EM: estroma metanéfrico; LC: estágio de *loop* capilar; MC: mesênquima *cap*; TC: túbulos contorcidos; VR: vesícula renal; ZN: zona nefrogênica. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Fonte: acervo do autor.

1.2.4 Remodelação da matriz extracelular durante o desenvolvimento renal

A MEC metanéfrica sofre uma intensa remodelação ao longo do desenvolvimento dos rins. A MEC mesenquimal metanéfrica é primariamente formada por colágeno I e III, fibronectina e HSPG. Com a especificação do MMt em mesênquima *cap*, as células mesenquimais passam a secretar colágeno IV [α 1(IV) e α 2(IV)] e V, laminina β 1, perlecan e entactina, que se organizam como uma MB à medida que se formam os agregados pré-tubulares (ABRAHAMSON; WANG, 2003; KLEIN; LANGEGER; TIMPL; EKBLOM, 1988; MINER, 1999).

As mudanças mais importantes ocorrem durante a formação da MBG. Nos corpúsculos em S, as células endoteliais e os podócitos imaturos secretam duas lâminas basais (LB) distintas formadas por heterotrímeros de colágeno IV do tipo

$\alpha1\alpha1\alpha2(IV)$. À medida que se formam os *loops* capilares, essas LBs se fundem para formar uma MBG primitiva e irregular. De maneira gradual, os trímeros $\alpha1\alpha1\alpha2(IV)$ são substituídos por $\alpha3\alpha4\alpha5(IV)$ até estes se tornarem os principais componentes da MBG madura (ABRAHAMSON; ST JOHN; STROGANOVA; ZELENCHUK *et al.*, 2013; DESJARDINS; BENDAYAN, 1991; MINER; SANES, 1994). Os trímeros $\alpha3\alpha4\alpha5(IV)$ são sintetizados exclusivamente pelos podócitos e são essenciais para as propriedades biomecânicas e permo-seletivas da MBG. As cadeias $\alpha1(IV)$ e $\alpha2(IV)$ continuam sendo sintetizados por células endoteliais e células mesangiais após a maturação glomerular, mas se tornam restritas ao mesângio em adultos (ABRAHAMSON; HUDSON; STROGANOVA; BORZA *et al.*, 2009; ABRAHAMSON; ST JOHN; STROGANOVA; ZELENCHUK *et al.*, 2013; MINER, 1999; SULEIMAN; ZHANG; ROTH; HEUSER *et al.*, 2013). Na síndrome de Alport, os podócitos falham em produzir trímeros $\alpha3\alpha4\alpha5(IV)$ devido a mutações nos genes *Col4a3/a4/a5*, e a substituição dos trímeros $\alpha1\alpha1\alpha2(IV)$ não acontece. Indivíduos com essa síndrome têm uma MBG mais fina e irregular, e desenvolvem proteinúria, hematúria e declínio progressivo da função renal (HARVEY; ZHENG; SADO; NAITO *et al.*, 1998; KALLURI; SHIELD; TODD; HUDSON *et al.*, 1997). Na cápsula de Bowman, a rede de colágeno IV é formada inicialmente por trímeros $\alpha1\alpha1\alpha2(IV)$, porém, nos corpúsculos maduros, são detectadas cadeias $\alpha1(IV)$ a $\alpha6(IV)$ (MINER, 1999).

A laminina 111 começa a ser expressa logo no início da glomerulogênese (Klein *et al.*, 1998), e é co-detectada com laminina 511 em estágios glomerulares mais avançados (formato de vírgula e formato em S). Laminina 111 é observada nas LB não fusionadas e laminina 511 é detectada no citoplasma das células endoteliais e dos podócitos imaturos. Após a formação da MBG, a laminina 111 é imediatamente substituída por laminina 511 até não ser mais detectada na MBG, tornando-se restrita apenas à matriz mesangial nos glomérulos maduros. A substituição da laminina 511 por 521 ocorre posteriormente com a maturação dos podócitos e da MBG (ABRAHAMSON; ST JOHN; STROGANOVA; ZELENCHUK *et al.*, 2013; MINER; PATTON; LENTZ; GILBERT *et al.*, 1997; ST JOHN; ABRAHAMSON, 2001). Diferente do que ocorre para o colágeno IV, ambos os podócitos e células endoteliais glomerulares sintetizam e secretam laminina 521 no glomérulo maduro. A substituição das moléculas de colágeno IV e laminina durante a formação da MBG determina a maturação dos podócitos e células endoteliais nos glomérulos (ABRAHAMSON;

HUDSON; STROGANOVA; BORZA *et al.*, 2009; JARAD; CUNNINGHAM; SHAW; MINER, 2006; MINER; LI, 2000; ZENKER; AIGNER; WENDLER; TRALAU *et al.*, 2004).

O perlecam é primeiro HSPG a ser detectado nas MBs nos rins embrionários, mas é gradualmente substituído por agrim na MBG. Nos rins maduros, perlecam é encontrado nas membranas basais tubulares (MBT) e na matriz mesangial (MINER, 1999; 2012). As cadeias $\alpha 1(IV)$ e $\alpha 2(IV)$ e a laminina 111 são ubíquas a todas as MBTs dos rins durante o desenvolvimento renal. Em camundongos, as cadeias $\alpha 3(IV)$ a $\alpha 6(IV)$ são detectadas nas MB dos TCP e TCD a partir do 7º DPN, mas nos humanos estas cadeias são detectadas apenas no TCD (MINER; SANES, 1994). O interstício metanéfrico é rico em fibronectina e em colágenos fibrilares, principalmente colágenos III e V. Com a expansão dos túbulos renais, o estroma metanéfrico se restringe a um delicado tecido reticular, bem vascularizado. Fibrose túbulo-intersticial é comumente observada em doenças renais, tais como a DRD, e está associada à transformação epitélio-mesenquimal das células tubulares (KOLSET; REINHOLT; JENSSEN, 2012; MASON; WAHAB, 2003).

1.2.5 Desenvolvimento renal e a produção de líquido amniótico

A produção de urina fetal pode ser avaliada por meio da análise do volume e da composição bioquímica do líquido amniótico (LA). O LA é inicialmente produzido pela mãe, porém, a partir do segundo terço da gestação, passa a ser produzido pelo feto, o qual contribui para sua formação principalmente a partir de secreções do trato urinário, e em menor escala por secreções liquidas do trato respiratório, transdérmica e das membranas fetais (UNDERWOOD; GILBERT; SHERMAN, 2005). Em camundongos, a partir do E16 a urina fetal torna-se a principal via de influxo para o LA (MCMAHON, 2016), portanto, alterações no volume e/ou composição deste geralmente podem estar relacionadas com má-formação e disfunção renal. O volume do LA, em camundongos, cresce progressivamente do E11 até o E16-E17, quando atinge um volume máximo de ~ 140 μ l. Nesse período, a osmolalidade do LA permanece estável, o que significa que água e solutos estão sendo transportados e reabsorvidos nas mesmas proporções (CHEUNG; BRACE, 2005). Contudo, após do E17 até o termo, o volume de LA cai rapidamente para ~ 17-20 μ l devido a reabsorção

de água, o que deixa o LA mais viscoso e concentrado. O volume de LA é regulado por um equilíbrio entre as vias de influxo (principalmente urinária) e efluxo (reabsorção vascular transdérmica e placentária, e deglutição fetal). Alterações nos mecanismos de regulação do volume do LA podem resultar oligodrâmnio (baixo volume de LA) ou polidrâmnio (aumento do volume de LA) (LEE; JUN; LEE; LEE *et al.*, 2010; NAEYE; BLANC, 1972).

Metabólitos como ureia, creatinina e ácido úrico presentes no LA representam a excreção de urina pelos fetos. Esses metabolitos não são reabsorvidos e acumulam-se no LA, permitindo avaliar a maturação e funcionalidade dos glomérulos e túbulos renais no período fetal. Em humanos, as concentrações de ureia e creatinina aumentam gradualmente ao longo da gestação, e parecem acompanhar os níveis plasmáticos desses no feto e na mãe (OLIVEIRA; BARROS; MAGALHÃES, 2002).. A análise da concentração de glicose no LA reflete a glicemia fetal/materna (DASHE; NATHAN; MCINTIRE; LEVENO, 2000; HOKKE; ARMITAGE; PUELLES; SHORT *et al.*, 2013) e a capacidade de reabsorção desta pelos túbulos renais (WEINSTEIN, 2014). Normalmente, o que se observa é um aumento inicial na concentração de glicose no LA, e redução a níveis muito baixos próximo ao parto (CHEUNG; BRACE, 2005; VELIKA; BIRKOVA; DUDIC; URDZIK *et al.*, 2018). Proteínas presentes no LA são todas de origem fetal, e incluem principalmente albumina, α -fetoproteínas e transferrinas. Mudanças na concentração de proteínas no LA acompanham as do plasma fetal (RENFREE; HENSLEIGH; MCLAREN, 1975).

