

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

**PERFIL DE EXPRESSÃO DOS MIRNAS DA FAMÍLIA
MIR-200 E DO MIR-192 NO RIM TOTAL E GLOMÉRULOS
ISOLADOS DE RATOS SUBMETIDOS À RESTRIÇÃO
PROTEICA *IN UTERO***

Letícia de Barros Sene

Botucatu
2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

PERFIL DE EXPRESSÃO DOS MIRNAS DA FAMÍLIA
MIR-200 E MIR-192 NO RIM TOTAL E GLOMÉRULOS
ISOLADOS DE RATOS SUBMETIDOS À RESTRIÇÃO
PROTEICA *IN UTERO*

LETÍCIA DE BARROS SENE

Orientadora: **Profa. Dra. PATRÍCIA ALINE BOER**

Co-orientador: **Prof. Dr. ROBSON F. CARVALHO**

Colaborador: **Prof. Dr. JOSÉ ANTÔNIO ROCHA GONTIJO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular Estutural e Funcional.

Profa. Dra. Patrícia Aline Boer.

BOTUCATU – SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA
INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **SELMA MARIA DE JESUS**

Sene, Leticia de Barros.

Perfil de expressão dos miRNAs da família miR-200 e do miR-192 no rim total e glomérulos isolados de ratos submetidos à restrição proteica *in útero*.
Leticia de Barros Sene – 2012.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2012.

Orientadora: Patrícia Aline Boer

Co-orientador: Robson F. Carvalho

Assunto CAPES:

1. 20600003

2. 20202008

Palavras-chave: Programação fetal, miRNAs, transição epitélio mesenquimal, córtex renal, glomérulos isolados

Botucatu, 25 de julho de 2012.

**PERFIL DE EXPRESSÃO DOS MIRNAS DA FAMÍLIA MIR-200 E MIR-192
NO RIM TOTAL E GLOMÉRULOS ISOLADOS DE RATOS SUBMETIDOS À
RESTRIÇÃO PROTEICA *IN UTERO***

Banca Examinadora

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Aline Boer

Membros

Dra. Flávia Mesquita Silva

Profª. Dra. Débora Damasceno

"Se você é um filósofo que não consegue enxergar o que existe de vivo além dos livros e dos póis das bibliotecas, viva mais a filosofia, talvez um dia quem sabe, ao invés das citações dos mortos, você seja capaz de citar também o que esta dentro de você."

(Beatriz Camelo)

*“A nossa maior glória
não reside no fato de
nunca cairmos, mas sim
em levantarmo-nos
sempre depois de cada
queda”. (Confúcio)*

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

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus!

Aos meus pais e irmão, pelo carinho, paciência e por sempre confiarem no que faço.

Aos meus avós, Maria e Jurandir, e a minha tia Alzira, por acompanharem toda a minha caminhada, sempre torcendo pelo meu sucesso.

Ao meu noivo, Sandro, obrigada pela sua amizade, paciência, respeito, compreensão e amor! Sempre me apoiando e me dando força nos momentos difíceis, me incentivando a cada momento e me contagiando com o seu otimismo!

À Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma Lima, coordenadora da BGA, pela dedicação que teve comigo, após o processo de seleção, me mostrando as opções de orientadores. Aos funcionários do Departamento de Morfologia. Em especial a Dona Terezinha, pelos cafês e chás de erva-cidreira e hortelã.

Ao Prof. Dr. Sergio Luis Felisbino pelo fornecimento de alguns anticorpos para a realização de imunohistoquímica.

Ao Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano por todos os esclarecimentos, sempre disposto para responder as dúvidas que surgiram durante a realização do Western Blotting.

À Profa. Dra. Patrícia Aline Boer, pela confiança em aceitar me orientar, mesmo sem me conhecer, me recebeu de braços abertos e abriu as portas do seu laboratório. Agradeço também por todo ensinamento e dedicação compartilhado.

Ao Prof. Dr. José Antônio Gontijo pela colaboração ao projeto.

Ao Prof. Dr. Robson F. Carvalho, meu co-orientador, sempre otimista e me passando muita confiança.

Aos mestrandos Jason e Leonardo, por toda a paciência para me explicar e ensinar sobre a parte molecular do meu projeto.