1.3 O diabetes *mellitus*

Atualmente, o diabetes *mellitus* (DM) é um dos principais problemas de saúde pública e economia no mundo. Dados publicados pela Federação Internacional de Diabetes (IDF, do inglês, *International Diabetes Federation*; 2017) mostraram que 8,8 % da população mundial (entre 20-79 anos de idade) tem DM, e que esta doença corresponde a 10,7 % de todas as causas de morte no mundo. Os gastos em saúde referentes ao DM contabilizam aproximadamente 727 bilhões de dólares americanos. Com base na dinâmica do aumento da prevalência desta doença nas últimas décadas, a expectativa é que o número de pessoas diabéticas cresça em 35 % até 2040, acompanhado de um preocupante aumento nos custos em tratamento.

O DM é uma doença crônica que compreende um conjunto de distúrbios endócrino-metabólicos, caracterizada por elevados níveis de glicose na corrente sanguínea (hiperglicemia) devido à produção insuficiente de insulina ou a falhas nas suas vias de sinalização. A insulina é um hormônio peptídico pequeno (51 aminoácidos; 5,8 kDa) produzido pelas células β das ilhotas de Langerhans no pâncreas. Em resposta a um aumento nos níveis circulantes de glicose, a insulina é secretada na corrente sanguínea para mobilizar glicose para o meio intracelular via transportadores de glicose onde será convertida em energia. Distúrbios na sinalização da insulina levam à hiperglicemia, a qual é considerada a principal complicação do DM e está relacionada com o desenvolvimento de retinopatias, nefropatias, vasculopatias e neuropatias associadas ao DM (DANEMAN, 2006; IDF, 2017; WEISS; SCHOLZ; HAAS; TAMUSSINO *et al.*, 2000).

De acordo com sua etiologia, o DM é classificado em: i) DM tipo 1 (DM1), uma doença genética autoimune complexa, de incidência variável (5-10 % dos casos de DM), que envolve mutações em múltiplos genes e influência de fatores ambientais, causada por inflamação das ilhotas pancreáticas e destruição imunomediada das células β pancreáticas, e caracterizada por redução drástica ou absoluta da produção de insulina, e consequente hiperglicemia. ii) DM tipo 2 (DM2), tipo mais comum de DM (90% dos casos), caracterizado por resistência à insulina e intolerância à glicose, estando diretamente relacionado com obesidade e sedentarismo em crianças e adultos, e com fatores étnicos; iii) DM gestacional e hiperglicemia durante a gravidez, as quais se apresentam como hiperglicemia moderada ou severa, respectivamente, devido à resistência à insulina que se desenvolve entre o 2º e 3º trimestre gestacional. Outros tipos de DM incluem o diabetes monogênico decorrente de uma mutação única num gene autossomal dominante, e diabetes secundário à outras doenças, como síndrome de Cushing e pancreatite, ou à terapia com corticosteroides (ATKINSON; EISENBARTH, 2001; DANEMAN, 2006; IDF, 2017).

Nos últimos anos, uma grande atenção tem sido dada à relação entre hiperglicemia materna e complicações durante e após a gestação. De acordo com a IDF, a proporção de nascidos vivos afetados por hiperglicemia durante a gestação foi de 16,2 % do número total de nascidos no mundo em 2017 (no Brasil, a proporção foi de 27 %), dos quais 85 % eram gestações complicadas por DMG e 0,2 % por DM1 (IDF, 2017). Gestações hiperglicêmicas sem controle insulinêmico estão diretamente relacionadas a alta taxa de morbidade e mortalidade materno-fetal, partos prematuros,

alterações de crescimento intrauterino e malformações congênitas, e a alterações epigenéticas e congênitas durante o desenvolvimento embrionário. Estas complicações afetam a formação de órgãos vitais, como os rins, e predisõem a prole a doenças cardiovasculares e metabólicas ao longo da vida adulta (BROPHY, 2017; CORRÊA; PUCCI; ROCHA; PEREIRA JÚNIOR *et al.*, 2015; TRAN; CHEN; CHENIER; CHAN *et al.*, 2008; WEISS; SCHOLZ; HAAS; TAMUSSINO *et al.*, 2000).

Considerando a importância do DM no campo da ciência reprodutiva, nosso grupo desenvolveu um modelo experimental de gestação complicada por DM1 sem tratamento insulínico em camundongos para investigar os efeitos do DM sobre a gestação e desenvolvimento embrionário. Nossos estudos mostraram uma relação direta entre a progressão do DM1 com o desenvolvimento de complicações reprodutivas importantes como queda na taxa de acasalamento, interrupção do ciclo estral (FAVARO; SALGADO; RASPANTINI; FORTES *et al.*, 2010), aumento da taxa de perdas embrionárias e restrição do crescimento fetal intrauterino (SANCHES; FAVARO; BARRENCE; BEVILACQUA *et al.*, 2017). Também verificamos alterações importantes da MEC tais como acúmulo de colágeno I e V no endométrio durante a decidualização (FAVARO; SALGADO; COVARRUBIAS; BRUNI *et al.*, 2013), e acúmulo de colágenos fibrilares e redução dos níveis de MMP-2 ativa na placenta de camundongos diabéticos (SANCHES; FAVARO; BARRENCE; BEVILACQUA *et al.*, 2017).

1.3.1 Os efeitos do DM sobre a MEC

A MEC é um componente tecidual dinâmico, cuja taxa de renovação depende do equilíbrio entre biossíntese e degradação de seus componentes (revisto por Kolset *et al.*, 2012). Acúmulo de MEC é uma alteração tecidual clássica no DM, que se desenvolve por um mecanismo complexo e multifatorial que envolve inflamação, ativação de fibroblastos e miofibroblastos, transição epitélio-mesenquimal, fibrose e desregulação proteolítica da MEC (TAN; LIU, 2012; XIANG; XUE; WU; ZHENG *et al.*, 2019). Estudo que investiguem os mecanismos fisiopatológicos do acúmulo de MEC nas lesões renais diabéticas são essenciais para entender melhor as complicações do DM e para descobrir novos marcadores para diagnóstico e prognóstico da ND.

Os níveis elevados de glicose afetam vias de sinalização específicas, como a via do TFG- β e a das pequenas GTPases da família Rho, que regulam a expressão

de várias proteínas da MEC (HU; SUN; XIAO; HAN *et al.*, 2015; MASON; WAHAB, 2003). A perturbação nessas vias leva a uma deposição excessiva de MEC nos tecidos, fibrose, e espessamento de membranas basais, e causa uma série de complicações relacionadas ao DM (KRIZ; LÖWEN; FEDERICO; VAN DEN BORN *et al.*, 2017; MAKINO; YAMASAKI; HARAMOTO; SHIKATA *et al.*, 1993; NERLICH; SCHLEICHER, 1991). O acúmulo de proteínas de MEC no DM também está relacionado com alterações na expressão processamento pós-traducional e *turnover* destas. A hiperglicemia causa a formação de compostos que alteram a estrutura e a funcionalidade das proteínas de MEC, como por exemplo os produtos finais de glicação avançada (AGEs, do inglês: *advanced glycated end-product*). Os AGEs geralmente se formam pela ligação de um açúcar redutor à cadeia lateral de lisinas e argininas (ARMBRUSTER, 1987; LI; ZHONG; GONG; GAO *et al.*, 2018; MASON; WAHAB, 2003). As proteínas de MEC são altamente susceptíveis à formação de AGEs em seus sítios múltiplos, alguns deles determinantes para sua função e conformação espacial (CHETYRKIN; MATHIS; PEDCHENKO; SANCHEZ *et al.*, 2011; PASTINO; GRECO; MATHIAS; CRISTEA *et al.*, 2017; VOZIYAN; BROWN; CHETYRKIN; HUDSON, 2014). Proteínas de MEC hiperglicadas são mais rígidas e resistentes à proteólise, e acumulam-se de forma aberrante nas MBs e no interstício dos tecidos (ANDERSON; TSILIBARY; CHARONIS, 1993; VOZIYAN; BROWN; CHETYRKIN; HUDSON, 2014)

Estudos relacionam o desenvolvimento de lesões renais (e.g., fibrose e glomeruloesclerose) e proteinúria em pacientes com DRD com redução da expressão e da atividade proteolítica de MMPs e superexpressão de TIMPs nos rins (BOUCHER; MAYER; LONDONO; BENDAYAN, 2006; KROCHMAL; KONTOSTATHI; MAGALHÃES; MAKRIDAKIS *et al.*, 2017; XU; XIAO; XIAO; YANG *et al.*, 2014). Anderson e colaboradores (1996) verificaram uma redução na expressão e ativação de MMP-2, e super-expressão de TIMP-2 em células mesangiais cultivadas em meio com alta concentração de glicose ou na presença de proteínas hiperglicadas. Outros estudos mostram expressão aberrante de proteases, e uma correlação direta entre o grau de proteinúria e os níveis séricos e urinários de MMPs e outras proteases, em pacientes com ND (KROCHMAL; KONTOSTATHI; MAGALHÃES; MAKRIDAKIS *et al.*, 2017; TAN; LIU, 2012). Esses estudos mostram que o envolvimento de MMPs e outras proteases, e seus inibidores teciduais na fisiopatologia do acúmulo de MEC no DM ainda é muito controverso e precisa ser investigado mais a fundo.