Aos colegas de laboratório, Agnes, Bárbara, Carol, Carla, Dani, Heloisa e Victor. Que fazem do nosso ambiente de trabalho um local muito mais agradável.

Agnes, Dani e Carol, as veteranas do laboratório, me acolheram e me agregaram ao grupo quando cheguei, em julho de 2010, me explicaram como tudo funcionava e me ensinaram as técnicas que são utilizadas no laboratório.

E não poderia esquecer de agradecer pelas caronas, obrigada, Carol, Agnes, Bárbara e Carla.

Agradeço à CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

À Cristina, minha cunhada, por me receber em sua casa em Botucatu, por escutar meus desabafos e por sempre me apoiar.

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

Resumo

A desnutrição proteico-calórica representa um problema mundial de saúde pública. O ambiente adverso durante a vida embrionária e/ou na infância está relacionado com o risco de desenvolver doença na vida adulta. Esse processo é conhecido como programação fetal, no qual o ambiente antes do nascimento ou na infância molda o controle, em longo prazo, da fisiologia dos tecidos e da homeostase corporal. Resultados prévios do nosso grupo demonstraram que a programação fetal, por dieta hipoproteica, leva a redução do número de néfrons, entretanto a filtração glomerular não é alterada, embora estes animais apresentem proteinúria associada à simplificação podocitária, o que demonstra sobrecarga funcional glomerular, podendo gerar transição epitélio mesenquimal nos glomérulos e túbulos renais. A Transição epitelial mesenquimal (EMT) tem sido relacionada a muitas formas de doenças renais crônicas e os microRNAs da família miR-200 e o miR-192 contribuir para a EMT. Além disso, estudos mostram que os miRNAs podem ter relevância para a detecção precoce da lesão renal aguda e assim, prevenir a progressão da doença renal crônica. O mecanismo pelo qual a restrição proteica pode levar a alterações, em longo prazo, na expressão genica é a regulação epigenética. A palavra "epigenética" refere-se ao processo hereditário que modula a expressão genica sem alterar as sequências de DNA. O objetivo deste estudo foi verificar o perfil de expressão da família de miR-200 e miR-192 no rim total e glomérulos isolados em ratos programados pela restrição proteica gestacional, tanto nos animais de 12 dias quanto nos adultos da prole. Para isso, ratas prenhes foram alimentadas com dieta contendo quantidade normal de proteína (NP, 17% de caseína) ou com dieta contendo apenas 6% de caseína (LP) durante todo o período gestacional. Os rins dos machos da prole com 12 dias e 16 semanas de idade foram submetidos à imunohistoquímica para detectar a imunoreatividade e localização de TGF- β 1, fibronectina e colágeno do tipo I. O rim total e os glomérulos isolados

foram utilizados para estudar os perfis de expressão de miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429 e miR-192 por RT-qPCR usando TaqMan microRNA Assays (Life Technologies, EUA). RT-qPCR também foi realizada por SYBR Green Mix Master PCR para detectar o nível de expressão de colágeno I α 1, colágeno I α 2, desmina, fibronectina, E-caderina, ZO-1, ZEB1, ZEB2 e TGF- β 1. Os animais de 16 semanas de idade LP apresentaram imunoreatividade aumentada de TGF- β 1 fibronectina, e colágeno do tipo I em glomérulos. Estas proteínas estavam aumentadas apenas em poucas regiões da matriz peritubular cortical. No rim total de LP o nível de expressão de miR-192, miR-200c, miR-141, miR-429 estavam significativamente maiores. Em glomérulos isolados de LP o nível de expressão de miR-200a, miR-200b, miR-141 e miR-429 estavam menor. Os animais programados apresentam glomeruloesclerose quando adultos, o que nos levou a sugerir que a família miR-200 e o miR-192 estão mais expressos em glomérulos por TGF- β 1, em momentos iniciais, para induzir a expressão de colágeno tipo I. Este aumento no colágeno pode subsequentemente induzir a EMT nos glomérulos, diminuindo estes miRNAs em tempos posteriores. Supomos que a expressão de miRNAs pode ser célula-específica e contexto-dependente, com a resposta tubular ocorrendo tardiamente.

Abstract

The protein-calorie malnutrition represent global problems of public health. The adverse environment during the life embryofetal and /or in the infancy is related to the risk of disease in adult life. This process is known as fetal programming, in which the environment before birth or in childhood shapes the control, in the long term, of the physiology of tissues and body homeostasis. Gestational protein restriction during nephrogenesis lead to reduction in glomeruli number at birth. Our results show that fetal programming (by hypoproteic diet) lead decrease in nephron number, however, the glomerular filtration rate is unchanged, although these animals showed proteinuria associated with simplification podocitary, demonstrating glomerular functional overload, may cause epithelial mesenchymal transition in renal glomeruli and tubules. Epithelial mesenchymal transition (EMT) has been related to many forms of chronic kidney diseases and miR-200 family and miR-192 expression contribute to the EMT. Additionally, studies have showed that miRNA profiling might have relevance to the early detection of acute kidney injury and predict progression in chronic kidney disease. The mechanism by which maternal protein restriction can lead to long term alterations in genetic expression is epigenetic regulation. The word “epigenetic” refers to hereditary process that modulates potential genetic expression without alterations in DNA sequences. The aim of this study is to verify the profile of expression of family miR-200 and miR-192 in total kidney and isolated glomeruli in rats programmed by protein restriction *in utero*, at 12 days of age (final of the nephrogenesis period) and adult offspring. Wistar rats were fed during pregnancy with normal-protein diet (NP 17% casein) or protein-restricted diet (LP 6% casein). Kidneys of male offspring with 16th week of age were submitted to immunohistochemistry to detect transforming growth factor (TGF)- β 1, fibronectin and collagen type I expression and localization. Total kidney and isolated glomeruli were used to study the expression profiles of miR-

200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429, and miR-192 by RT-qPCR using TaqMan MicroRNA Assays (Life Technologies, USA). RT-qPCR also was performed by SYBR Green PCR Master Mix to detect expression level of collagen I α 1, collagen I α 2, desmin, fibronectin, E-cadherin, ZO-1, ZEB1, ZEB2 and TGF- β 1. 16 weeks-old LP rats presented significant increased immunoreactivity of TGF- β 1, fibronectin, and collagen type I in glomeruli. These proteins were increased only in few regions of cortical peritubular matrix. In total kidney of LP the level of miR-192, miR-200c, miR-141, miR-429 were significantly higher. In isolated glomeruli of LP the level of miR-200a, miR-141 and miR-429 are reduced. The fetal programmed rats presented adult glomerulosclerosis that led us to suggest that miR200 family and miR-192 are up-regulated in glomeruli by TGF- β 1 at early time points to induce type I collagen expression. This increase in collagen may subsequently induce glomeruli EMT by decreasing these miRNAs at later time points. We suppose that miRNAs expression may be cell-type specific and context dependent with tubular response occurring later.

Lista de Abreviações

CEATOX – Centro de Assistência Toxicológica.

CEMIB – Centro de Bioterismo da UNICAMP.

Col 1 α 2 – Colágeno 1 α 2.

DNA – Ácido desoxirribonucleico.

ECM – matriz extracelular.

EGF – Epidermal growth fator.

EMT – Transição epitélio mesenquimal.

FGF-2 – Fibroblast growth factor 2.

FSP1 – fibroblast-specific protein-1.

LP – low protein.

MEC – matriz extracelular

miRNAs, miRs – microRNAs.

MMPs – Metaloproteinases.

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro.

NP – normal protein.

PDGF – Platelet-derived growth fator.

RNA – Ácido ribonucleico.

RT-qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real.

TBM – membrana basal tubular.

TGF- β – Transforming growth fator beta 1.

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

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

ZO-1 – Zônula de oclusão-1.

α -SMA – α -smooth muscle actin.

11 β -HSD2 – 11- β -hidroxiesteróide desidrogenase.

Lista de Ilustrações

INTRODUÇÃO

Figura 1 – O ambiente materno provoca respostas adaptativas no feto, e uma das respostas é o menor crescimento, que resulta em baixo peso ao nascer.....p. 21

Figura 2 – A superexposição fetal a glicocorticoides maternos tem um papel central na programação nutricional.....p. 26

Figura 3 – Biogênese do microRNA.....p. 32

Figura 4 – Transição Epitélio Mesenquimal (tipo II) e fibrose.....p. 35

Figura 5 – Diferentes tipos de EMT.....p. 36

RESULTADOS

Figuras e tabelas organizadas conforme o artigo.