1.3.2 Os efeitos do DM sobre o desenvolvimento renal: o que se sabe quanto à MEC?

A exposição continuada à hiperglicemia afeta o desenvolvimento dos rins e reprograma a prole para o desenvolvimento de doenças renais e cardiovasculares na vida adulta (AMRI; FREUND; VILAR; MERLET-BÉNICHOU *et al.*, 1999; MARCO; MCCLOSKEY; VUILLERMIN; BURGNER *et al.*, 2012). Reprogramação fetal é um fenômeno que acontece quando um estímulo intrauterino nocivo que ocorre durante períodos críticos do desenvolvimento (organogênese, perinatal ou pós-natal) induz alterações permanentes que comprometem a função de órgãos/sistemas regulatórios e aumentam a susceptibilidade do indivíduo a disfunções ou doenças ao longo de sua vida. Brenner e colaboradores (1988) mostraram que indivíduos nascidos com um número baixo de néfrons desenvolvem alterações glomerulares adaptativas (e.g., hipertrofia glomerular) para manter a taxa de filtração glomerular normal, e quando adultos, se tornam mais susceptíveis a desenvolver hipertensão sistêmica e doença renal crônica frente a injúria renal do que indivíduos normais.

Estudos mostram que o mecanismo de reprogramação do desenvolvimento dos rins em gestações diabéticas é bastante complexo, e multifatorial (BOUBRED; DANIEL; BUFFAT; TSIMARATOS *et al.*, 2016; LUYCKX; SHUKHA; BRENNER, 2011; TRAN; CHEN; CHENIER; CHAN *et al.*, 2008). No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos da hiperglicemia materna sobre a biologia da MEC metanéfrica durante a gestação. Bernstein e colaboradores (1987) mostraram que podócitos expostos à altas concentrações de glicose depositam uma quantidade maior de moléculas de MB e matriz fibrilar. Cagliero e colaboradores (1993) encontraram níveis elevados de RNAm para fibronectina nos rins de fetos de ratos subdesenvolvidos. Abrass e colaboradores (1997) observaram uma redução na expressão de laminina $\beta 2$ em enxertos metanéfricos transplantados nos olhos de ratos diabéticos, associada com falhas na diferenciação glomerular e expansão mesangial. Estudos *in vitro* mostraram que altas concentrações de aldohexoses (D-glicose ou D-manose) alteram a expressão, síntese, deposição e estrutura de HSPGs, em especial do perlecan, e dismorfogênese glomerular em explantes metanéfricos de camundongos (KANWAR; CARONE; KUMAR; WADA *et al.*, 1997; KANWAR; LIU; KUMAR; USMAN *et al.*, 1996; LIU; CARONE; DALECKI; LELONGT *et al.*, 1992).

Sabe-se, contudo, que a MEC exerce um papel essencial ao longo da diferenciação metanéfrica, particularmente durante a nefrogênese. Alterações no

padrão de síntese e deposição de moléculas de MEC durante a diferenciação metanéfrica em condições hiperglicêmicas podem estar associadas com o desenvolvimento de alterações morfogênicas renais, ou ser consequência destas, mas isso ainda não está bem esclarecido. Neste contexto, estudos são necessários para melhor entender como alterações na MEC promovidas pela hiperglicemia materna podem contribuir para a reprogramação do desenvolvimento dos rins e, consequentemente, da função renal.

6 CONCLUSÕES

Respaldados pelos resultados obtidos neste estudo, concluímos que:

- 1) O diabetes *mellitus* materno restringe o crescimento fetal e o desenvolvimento renal de forma assimétrica;
- 2) A ocorrência de polidrâmnio no grupo diabético está associada a poliúria e glicosúria fetal;
- 3) O diabetes *mellitus* materno restringe a formação de nefróns no período intrauterino e reduz o aporte de nefróns indiferenciados no E19 para o período pós-natal;
- 4) O diabetes *mellitus* materno promove um aumento do volume dos corpúsculos renais maduros, associado a uma restrição da área mesangial, dilatação dos capilares glomerulares e dos túbulos contorcidos nos rins de fetos subdesenvolvidos;
- 5) O diabetes *mellitus* materno causa um desarranjo da barreira de filtração glomerular nos fetos de mães diabéticas, caracterizado por espessamento focal da membrana basal glomerular, e aumento de tamanho e perda da morfológica clássica dos pés terminais dos podócitos;
- 6) O matrisoma metanéfrico de camundongos no E19 é altamente complexo em termos de composição, e sugere um grau de conservação molecular da MBG entre humanos e camundongos desde o período fetal ao adulto;
- 7) O diabetes *mellitus* materno promove um acúmulo significativo de colágeno IV, particularmente de COL4A1, e de COL6A6, emilina-3 e TIMP-2 nos rins de fetos subdesenvolvidos;
- 8) O diabetes *mellitus* materno altera discretamente a distribuição de laminina e perlecan nos glomérulos renais maduros de fetos subdesenvolvidos, e induz um acúmulo de agrin na superfície apical das células epiteliais dos túbulos contorcidos;
- 9) O diabetes *mellitus* materno reduz a ativação de MMP-2 e MT1-MMP nos rins de fetos subdesenvolvidos.

REFERÊNCIAS¹

- ABDALLAH, M.; MARTIN, M.; EL TAHCHI, M.; BALME, S. *et al.* Influence of Hydrolyzed Polyacrylamide Hydrogel Stiffness on Podocyte Morphology, Phenotype and Mechanical Properties. **ACS Appl Mater Interfaces**, Aug 2019.
- ABRAHAMSON, D. R. Structure and development of the glomerular capillary wall and basement membrane. **Am J Physiol**, 253, n. 5 Pt 2, p. F783-794, Nov 1987.
- ABRAHAMSON, D. R.; HUDSON, B. G.; STROGANOVA, L.; BORZA, D. B. *et al.* Cellular origins of type IV collagen networks in developing glomeruli. **J Am Soc Nephrol**, 20, n. 7, p. 1471-1479, Jul 2009.
- ABRAHAMSON, D. R.; ST JOHN, P. L.; STROGANOVA, L.; ZELENCHUK, A. *et al.* Laminin and type IV collagen isoform substitutions occur in temporally and spatially distinct patterns in developing kidney glomerular basement membranes. **J Histochem Cytochem**, 61, n. 10, p. 706-718, Oct 2013.
- ABRAHAMSON, D. R.; WANG, R. Development of the glomerular capillary and its basement membrane. *In*: VIZE, P.; WOOLF, A. S., *et al* (Ed.). **The Kidney**: Elsevier, 2003. p. 221-249.
- ABRASS, C. K.; SPICER, D.; BERFIELD, A. K.; ST JOHN, P. L. *et al.* Diabetes induces changes in glomerular development and laminin-beta 2 (s-laminin) expression. **Am J Pathol**, 151, n. 4, p. 1131-1140, Oct 1997.
- AERTS, L.; HOLEMANS, K.; VAN ASSCHE, F. A. Maternal diabetes during pregnancy: consequences for the offspring. **Diabetes Metab Rev**, 6, n. 3, p. 147-167, Dec 1990.
- AKANKWASA, G.; JIANHUA, L.; GUIXUE, C.; CHANGJUAN, A. *et al.* Urine markers of podocyte dysfunction: a review of podocalyxin and nephrin in selected glomerular diseases. **Biomark Med**, 12, n. 8, p. 927-935, 08 2018.
- ALIOU, Y.; LIAO, M. C.; ZHAO, X. P.; CHANG, S. Y. *et al.* Post-weaning high-fat diet accelerates kidney injury, but not hypertension programmed by maternal diabetes. **Pediatr Res**, 79, n. 3, p. 416-424, Mar 2016.
- AMRI, K.; FREUND, N.; VILAR, J.; MERLET-BÉNICHOU, C. *et al.* Adverse effects of hyperglycemia on kidney development in rats: in vivo and in vitro studies. **Diabetes**, 48, n. 11, p. 2240-2245, Nov 1999.
- ANDERSON, S. S.; TSILIBARY, E. C.; CHARONIS, A. S. Nonenzymatic glycosylation-induced modifications of intact bovine kidney tubular basement membrane. **J Clin Invest**, 92, n. 6, p. 3045-3052, Dec 1993.

¹De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14724**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2011.

ANDERSON, S. S.; WU, K.; NAGASE, H.; STETTLER-STEVENSON, W. G. *et al.* Effect of matrix glycation on expression of type IV collagen, MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 by human mesangial cells. **Cell Adhes Commun**, 4, n. 2, p. 89-101, Aug 1996.

ARMBRUSTER, D. A. Fructosamine: structure, analysis, and clinical usefulness. **Clin Chem**, 33, n. 12, p. 2153-2163, Dec 1987.

ARPINO, V.; BROCK, M.; GILL, S. E. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. **Matrix Biol**, 44-46, p. 247-254, 2015 May-Jul 2015.