ANEXOS

Figura 6 – Delineamento experimental.....p. 88

Figura 7 – Distância ano-genital.....p. 90

Figura 8 – Esquema das peneiras utilizadas para isolar glomérulos.....p. 91

Figura 9 – Regiões utilizadas para RT-qPCR: córtex e córtex-medular.....p. 101

Tabela 1 – Itens contidos em 1 Kg da dieta.....p. 89

Tabela 2 – Genes alvos.....p. 96

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO.....	19
PROGRAMAÇÃO FETAL E RIM.....	27
PROGRAMAÇÃO FETAL E EPIGENÉTICA.....	29
MICRORNA E A TRANSIÇÃO EPITÉLIO MESENQUIMAL (EMT).....	32
JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	41
ARTIGO.....	43
CONCLUSÕES.....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
ANEXOS.....	86
METODOLOGIA DETALHADA.....	87
REGIÃO UTILIZADA PARA RT-qPCR.....	101

Introdução

Desnutrição é definida como resultado do déficit (proteínas, vitaminas e minerais) ou também excesso alimentar (hidratos de carbono e proteínas de baixo valor biológico) na dieta. Portanto, a desnutrição não se caracteriza apenas pela ingestão insuficiente de nutrientes, mas engloba também a alimentação desbalanceada e excessiva, o que pode resultar na carência de alguns nutrientes específicos, tais como proteínas, lipídeos e carboidratos (ESCODA, 2001; VALENTE 2003).

A desnutrição ainda é um grande problema de saúde pública mundial (MARTINS, 2011). O número de pessoas desnutridas no mundo, em 2010, foi estimado em 925 milhões de pessoas, esse número representa quase 16% da população dos países em desenvolvimento (FAO, 2010).

O desenvolvimento embrionário é altamente sensível a perturbações no ambiente materno. Assim, estímulos ambientais adversos podem alterar os processos de proliferação e diferenciação celular, levando a alterações nas vias do desenvolvimento normal para maturação de órgãos e tecidos (LANGLEY-EVANS & MCMULLEN, 2010). Conforme mostrado na figura 1, existem inúmeros sinais ambientais que possuem a capacidade de alterar os processos de desenvolvimento que podem ser fatores nutricionais (MCMILLEN & ROBINSON, 2005), estressores psicológicos ou fisiológicos (LAZINSKI et al, 2008) e desequilíbrios na sinalização endócrina normal entre mãe e feto (SECKL, 2004).

O ambiente adverso durante a vida embrionária e/ou na infância está relacionado com o risco de desenvolver doença na vida adulta (BARKER, 2004). Esse processo é denominado programação fetal, no qual o ambiente encontrado antes do nascimento ou na infância molda o controle, em longo

prazo, da fisiologia dos tecidos e da homeostase corporal (LANGLEY-EVANS, 2004). Essa hipótese foi proposta como mecanismo de associação entre o baixo peso ao nascer, o crescimento infantil e as doenças subsequentes, e descreve o processo pelo qual um estímulo ou injúria durante os períodos críticos de desenvolvimento podem alterar permanentemente estruturas e funções teciduais (LUCAS, 1991).

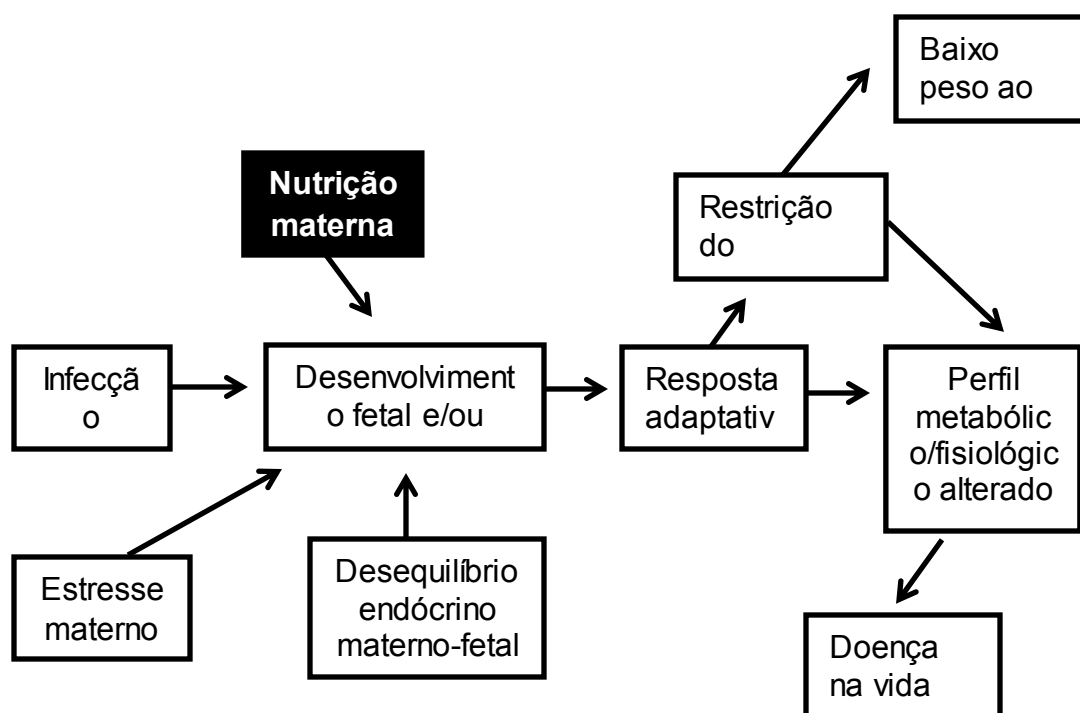


Figura 1: O ambiente materno adverso provoca respostas adaptativas no feto e uma das respostas é o menor crescimento que resulta em baixo peso ao nascer. Adaptada de Langley-Evans, 2009.

As primeiras evidências de programação fetal datam de 1964, quando Rose notou alto risco de isquemia cardíaca em indivíduos cujos irmãos foram abortados ou morreram na infância. Forsdahl, em 1967, percebeu que regiões da Noruega com alto índice de mortalidade infantil apresentavam também índices elevados de morte por doenças cardiovasculares. A década de 1980 é

rica em estudos associando mortalidade por fatores cardiovasculares e eventos ocorridos na primeira fase da infância.

Em 1989 Barker, através da observação da relação inversa entre peso ao nascer e doenças coronarianas, elaborou a “hipótese de Barker” propondo que qualquer estímulo ou injúria durante o período gestacional e/ou nas primeiras fases da infância pode acarretar doenças nos indivíduos na fase adulta, levando Barker a interpretar o ambiente embriofetal como novo componente na etiologia das doenças cardiovasculares (BARKER et al, 1989).

No entanto, o termo programação fetal, foi usado pela primeira vez em 1991, por Alan Lucas, que define programação como “a resposta permanente de um organismo a um estímulo ou insulto durante um período crítico do desenvolvimento”. O ambiente intrauterino pode ser considerado um fator-chave para a etiologia de doenças cardiovasculares na vida adulta, e estudos indicam que não apenas condições sociais precárias atuam como estímulo adverso durante a infância e a adolescência, mas também condições onde há alto consumo de gordura pela mãe, sendo que ambas situações aumentam o risco de desenvolver doenças cardiovasculares (FORSDAHL, 2002).

As alterações moleculares e fisiológicas resultantes do desequilíbrio nutricional materno permitem a sobrevivência da prole, embora seus efeitos, em longo prazo, promovam alterações na estrutura cardiovascular, renal, respiratória, endócrina e em componentes do sistema nervoso central (BARKER, 1995; FOWDEN et al, 2006). Através de estudos epidemiológicos Barker (1997) demonstrou que fetos humanos se adaptam a quantidade limitada de nutriente a qual estão submetidos, e alteram permanentemente sua

fisiologia e metabolismo, resultando em doenças cardíacas, diabetes e hipertensão.