ASSENOV, Y.; RAMÍREZ, F.; SCHELHORN, S. E.; LENGAUER, T. *et al.* Computing topological parameters of biological networks. **Bioinformatics**, 24, n. 2, p. 282-284, Jan 2008.

ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. **Lancet**, 358, n. 9277, p. 221-229, Jul 2001.

AUMAILLEY, M.; BRUCKNER-TUDERMAN, L.; CARTER, W. G.; DEUTZMANN, R. *et al.* A simplified laminin nomenclature. **Matrix Biol**, 24, n. 5, p. 326-332, Aug 2005.

BALLERMANN, B. J. Glomerular endothelial cell differentiation. **Kidney Int**, 67, n. 5, p. 1668-1671, May 2005.

BENITO-MARTIN, A.; UCERO, A. C.; ZUBIRI, I.; POSADA-AYALA, M. *et al.* Osteoprotegerin in exosome-like vesicles from human cultured tubular cells and urine. **PLoS One**, 8, n. 8, p. e72387, 2013.

BERMAN, S.; ABU HAMAD, R.; EFRATI, S. Mesangial cells are responsible for orchestrating the renal podocytes injury in the context of malignant hypertension. **Nephrology (Carlton)**, 18, n. 4, p. 292-298, Apr 2013.

BERNSTEIN, J.; CHENG, F.; ROSZKA, J. Increased glucose increases glomerular basement membrane in metanephric culture. **Pediatr Nephrol**, 1, n. 1, p. 3-8, Jan 1987.

BERTRAM, J. F. Analyzing renal glomeruli with the new stereology. **Int Rev Cytol**, 161, p. 111-172, 1995.

BERTRAM, J. F.; DOUGLAS-DENTON, R. N.; DIOUF, B.; HUGHSON, M. D. *et al.* Human nephron number: implications for health and disease. **Pediatr Nephrol**, 26, n. 9, p. 1529-1533, Sep 2011.

BONNANS, C.; CHOU, J.; WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 15, n. 12, p. 786-801, Dec 2014.

BOUBRED, F.; DANIEL, L.; BUFFAT, C.; TSIMARATOS, M. *et al.* The magnitude of nephron number reduction mediates intrauterine growth-restriction-induced long term chronic renal disease in the rat. A comparative study in two experimental models. **J Transl Med**, 14, n. 1, p. 331, 11 2016.

BOUCHER, E.; MAYER, G.; LONDONO, I.; BENDAYAN, M. Expression and localization of MT1-MMP and furin in the glomerular wall of short- and long-term diabetic rats. **Kidney Int**, 69, n. 9, p. 1570-1577, May 2006.

BRACE, R. A.; WOLF, E. J. Normal amniotic fluid volume changes throughout pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, 161, n. 2, p. 382-388, Aug 1989.

BRAGHETTA, P.; FERRARI, A.; DE GEMMIS, P.; ZANETTI, M. *et al.* Overlapping, complementary and site-specific expression pattern of genes of the EMILIN/Multimerin family. **Matrix Biol**, 22, n. 7, p. 549-556, Jan 2004.

BRENNER, B. M.; GARCIA, D. L.; ANDERSON, S. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? **Am J Hypertens**, 1, n. 4 Pt 1, p. 335-347, Oct 1988.

BREW, K.; NAGASE, H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. **Biochim Biophys Acta**, 1803, n. 1, p. 55-71, Jan 2010.

BROPHY, P. Maternal determinants of renal mass and function in the fetus and neonate. **Semin Fetal Neonatal Med**, 22, n. 2, p. 67-70, 04 2017.

BRUNSKILL, E. W.; ARONOW, B. J.; GEORGAS, K.; RUMBALLE, B. *et al.* Atlas of Gene Expression in the Developing Kidney at Microanatomic Resolution. **Dev Cell**, 15, n. 5, p. 781-791, Nov 2008.

BURGESS, R. W.; SKARNES, W. C.; SANES, J. R. Agrin isoforms with distinct amino termini: differential expression, localization, and function. **J Cell Biol**, 151, n. 1, p. 41-52, Oct 2000.

CAGLIERO, E.; FORSBERG, H.; SALA, R.; LORENZI, M. *et al.* Maternal diabetes induces increased expression of extracellular matrix components in rat embryos. **Diabetes**, 42, n. 7, p. 975-980, Jul 1993.

CHAUTARD, E.; BALLUT, L.; THIERRY-MIEG, N.; RICARD-BLUM, S. MatrixDB, a database focused on extracellular protein-protein and protein-carbohydrate interactions. **Bioinformatics**, 25, n. 5, p. 690-691, Mar 2009.

CHEN, F.; WEI, G.; XU, J.; MA, X. *et al.* Naringin ameliorates the high glucose-induced rat mesangial cell inflammatory reaction by modulating the NLRP3 Inflammasome. **BMC Complement Altern Med**, 18, n. 1, p. 192, Jun 2018.

CHEN, Y. M.; MINER, J. H. Glomerular basement membrane and related glomerular disease. **Transl Res**, 160, n. 4, p. 291-297, Oct 2012.

CHEN, Y. W.; CHENIER, I.; CHANG, S. Y.; TRAN, S. *et al.* High glucose promotes nascent nephron apoptosis via NF-kappaB and p53 pathways. **Am J Physiol Renal Physiol**, 300, n. 1, p. F147-156, Jan 2011.

CHEN, Z.; MIGEON, T.; VERPONT, M. C.; ZAIDAN, M. *et al.* HANAC Syndrome Col4a1 Mutation Causes Neonate Glomerular Hyperpermeability and Adult

Glomerulocystic Kidney Disease. **J Am Soc Nephrol**, 27, n. 4, p. 1042-1054, Apr 2016.

CHETYRKIN, S.; MATHIS, M.; PEDCHENKO, V.; SANCHEZ, O. A. *et al.* Glucose autoxidation induces functional damage to proteins via modification of critical arginine residues. **Biochemistry**, 50, n. 27, p. 6102-6112, Jul 12 2011.

CHEUNG, C. Y.; BRACE, R. A. Amniotic fluid volume and composition in mouse pregnancy. **J Soc Gynecol Investig**, 12, n. 8, p. 558-562, Dec 2005.

CHEW, C.; LENNON, R. Basement Membrane Defects in Genetic Kidney Diseases. **Front Pediatr**, 6, p. 11, 2018.

COHEN, E.; BAERTS, W.; VAN BEL, F. Brain-Sparing in Intrauterine Growth Restriction: Considerations for the Neonatologist. **Neonatology**, 108, n. 4, p. 269-276, 2015.

COLOMBATTI, A.; SPESSOTTO, P.; DOLIANA, R.; MONGIAT, M. *et al.* The EMILIN/Multimerin family. **Front Immunol**, 2, p. 93, 2011.

CORALLO, D.; SCHIAVINATO, A.; TRAPANI, V.; MORO, E. *et al.* Emilin3 is required for notochord sheath integrity and interacts with Scube2 to regulate notochord-derived Hedgehog signals. **Development**, 140, n. 22, p. 4594-4601, Nov 2013.

CORRÊA, R. R.; PUCCI, K. R.; ROCHA, L. P.; PEREIRA JÚNIOR, C. D. *et al.* Acute kidney injury and progression of renal failure after fetal programming in the offspring of diabetic rats. **Pediatr Res**, 77, n. 3, p. 440-446, Mar 2015.

CUI, N.; HU, M.; KHALIL, R. A. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. **Prog Mol Biol Transl Sci**, 147, p. 1-73, 2017.

DANEMAN, D. Type 1 diabetes. **Lancet**, 367, n. 9513, p. 847-858, Mar 2006.

DARYADEL, A.; HAUBITZ, M.; FIGUEIREDO, M.; STEUBL, D. *et al.* The C-Terminal Fragment of Agrin (CAF), a Novel Marker of Renal Function, Is Filtered by the Kidney and Reabsorbed by the Proximal Tubule. **PLoS One**, 11, n. 7, p. e0157905, 2016.

DASHE, J. S.; NATHAN, L.; MCINTIRE, D. D.; LEVENO, K. J. Correlation between amniotic fluid glucose concentration and amniotic fluid volume in pregnancy complicated by diabetes. **Am J Obstet Gynecol**, 182, n. 4, p. 901-904, Apr 2000.

DAVIDSON, A. J. **Mouse kidney development**. 2009.

DAVIES, I.; FOTHERINGHAM, A. P.; FARAGHER, B. E. Age-associated changes in the kidney of the laboratory mouse. **Age Ageing**, 18, n. 2, p. 127-133, Mar 1989.

DESJARDINS, M.; BENDAYAN, M. Ontogenesis of glomerular basement membrane: structural and functional properties. **J Cell Biol**, 113, n. 3, p. 689-700, May 1991.

DEVETZIS, V.; DARYADEL, A.; ROUMELIOTIS, S.; THEODORIDIS, M. *et al.* C-Terminal Fragment of Agrin (CAF): A Novel Marker for Progression of Kidney Disease in Type 2 Diabetics. **PLoS One**, 10, n. 12, p. e0143524, 2015.