Essa adaptação é explicada pela “Hipótese do Fenótipo Pougador” (Thrifty Phenotype Hypothesis), que foi proposta por Hales e Barker (1992), inicialmente para explicar a resistência à insulina, posteriormente para propor que a exposição fetal à desnutrição resulta na adaptação metabólica, que estimula a utilização eficiente dos nutrientes escassos. Esta adaptação tem como objetivo melhorar a sobrevivência sob condições de privação nutricional (HALES & BARKER, 2001). Se o indivíduo permanecesse com escassez de nutrientes, na vida pós-natal, não haveria problema, entretanto, quando o indivíduo passa a ter quantidade normal de nutrientes, que para ele já é um excesso, surgem as dificuldades, como por exemplo predisposição a obesidade precoce e síndrome metabólica, já que o indivíduo é mal adaptado para tais condições (LAU & ROGERS, 2004).

O modelo de restrição proteica já é bem descrito na literatura, e sabe-se que o desequilíbrio no fornecimento de nutrientes para o feto, através da manipulação nutricional sobre a dieta materna, pode ter efeito sobre o desenvolvimento da hipertensão na idade adulta. Woodall et al (1996) demonstraram que a restrição no consumo alimentar em ratas prenhes ou em lactação prejudica o crescimento fetal e neonatal. Assim ratos expostos à restrição proteica no período fetal ou durante a lactação desenvolverão pressão arterial elevada na vida adulta (LANGLEY-EVANS et al, 1994; LANGLEY-EVANS & JACKSON, 1995; LANGLEY-EVANS et al, 1996a; LANGLEY-EVANS et al, 1996d). Estes animais têm progressão acelerada para à insuficiência renal (NWAGWU et al, 2000).

Quando fatores nutricionais limitam o crescimento precoce, há forte tendência de recuperação do déficit de crescimento, uma vez que o estado nutricional melhora. Esse crescimento “catch-up” pode estar relacionado com doenças programadas em humanos (LANGLEY-EVANS & MCMULLEN, 2010). Estudos com homens e mulheres nascidos na Finlândia, na primeira metade do século 20, mostraram que o risco de desenvolver diabetes tipo 2 foi maior naqueles indivíduos que nasceram menores, mas que ganharam peso mais rapidamente durante a infância (FÓRSEN, 1997).

A evidência mais contundente para apoiar a ligação entre a nutrição materna e doenças na idade adulta, vem de estudos com descendentes de um período da 2ª Guerra Mundial, conhecido como Fome Holandesa. Um bloqueio nazista da parte ocidental da Holanda resultou em fome generalizada por um período de seis meses. Indivíduos que estavam no útero no momento da fome, posteriormente apresentaram maior risco de obesidade e intolerância à glicose, do que os nascidos antes e depois da fome. O risco para desenvolvimento de hipertensão, doença coronária e disfunção renal foi aumentado pela exposição à desnutrição materna (RAVELLI, et al, 1976; ROSEBOOM, et al, 2001; PAINTER et al, 2005).

Como a placenta, interface materno-fetal e reguladora do crescimento, desempenha papel crítico na transmissão de sinais do compartimento materno para o feto, as respostas placentárias frente a mudanças na nutrição materna, como restrição proteica, vem recebendo maior atenção (PERRY et al, 1999; DOHERTY et al, 2003).

As perturbações que ocorrem no compartimento materno têm sido associadas com a programação fetal, e podem afetar um ou vários aspectos da

estrutura e função placentária, isso pode ser o “link” direto pelo qual o ambiente intra-uterino alterado pode desencadear respostas adaptativas no feto (JANSSON & POWELL, 2007). Além da troca de nutrientes, gases e resíduos entre mãe e feto a placenta têm papel crítico na regulação do desenvolvimento fetal e distribuição de nutrientes (GODFREY, 2002).

A principal hipótese para explicar a programação fetal é a da superexposição do feto aos glicocorticóides (EDWARDS et al, 1993). Os glicocorticóides são sintetizados no córtex da adrenal (SECKL et al, 2000) , em mamíferos, e são essenciais para maturação e crescimento normal de órgãos fetais (COLE et al, 1995).

Entretanto, a superexposição do feto aos glicocorticóides maternos leva a restrição do crescimento intra-uterino (IUGR) (SECKL, 1994 e 2001). (FIGURA 2). Várias características da superexposição fetal a glicocorticóides sugerem que esta tem papel plausível na gênese da programação de desordens cardiovasculares e metabólicas (SECKL et al, 2000). Em um experimento, onde ratas prenhes foram tratadas com baixas doses de dexametasona (um glicocorticóide sintético usado na prática da obstetrícia), a prole apresentou redução do peso ao nascimento, elevação da pressão arterial sanguínea na prole adulta, além do risco aumentado de desenvolver doenças renais (BENEDIKTSSON et al, 1993; DODIC et al, 2002).

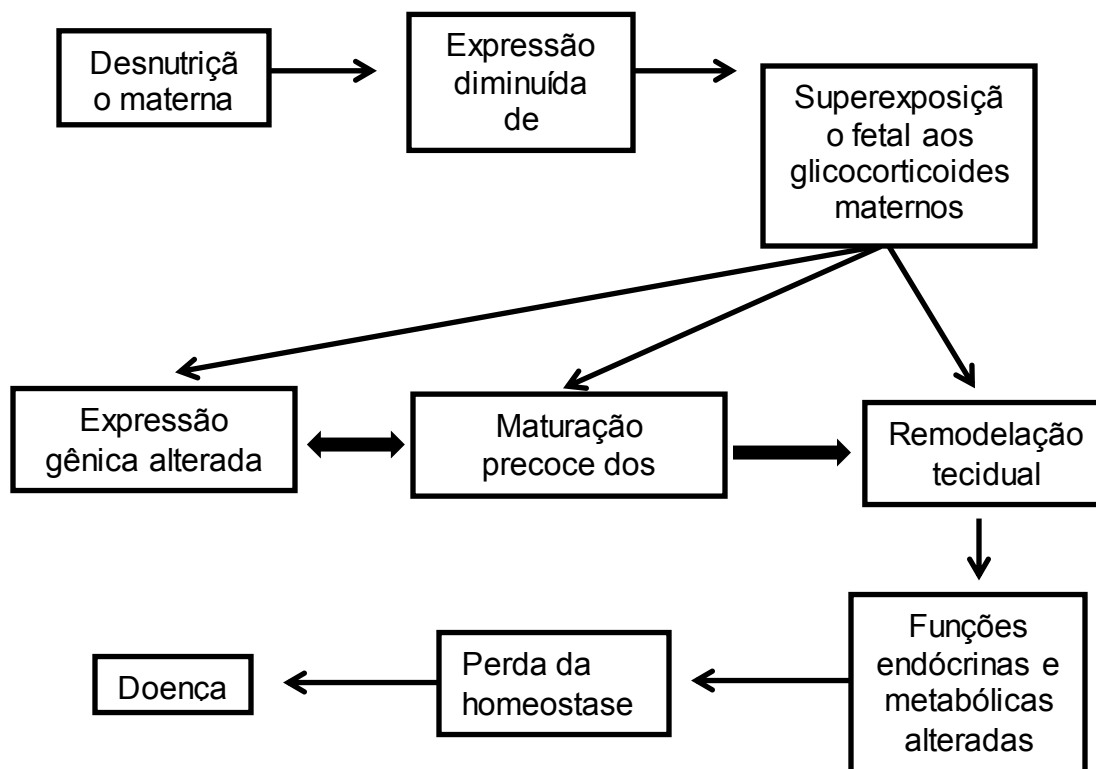


Figura 2: A superexposição fetal a glicocorticóides maternos tem um papel central na programação nutricional. A expressão reduzida da enzima 11β HSD2 pode provocar alterações morfo-funcionais. Adaptado de Langley-Evans, 2009.

Os receptores de glicocorticóides são altamente expressos em quase todos – senão todos – os tecidos fetais a partir do meio da gestação ou mais cedo (DIAZ et al, 1998; COLE et al, 1995), assim como na placenta e nas membranas fetais. Embora os glicocorticóides sejam em sua maioria lipofílicos e rapidamente atravessem a placenta, normalmente o feto tem níveis muito menores de glicocorticóides fisiológicos do que sua progenitora (BEITENS et al, 1973; CAMPBELL e MURPHY, 1977). Essa diferença é garantida pela enzima 11β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2 (11β -HSD2), que catalisa o rápido metabolismo do cortisol e da corticosterona para inativá-las nas formas 11-keto (cortisona e 11-desidroxicorticosterona, respectivamente) (MURPHY et al, 1974; BERNAL et al, 1980).