DILWORTH, M. R.; KUSINSKI, L. C.; BAKER, B. C.; RENSHALL, L. J. *et al.* Defining fetal growth restriction in mice: A standardized and clinically relevant approach. **Placenta**, 32, n. 11, p. 914-916, Nov 2011.

DUBIEL, M.; GUNNARSSON, G. O.; GUDMUNDSSON, S. Blood redistribution in the fetal brain during chronic hypoxia. **Ultrasound Obstet Gynecol**, 20, n. 2, p. 117-121, Aug 2002.

FABREGAT, A.; JUPE, S.; MATTHEWS, L.; SIDIROPOULOS, K. *et al.* The Reactome Pathway Knowledgebase. **Nucleic Acids Res**, 46, n. D1, p. D649-D655, Jan 2018.

FAVARO, R. R.; RASPANTINI, P. R.; SALGADO, R. M.; FORTES, Z. B. *et al.* Long-term type 1 diabetes alters the deposition of collagens and proteoglycans in the early pregnant myometrium of mice. **Histol Histopathol**, 30, n. 4, p. 435-444, Apr 2015.

FAVARO, R. R.; SALGADO, R. M.; COVARRUBIAS, A. C.; BRUNI, F. *et al.* Long-term type 1 diabetes impairs decidualization and extracellular matrix remodeling during early embryonic development in mice. **Placenta**, 34, n. 12, p. 1128-1135, Dec 2013.

FAVARO, R. R.; SALGADO, R. M.; RASPANTINI, P. R.; FORTES, Z. B. *et al.* Effects of long-term diabetes on the structure and cell proliferation of the myometrium in the early pregnancy of mice. **Int J Exp Pathol**, 91, n. 5, p. 426-435, Oct 2010.

FAVOR, J.; GLOECKNER, C. J.; JANIK, D.; KLEMPT, M. *et al.* Type IV procollagen missense mutations associated with defects of the eye, vascular stability, the brain, kidney function and embryonic or postnatal viability in the mouse, *Mus musculus*: an extension of the Col4a1 allelic series and the identification of the first two Col4a2 mutant alleles. **Genetics**, 175, n. 2, p. 725-736, Feb 2007.

FAWCETT, D. W. **Bloom and Fawcett: A textbook of histology**. 11th ed. Saunders, 1986.

FILIPOVIC, N.; VUKOJEVIC, K.; BOCINA, I.; SARAGA, M. *et al.* Immunohistochemical and electronmicroscopic features of mesenchymal-to-epithelial transition in human developing, postnatal and nephrotic podocytes. **Histochem Cell Biol**, 147, n. 4, p. 481-495, Apr 2017.

FITZGERALD, J.; HOLDEN, P.; HANSEN, U. The expanded collagen VI family: new chains and new questions. **Connect Tissue Res**, 54, n. 6, p. 345-350, 2013.

FREITAS, V. M.; JAEGER, R. G. The effect of laminin and its peptide SIKVAV on a human salivary gland adenoid cystic carcinoma cell line. **Virchows Arch**, 441, n. 6, p. 569-576, Dec 2002.

FREITAS, V. M.; VILAS-BOAS, V. F.; PIMENTA, D. C.; LOUREIRO, V. *et al.* SIKVAV, a laminin alpha1-derived peptide, interacts with integrins and increases protease

activity of a human salivary gland adenoid cystic carcinoma cell line through the ERK 1/2 signaling pathway. **Am J Pathol**, 171, n. 1, p. 124-138, Jul 2007.

GARA, S. K.; GRUMATI, P.; SQUARZONI, S.; SABATELLI, P. *et al.* Differential and restricted expression of novel collagen VI chains in mouse. **Matrix Biol**, 30, n. 4, p. 248-257, May 2011.

GARA, S. K.; GRUMATI, P.; URCIUOLO, A.; BONALDO, P. *et al.* Three novel collagen VI chains with high homology to the alpha3 chain. **J Biol Chem**, 283, n. 16, p. 10658-10670, Apr 2008.

GARG, P. A Review of Podocyte Biology. **Am J Nephrol**, 47 Suppl 1, p. 3-13, 2018.

GATSEVA, A.; SIN, Y. Y.; BREZZO, G.; VAN AGTMAEL, T. Basement membrane collagens and disease mechanisms. **Essays Biochem**, Aug 2019.

GORDON, M. K.; HAHN, R. A. Collagens. **Cell Tissue Res**, 339, n. 1, p. 247-257, Jan 2010.

GROFFEN, A. J.; VEERKAMP, J. H.; MONNENS, L. A.; VAN DEN HEUVEL, L. P. Recent insights into the structure and functions of heparan sulfate proteoglycans in the human glomerular basement membrane. **Nephrol Dial Transplant**, 14, n. 9, p. 2119-2129, Sep 1999.

GUNWAR, S.; BALLESTER, F.; NOELKEN, M. E.; SADO, Y. *et al.* Glomerular basement membrane. Identification of a novel disulfide-cross-linked network of alpha3, alpha4, and alpha5 chains of type IV collagen and its implications for the pathogenesis of Alport syndrome. **J Biol Chem**, 273, n. 15, p. 8767-8775, Apr 1998.

HAAS, C. S.; GLEASON, B.; LIN, S.; TRAMONTI, G. *et al.* Matrix metalloproteinases in renal development. **Connect Tissue Res**, 45, n. 2, p. 73-85, 2004.

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

HARVEY, S. J.; ZHENG, K.; SADO, Y.; NAITO, I. *et al.* Role of distinct type IV collagen networks in glomerular development and function. **Kidney Int**, 54, n. 6, p. 1857-1866, Dec 1998.

HESSLE, H.; ENGVALL, E. Type VI collagen. Studies on its localization, structure, and biosynthetic form with monoclonal antibodies. **J Biol Chem**, 259, n. 6, p. 3955-3961, Mar 1984.

HOKKE, S.; ARIAS, N.; ARMITAGE, J. A.; PUELLES, V. G. *et al.* Maternal glucose intolerance reduces offspring nephron endowment and increases glomerular volume in adult offspring. **Diabetes Metab Res Rev**, 32, n. 8, p. 816-826, Nov 2016.

HOKKE, S. N.; ARMITAGE, J. A.; PUELLES, V. G.; SHORT, K. M. *et al.* Altered ureteric branching morphogenesis and nephron endowment in offspring of diabetic and insulin-treated pregnancy. **PLoS One**, 8, n. 3, p. e58243, 2013.

HU, C.; SUN, L.; XIAO, L.; HAN, Y. *et al.* Insights into the Mechanisms Involved in the Expression and Regulation of Extracellular Matrix Proteins in Diabetic Nephropathy. **Curr Med Chem**, 22, n. 24, p. 2858-2870, 2015.

HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nat Protoc**, 4, n. 1, p. 44-57, 2009.

HUMPHRIES, J. D.; BYRON, A.; BASS, M. D.; CRAIG, S. E. *et al.* Proteomic analysis of integrin-associated complexes identifies RCC2 as a dual regulator of Rac1 and Arf6. **Sci Signal**, 2, n. 87, p. ra51, Sep 2009.

HYNES, R. O. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. **Science**, 326, n. 5957, p. 1216-1219, Nov 2009.

HYNES, R. O.; NABA, A. Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 4, n. 1, p. a004903, Jan 2012.

IDF, I. D. F. IDF Diabetes Atlas. IDF: 150 p. 2017.

IOZZO, R. V. Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 6, n. 8, p. 646-656, Aug 2005.

IOZZO, R. V.; COHEN, I. R.; GRÄSSEL, S.; MURDOCH, A. D. The biology of perlecan: the multifaceted heparan sulphate proteoglycan of basement membranes and pericellular matrices. **Biochem J**, 302 (Pt 3), p. 625-639, Sep 1994.

ITOH, Y. Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. **Matrix Biol**, 44-46, p. 207-223, 2015 May-Jul 2015.

JARAD, G.; CUNNINGHAM, J.; SHAW, A. S.; MINER, J. H. Proteinuria precedes podocyte abnormalities in *Lamb2*^{-/-} mice, implicating the glomerular basement membrane as an albumin barrier. **J Clin Invest**, 116, n. 8, p. 2272-2279, Aug 2006.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSON, P. **Histologia Básica**. 13a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. 568 p.

KALLURI, R.; SHIELD, C. F.; TODD, P.; HUDSON, B. G. *et al.* Isoform switching of type IV collagen is developmentally arrested in X-linked Alport syndrome leading to increased susceptibility of renal basement membranes to endoproteolysis. **J Clin Invest**, 99, n. 10, p. 2470-2478, May 1997.

KANWAR, Y. S.; CARONE, F. A.; KUMAR, A.; WADA, J. *et al.* Role of extracellular matrix, growth factors and proto-oncogenes in metanephric development. **Kidney Int**, 52, n. 3, p. 589-606, Sep 1997.

KANWAR, Y. S.; LIU, Z. Z.; KUMAR, A.; USMAN, M. I. *et al.* D-glucose-induced dysmorphogenesis of embryonic kidney. **J Clin Invest**, 98, n. 11, p. 2478-2488, Dec 1996.

KANWAR, Y. S.; WADA, J.; LIN, S.; DANESH, F. R. *et al.* Update of extracellular matrix, its receptors, and cell adhesion molecules in mammalian nephrogenesis. **Am J Physiol Renal Physiol**, 286, n. 2, p. F202-215, Feb 2004.

KAWACHI, H.; MIYAUCHI, N.; SUZUKI, K.; HAN, G. D. *et al.* Role of podocyte slit diaphragm as a filtration barrier. **Nephrology (Carlton)**, 11, n. 4, p. 274-281, Aug 2006.

KHOSHNOODI, J.; PEDCHENKO, V.; HUDSON, B. G. Mammalian collagen IV. **Microsc Res Tech**, 71, n. 5, p. 357-370, May 2008.

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. **Histology and cell biology: an introduction to pathology**. 3rd ed. Elsevier Saunders, 2012. 701 p.

KIM, Y.; KLEPPEL, M. M.; BUTKOWSKI, R.; MAUER, S. M. *et al.* Differential expression of basement membrane collagen chains in diabetic nephropathy. **Am J Pathol**, 138, n. 2, p. 413-420, Feb 1991.

KLEIN, G.; LANGEGER, M.; TIMPL, R.; EKBLOM, P. Role of laminin A chain in the development of epithelial cell polarity. **Cell**, 55, n. 2, p. 331-341, Oct 1988.

KOLSET, S. O.; REINHOLT, F. P.; JENSSEN, T. Diabetic nephropathy and extracellular matrix. **J Histochem Cytochem**, 60, n. 12, p. 976-986, Dec 2012.

KOOP, K.; EIKMANS, M.; BAELDE, H. J.; KAWACHI, H. *et al.* Expression of podocyte-associated molecules in acquired human kidney diseases. **J Am Soc Nephrol**, 14, n. 8, p. 2063-2071, Aug 2003.

KRIZ, W.; LÖWEN, J.; FEDERICO, G.; VAN DEN BORN, J. *et al.* Accumulation of worn-out GBM material substantially contributes to mesangial matrix expansion in diabetic nephropathy. **Am J Physiol Renal Physiol**, 312, n. 6, p. F1101-F1111, 06 2017.

KROCHMAL, M.; KONTOSTATHI, G.; MAGALHÃES, P.; MAKRIDAKIS, M. *et al.* Urinary peptidomics analysis reveals proteases involved in diabetic nephropathy. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 15160, 11 2017.

KUURE, S.; VUOLTEENAHON, R.; VAINIO, S. Kidney morphogenesis: cellular and molecular regulation. **Mech Dev**, 92, n. 1, p. 31-45, Mar 2000.

LAMPE, A. K.; BUSHBY, K. M. Collagen VI related muscle disorders. **J Med Genet**, 42, n. 9, p. 673-685, Sep 2005.

LEE, S. M.; JUN, J. K.; LEE, E. J.; LEE, J. H. *et al.* Measurement of fetal urine production to differentiate causes of increased amniotic fluid volume. **Ultrasound Obstet Gynecol**, 36, n. 2, p. 191-195, Aug 2010.

LENNON, R.; BYRON, A.; HUMPHRIES, J. D.; RANGLES, M. J. *et al.* Global analysis reveals the complexity of the human glomerular extracellular matrix. **J Am Soc Nephrol**, 25, n. 5, p. 939-951, May 2014.

LI, Y.; ZHONG, Y.; GONG, W.; GAO, X. *et al.* C-peptide prevents SMAD3 binding to alpha promoters to inhibit collagen type IV synthesis. **J Mol Endocrinol**, 61, n. 1, p. 47-56, Jul 2018.

LIANG, Y.; ARAKAWA, K.; UETA, K.; MATSUSHITA, Y. *et al.* Effect of canagliflozin on renal threshold for glucose, glycemia, and body weight in normal and diabetic animal models. **PLoS One**, 7, n. 2, p. e30555, 2012.

LINDSTRÖM, N. O.; MCMAHON, J. A.; GUO, J.; TRAN, T. *et al.* Conserved and Divergent Features of Human and Mouse Kidney Organogenesis. **J Am Soc Nephrol**, 29, n. 3, p. 785-805, 03 2018.

LIU, F.; MIH, J. D.; SHEA, B. S.; KHO, A. T. *et al.* Feedback amplification of fibrosis through matrix stiffening and COX-2 suppression. **J Cell Biol**, 190, n. 4, p. 693-706, Aug 2010.

LIU, Z. Z.; CARONE, F. A.; DALECKI, T. M.; LELONGT, B. *et al.* Mannose-induced dysmorphogenesis of metanephric kidney. Role of proteoglycans and adenosine triphosphate. **J Clin Invest**, 90, n. 4, p. 1205-1218, Oct 1992.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, 25, n. 4, p. 402-408, Dec 2001.

LIZIO, M.; ABUGESSAISA, I.; NOGUCHI, S.; KONDO, A. *et al.* Update of the FANTOM web resource: expansion to provide additional transcriptome atlases. **Nucleic Acids Res**, 47, n. D1, p. D752-D758, Jan 2019.

LU, P.; TAKAI, K.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 3, n. 12, Dec 2011.

LUYCKX, V. A.; BRENNER, B. M. Low birth weight, nephron number, and kidney disease. **Kidney Int Suppl**, n. 97, p. S68-77, Aug 2005.

LUYCKX, V. A.; PERICO, N.; SOMASCHINI, M.; MANFELLOTTI, D. *et al.* A developmental approach to the prevention of hypertension and kidney disease: a report from the Low Birth Weight and Nephron Number Working Group. **Lancet**, Mar 2017.

LUYCKX, V. A.; SHUKHA, K.; BRENNER, B. M. Low nephron number and its clinical consequences. **Rambam Maimonides Med J**, 2, n. 4, p. e0061, Oct 2011.

MAGGIORANI, D.; DISSARD, R.; BELLOY, M.; SAULNIER-BLACHE, J. S. *et al.* Shear Stress-Induced Alteration of Epithelial Organization in Human Renal Tubular Cells. **PLoS One**, 10, n. 7, p. e0131416, 2015.

MAJUMDAR, A.; DRUMMOND, I. A. Podocyte differentiation in the absence of endothelial cells as revealed in the zebrafish avascular mutant, cloche. **Dev Genet**, 24, n. 3-4, p. 220-229, 1999.

MAKINO, H.; SHIKATA, K.; HIRONAKA, K.; KUSHIRO, M. *et al.* Ultrastructure of nonenzymatically glycated mesangial matrix in diabetic nephropathy. **Kidney Int**, 48, n. 2, p. 517-526, Aug 1995.

MAKINO, H.; SHIKATA, K.; WIESLANDER, J.; WADA, J. *et al.* Localization of fibril/microfibril and basement membrane collagens in diabetic glomerulosclerosis in type 2 diabetes. **Diabet Med**, 11, n. 3, p. 304-311, Apr 1994.

MAKINO, H.; YAMASAKI, Y.; HARAMOTO, T.; SHIKATA, K. *et al.* Ultrastructural changes of extracellular matrices in diabetic nephropathy revealed by high resolution scanning and immunoelectron microscopy. **Lab Invest**, 68, n. 1, p. 45-55, Jan 1993.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Fisiologia e fisiopatologia: Estereologia do rim: Determinação do Vv, Nv e volume médio do glomérulo. 22, p. 103-109, 2000.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **An Acad Bras Cienc**, 75, n. 4, p. 469-486, Dec 2003.

MARCO, L. J.; MCCLOSKEY, K.; VUILLERMIN, P. J.; BURGNER, D. *et al.* Cardiovascular disease risk in the offspring of diabetic women: the impact of the intrauterine environment. **Exp Diabetes Res**, 2012, p. 565160, 2012.

MASON, R. M.; WAHAB, N. A. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. **J Am Soc Nephrol**, 14, n. 5, p. 1358-1373, May 2003.

MCMAHON, A. P. Development of the Mammalian Kidney. **Curr Top Dev Biol**, 117, p. 31-64, 2016.

MILLER, R. T.; JANMEY, P. A. Relationship of and cross-talk between physical and biologic properties of the glomerulus. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, 24, n. 4, p. 393-400, Jul 2015.

MINER, J. H. Renal basement membrane components. **Kidney Int**, 56, n. 6, p. 2016-2024, Dec 1999.

MINER, J. H. Organogenesis of the kidney glomerulus: focus on the glomerular basement membrane. **Organogenesis**, 7, n. 2, p. 75-82, 2011 Apr-Jun 2011.

MINER, J. H. The glomerular basement membrane. **Exp Cell Res**, 318, n. 9, p. 973-978, May 2012.

MINER, J. H.; LI, C. Defective glomerulogenesis in the absence of laminin alpha5 demonstrates a developmental role for the kidney glomerular basement membrane. **Dev Biol**, 217, n. 2, p. 278-289, Jan 2000.

MINER, J. H.; PATTON, B. L.; LENTZ, S. I.; GILBERT, D. J. *et al.* The laminin alpha chains: expression, developmental transitions, and chromosomal locations of alpha1-5, identification of heterotrimeric laminins 8-11, and cloning of a novel alpha3 isoform. **J Cell Biol**, 137, n. 3, p. 685-701, May 1997.

MINER, J. H.; SANES, J. R. Collagen IV alpha 3, alpha 4, and alpha 5 chains in rodent basal laminae: sequence, distribution, association with laminins, and developmental switches. **J Cell Biol**, 127, n. 3, p. 879-891, Nov 1994.

MOUW, J. K.; OU, G.; WEAVER, V. M. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 15, n. 12, p. 771-785, Dec 2014.

NABA, A.; CLAUSER, K. R.; DING, H.; WHITTAKER, C. A. *et al.* The extracellular matrix: Tools and insights for the "omics" era. **Matrix Biol**, 49, p. 10-24, Jan 2016.

NABA, A.; CLAUSER, K. R.; HOERSCH, S.; LIU, H. *et al.* The matrisome: in silico definition and in vivo characterization by proteomics of normal and tumor extracellular matrices. **Mol Cell Proteomics**, 11, n. 4, p. M111.014647, Apr 2012.

NAEYE, R. L.; BLANC, W. A. Fetal renal structure and the genesis of amniotic fluid disorders. **Am J Pathol**, 67, n. 1, p. 95-108, Apr 1972.

NERLICH, A.; SCHLEICHER, E. Immunohistochemical localization of extracellular matrix components in human diabetic glomerular lesions. **Am J Pathol**, 139, n. 4, p. 889-899, Oct 1991.

NERLICH, A. G.; SCHLEICHER, E. D.; WIEST, I.; SPECKS, U. *et al.* Immunohistochemical localization of collagen VI in diabetic glomeruli. **Kidney Int**, 45, n. 6, p. 1648-1656, Jun 1994.

OLIVEIRA, B.; UNWIN, R.; WALSH, S. B. Inherited proximal tubular disorders and nephrolithiasis. **Urolithiasis**, 47, n. 1, p. 35-42, Feb 2019.

OLIVEIRA, F. R.; BARROS, E. G.; MAGALHÃES, J. A. Biochemical profile of amniotic fluid for the assessment of fetal and renal development. **Braz J Med Biol Res**, 35, n. 2, p. 215-222, Feb 2002.

ORCHARD, S.; AMMARI, M.; ARANDA, B.; BREUZA, L. *et al.* The MIntAct project--IntAct as a common curation platform for 11 molecular interaction databases. **Nucleic Acids Res**, 42, n. Database issue, p. D358-363, Jan 2014.

OXBURGH, L. Kidney Nephron Determination. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 34, p. 427-450, 10 2018.

PASTINO, A. K.; GRECO, T. M.; MATHIAS, R. A.; CRISTEA, I. M. *et al.* Stimulatory effects of advanced glycation endproducts (AGEs) on fibronectin matrix assembly. **Matrix Biol**, 59, p. 39-53, 05 2017.

PERKINS, D. N.; PAPPIN, D. J.; CREASY, D. M.; COTTRELL, J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, 20, n. 18, p. 3551-3567, Dec 1999.

POHL, M.; SAKURAI, H.; BUSH, K. T.; NIGAM, S. K. Matrix metalloproteinases and their inhibitors regulate in vitro ureteric bud branching morphogenesis. **Am J Physiol Renal Physiol**, 279, n. 5, p. F891-900, Nov 2000.

RAATS, C. J.; BAKKER, M. A.; HOCH, W.; TAMBOER, W. P. *et al.* Differential expression of agrin in renal basement membranes as revealed by domain-specific antibodies. **J Biol Chem**, 273, n. 28, p. 17832-17838, Jul 1998.

RAATS, C. J.; VAN DEN BORN, J.; BAKKER, M. A.; OPPERS-WALGREEN, B. *et al.* Expression of agrin, dystroglycan, and utrophin in normal renal tissue and in experimental glomerulopathies. **Am J Pathol**, 156, n. 5, p. 1749-1765, May 2000.

RANGLES, M. J.; COLLINSON, S.; STARBORG, T.; MIRONOV, A. *et al.* Three-dimensional electron microscopy reveals the evolution of glomerular barrier injury. **Sci Rep**, 6, p. 35068, 10 2016.

RANGLES, M. J.; WOOLF, A. S.; HUANG, J. L.; BYRON, A. *et al.* Genetic Background is a Key Determinant of Glomerular Extracellular Matrix Composition and Organization. **J Am Soc Nephrol**, 26, n. 12, p. 3021-3034, Dec 2015.

REECE, W. O. Função renal nos mamíferos. *In*: REECE, W. O. (Ed.). **Dukes, Fisiologia dos animais domésticos**. 12a ed.: Guanabara Koogan, 2014. cap. 5, p. 67-96.

RENFREE, M. B.; HENSLEIGH, H. C.; MCLAREN, A. Developmental changes in the composition and amount of mouse fetal fluids. **J Embryol Exp Morphol**, 33, n. 2, p. 435-446, Apr 1975.

RETICKER-FLYNN, N. E.; MALTA, D. F.; WINSLOW, M. M.; LAMAR, J. M. *et al.* A combinatorial extracellular matrix platform identifies cell-extracellular matrix interactions that correlate with metastasis. **Nat Commun**, 3, p. 1122, 2012.

RICARD-BLUM, S. The collagen family. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 3, n. 1, p. a004978, Jan 2011.

RUSO, L. M.; SANDOVAL, R. M.; MCKEE, M.; OSICKA, T. M. *et al.* The normal kidney filters nephrotic levels of albumin retrieved by proximal tubule cells: retrieval is disrupted in nephrotic states. **Kidney Int**, 71, n. 6, p. 504-513, Mar 2007.

SABATELLI, P.; GUALANDI, F.; GARA, S. K.; GRUMATI, P. *et al.* Expression of collagen VI $\alpha 5$ and $\alpha 6$ chains in human muscle and in Duchenne muscular dystrophy-related muscle fibrosis. **Matrix Biol**, 31, n. 3, p. 187-196, Apr 2012.

SANCHES, J. C.; FAVARO, R. R.; BARRENCE, F. C.; BEVILACQUA, E. *et al.* **Distinct effects of short- and long-term type 1 diabetes to the placental extracellular matrix and fetal development in mice.** *Placenta*, p.1-7. 2017.

SANES, J. R.; ENGVALL, E.; BUTKOWSKI, R.; HUNTER, D. D. Molecular heterogeneity of basal laminae: isoforms of laminin and collagen IV at the neuromuscular junction and elsewhere. **J Cell Biol**, 111, n. 4, p. 1685-1699, Oct 1990.

SATO, S.; SASAKI, Y.; ADACHI, A.; GHAZIZADEH, M. Validation of glomerular basement membrane thickness changes with aging in minimal change disease. **Pathobiology**, 77, n. 6, p. 315-319, 2010.

SCHELL, C.; WANNER, N.; HUBER, T. B. Glomerular development--shaping the multi-cellular filtration unit. **Semin Cell Dev Biol**, 36, p. 39-49, Dec 2014.

SCHIAVINATO, A.; BECKER, A. K.; ZANETTI, M.; CORALLO, D. *et al.* EMILIN-3, peculiar member of elastin microfibril interface-located protein (EMILIN) family, has distinct expression pattern, forms oligomeric assemblies, and serves as transforming growth factor β (TGF- β) antagonist. **J Biol Chem**, 287, n. 14, p. 11498-11515, Mar 2012.

SCHWARZBAUER, J. E.; DESIMONE, D. W. Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 3, n. 7, Jul 2011.

SERBAN, A. I.; STANCA, L.; GEICU, O. I.; MUNTEANU, M. C. *et al.* Extracellular matrix is modulated in advanced glycation end products milieu via a RAGE receptor dependent pathway boosted by transforming growth factor- β 1 RAGE. **J Diabetes**, 7, n. 1, p. 114-124, Jan 2015.

SHANNON, P.; MARKIEL, A.; OZIER, O.; BALIGA, N. S. *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Res**, 13, n. 11, p. 2498-2504, Nov 2003.

SHARMA, V.; TIKOO, K. Stage-specific quantitative changes in renal and urinary proteome during the progression and development of streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. **Mol Cell Biochem**, 388, n. 1-2, p. 95-111, Mar 2014.

SHORT, K. M.; COMBES, A. N.; LEFEVRE, J.; JU, A. L. *et al.* Global quantification of tissue dynamics in the developing mouse kidney. **Dev Cell**, 29, n. 2, p. 188-202, Apr 2014.

SMUCZEK, B.; SANTOS, E. S.; SIQUEIRA, A. S.; PINHEIRO, J. J. V. *et al.* The laminin-derived peptide C16 regulates GPNMB expression and function in breast cancer. **Exp Cell Res**, 358, n. 2, p. 323-334, 09 2017.

SORUSHANOVA, A.; DELGADO, L. M.; WU, Z.; SHOLOGU, N. *et al.* The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. **Adv Mater**, 31, n. 1, p. e1801651, Jan 2019.

ST JOHN, P. L.; ABRAHAMSON, D. R. Glomerular endothelial cells and podocytes jointly synthesize laminin-1 and -11 chains. **Kidney Int**, 60, n. 3, p. 1037-1046, Sep 2001.

STARK, C.; BREITKREUTZ, B. J.; REGULY, T.; BOUCHER, L. *et al.* BioGRID: a general repository for interaction datasets. **Nucleic Acids Res**, 34, n. Database issue, p. D535-539, Jan 2006.

STEER, D. L.; SHAH, M. M.; BUSH, K. T.; STUART, R. O. *et al.* Regulation of ureteric bud branching morphogenesis by sulfated proteoglycans in the developing kidney. **Dev Biol**, 272, n. 2, p. 310-327, Aug 2004.

STEFFES, M. W.; SCHMIDT, D.; MCCRERY, R.; BASGEN, J. M. *et al.* Glomerular cell number in normal subjects and in type 1 diabetic patients. **Kidney Int**, 59, n. 6, p. 2104-2113, Jun 2001.

SUH, J. H.; MINER, J. H. The glomerular basement membrane as a barrier to albumin. **Nat Rev Nephrol**, 9, n. 8, p. 470-477, Aug 2013.

SULEIMAN, H.; ZHANG, L.; ROTH, R.; HEUSER, J. E. *et al.* Nanoscale protein architecture of the kidney glomerular basement membrane. **Elife**, 2, p. e01149, Oct 2013.

TAGLIAVINI, F.; PELLEGRINI, C.; SARDONE, F.; SQUARZONI, S. *et al.* Defective collagen VI $\alpha 6$ chain expression in the skeletal muscle of patients with collagen VI-related myopathies. **Biochim Biophys Acta**, 1842, n. 9, p. 1604-1612, Sep 2014.

TAN, R. J.; LIU, Y. Matrix metalloproteinases in kidney homeostasis and diseases. **Am J Physiol Renal Physiol**, 302, n. 11, p. F1351-1361, Jun 2012.

TANNER, G. A. Glomerular sieving coefficient of serum albumin in the rat: a two-photon microscopy study. **Am J Physiol Renal Physiol**, 296, n. 6, p. F1258-1265, Jun 2009.

TANNEY, D. C.; FENG, L.; POLLOCK, A. S.; LOVETT, D. H. Regulated expression of matrix metalloproteinases and TIMP in nephrogenesis. **Dev Dyn**, 213, n. 1, p. 121-129, Sep 1998.

THAM, M. S.; SMYTH, I. M. Cellular and molecular determinants of normal and abnormal kidney development. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol**, 8, n. 2, p. e338, Mar 2019.

TIMPL, R. Structure and biological activity of basement membrane proteins. **Eur J Biochem**, 180, n. 3, p. 487-502, Apr 1989.

TIMPL, R.; BROWN, J. C. The laminins. **Matrix Biol**, 14, n. 4, p. 275-281, Aug 1994.

TOTH, M.; FRIDMAN, R. Assessment of Gelatinases (MMP-2 and MMP-9 by Gelatin Zymography. **Methods Mol Med**, 57, p. 163-174, 2001.

TRAN, S.; CHEN, Y. W.; CHENIER, I.; CHAN, J. S. *et al.* Maternal diabetes modulates renal morphogenesis in offspring. **J Am Soc Nephrol**, 19, n. 5, p. 943-952, May 2008.

TSCHANZ, S. A.; BURRI, P. H.; WEIBEL, E. R. A simple tool for stereological assessment of digital images: the STEPanizer. **J Microsc**, 243, n. 1, p. 47-59, Jul 2011.

TUFRO, A.; NORWOOD, V. F.; CAREY, R. M.; GOMEZ, R. A. Vascular endothelial growth factor induces nephrogenesis and vasculogenesis. **J Am Soc Nephrol**, 10, n. 10, p. 2125-2134, Oct 1999.

UNDERWOOD, M. A.; GILBERT, W. M.; SHERMAN, M. P. Amniotic fluid: not just fetal urine anymore. **J Perinatol**, 25, n. 5, p. 341-348, May 2005.

VALLON, V.; THOMSON, S. C. Renal function in diabetic disease models: the tubular system in the pathophysiology of the diabetic kidney. **Annu Rev Physiol**, 74, p. 351-375, 2012.

VELIKA, B.; BIRKOVA, A.; DUDIC, R.; URDZIK, P. *et al.* Selected physicochemical properties of amniotic fluid according to week of pregnancy. **Bratisl Lek Listy**, 119, n. 3, p. 175-179, 2018.

VOZIYAN, P.; BROWN, K. L.; CHETYRKIN, S.; HUDSON, B. Site-specific AGE modifications in the extracellular matrix: a role for glyoxal in protein damage in diabetes. **Clin Chem Lab Med**, 52, n. 1, p. 39-45, Jan 1 2014.

WADA, J.; KANWAR, Y. S.; MAKINO, H. Relevance of extracellular matrix and its receptors in mammalian nephrogenesis revealed by metanephric organ culture system. **Nephrol Dial Transplant**, 17 Suppl 9, p. 75-77, 2002.

WEINSTEIN, A. M. The diabetic proximal tubule: part of the problem, and part of the solution? **Am J Physiol Renal Physiol**, 307, n. 2, p. F147-148, Jul 2014.

WEISS, P. A.; SCHOLZ, H. S.; HAAS, J.; TAMUSSINO, K. F. *et al.* Long-term follow-up of infants of mothers with type 1 diabetes: evidence for hereditary and nonhereditary transmission of diabetes and precursors. **Diabetes Care**, 23, n. 7, p. 905-911, Jul 2000.

WHITE, K. E. Research into the structure of the kidney glomerulus--making it count. **Micron**, 43, n. 10, p. 1001-1009, Oct 2012.

WORONIECKA, K. I.; PARK, A. S.; MOHTAT, D.; THOMAS, D. B. *et al.* Transcriptome analysis of human diabetic kidney disease. **Diabetes**, 60, n. 9, p. 2354-2369, Sep 2011.

XIANG, H.; XUE, W.; WU, X.; ZHENG, J. *et al.* FOXP1 inhibits high glucose-induced ECM accumulation and oxidative stress in mesangial cells. **Chem Biol Interact**, p. 108818, Sep 2019.

XIE, J.; WU, X.; REN, H.; WANG, W. *et al.* COL4A3 mutations cause focal segmental glomerulosclerosis. **J Mol Cell Biol**, 6, n. 6, p. 498-505, Dec 2014.

XU, X.; XIAO, L.; XIAO, P.; YANG, S. *et al.* A glimpse of matrix metalloproteinases in diabetic nephropathy. **Curr Med Chem**, 21, n. 28, p. 3244-3260, 2014.

YAGAME, M.; KIM, Y.; ZHU, D.; SUZUKI, D. *et al.* Differential distribution of type IV collagen chains in patients with diabetic nephropathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Nephron**, 70, n. 1, p. 42-48, 1995.

YAMAMOTO, K.; MURPHY, G.; TROEBERG, L. Extracellular regulation of metalloproteinases. **Matrix Biol**, 44-46, p. 255-263, 2015 May-Jul 2015.

YAO, Y. Laminin: loss-of-function studies. **Cell Mol Life Sci**, 74, n. 6, p. 1095-1115, 03 2017.

YARD, B. A.; KAHLERT, S.; ENGELLEITER, R.; RESCH, S. *et al.* Decreased glomerular expression of agrin in diabetic nephropathy and podocytes, cultured in high glucose medium. **Exp Nephrol**, 9, n. 3, p. 214-222, 2001.

YUE, B. Biology of the extracellular matrix: an overview. **J Glaucoma**, 23, n. 8 Suppl 1, p. S20-23, 2014 Oct-Nov 2014.

YURCHENCO, P. D.; SCHITTNY, J. C. Molecular architecture of basement membranes. **FASEB J**, 4, n. 6, p. 1577-1590, Apr 1990.

ZACCHIGNA, L.; VECCHIONE, C.; NOTTE, A.; CORDENONSI, M. *et al.* Emilin1 links TGF-beta maturation to blood pressure homeostasis. **Cell**, 124, n. 5, p. 929-942, Mar 2006.

ZAIDEL-BAR, R.; GEIGER, B. The switchable integrin adhesome. **J Cell Sci**, 123, n. Pt 9, p. 1385-1388, May 2010.

ZENKER, M.; AIGNER, T.; WENDLER, O.; TRALAU, T. *et al.* Human laminin beta2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities. **Hum Mol Genet**, 13, n. 21, p. 2625-2632, Nov 2004.

ZENT, R.; YAN, X.; SU, Y.; HUDSON, B. G. *et al.* Glomerular injury is exacerbated in diabetic integrin alpha1-null mice. **Kidney Int**, 70, n. 3, p. 460-470, Aug 2006.

ZHOU, J.; BARKER, D. F.; HOSTIKKA, S. L.; GREGORY, M. C. *et al.* Single base mutation in alpha 5(IV) collagen chain gene converting a conserved cysteine to serine in Alport syndrome. **Genomics**, 9, n. 1, p. 10-18, Jan 1991.