Essa barreira enzimática placentária garante que a maioria, mas nem todos, os glicocorticoides maternos sejam inativados, de forma que o cortisol fetal circulante seja, em teoria, apenas aquele derivado das adrenais do feto (BENEDIKTSSON et al, 1997). A dieta com baixa proteína durante a prenhez reduz tanto a atividade quanto a expressão do mRNA dessa enzima placentária (LANGLEY-EVANS et al, 1996c; BERTRAM et al, 2001). Portanto nos modelos de restrição proteica gestacional a deficiência relativa de 11β -HSD2 placentária, permite o acesso do feto aos glicocorticoides maternos, promovendo retardo no crescimento da prole, uma possível resposta de programação relacionada a doenças posteriores (EDWARDS et al, 2005).

PROGRAMAÇÃO FETAL E RIM

O rim é um órgão relativamente pequeno, mas muito importante devido a suas funções em vários processos fisiológicos como regulação da pressão arterial, manutenção do equilíbrio ácido-base e eletrolítico, além da filtração do sangue para remover resíduos (KATO et al, 2012). Portanto, este órgão está diretamente relacionado com o desenvolvimento de hipertensão devido a sua função no equilíbrio hidro-eletrolítico e conseqüentemente na homeostase de fluidos. Isso é claramente demonstrado em transplantes renais cruzados onde, se o doador é hipertenso o receptor torna-se hipertenso (RETTIG et al, 1990; GUIDI et al, 1996).

Os rins são órgãos com o formato de feijão, cada um é cercado por uma cápsula fibrosa e transparente. São formados por duas regiões fundamentais, o córtex renal e a medula. O néfron é a unidade funcional do rim e cada néfron

consiste de um tufo de capilar (os glomérulos) rodeado pela cápsula glomerular (Bowman's) e um túbulo. Os glomérulos estão localizados no córtex e são os primeiros locais de filtração. Os podócitos ou células epiteliais viscerais envolvem os capilares glomerulares e desempenham um papel crítico na regulação da filtração (KATO et al, 2012).

Zeman (1967, 1968) foi o primeiro a relatar que a prole de ratas que sofreram restrição protéica (6% de caseína) durante a gestação apresentava menor número de glomérulos quando comparada a prole das ratas que receberam dieta normal (24% de caseína) e, provavelmente as funções glomerulares e tubulares serão afetadas. A nefrogênese requer um equilíbrio altamente preciso de diversos fatores que podem ser alterados pela restrição no crescimento intra-uterino, levando a diminuição no número de néfrons (SCHREUDER et al, 2006).

Nosso grupo verificou que além de redução do número de néfrons, em ratos de 16 semanas de vida cujas mães receberam dieta hipoproteica (6%) durante a gestação, a expressão dos receptores tipo 1 e 2 (AT1R e AT2R, respectivamente) de angiotensina II e das proteínas envolvidas na sua via de sinalização é reduzida (MESQUITA et al, 2010).

Verificamos ainda que embora estes animais apresentem o número de néfrons reduzido, a filtração glomerular não é alterada, entretanto, estes animais apresentaram proteinúria associada a simplificação podocitária o que demonstra sobrecarga funcional glomerular. Esta sobrecarga acarretará senescência precoce podocitária e perda de néfrons agravando o quadro hipertensivo e podendo gerar outras patologias renais (MESQUITA et al, 2010).

A falta de nutrientes e/ou falta ou excesso de sinais chave durante estágios do desenvolvimento podem ter consequências irreversíveis (LANGLEY-EVANS, 2006). Portanto, a mudança do número de células ou do tipo celular presente em um tecido, no caso do rim, por exemplo, além de alterar a sua função, pode alterar o perfil de expressão gênica, as vias de sinalização, a produção de hormônios, a capacidade das células em responderem aos sinais hormonais, por exemplo, alterando a expressão de receptores como o de glicocorticóide (BERTRAM et al, 2001).

Essas alterações morfológicas e funcionais podem contribuir para o desenvolvimento de proteinúria e perda da função renal, apesar de não alterarem a taxa de filtração glomerular (MESQUITA et al, 2010). A sobrecarga funcional pode desencadear acúmulo de matriz extracelular (ECM) no mesângio glomerular e no interstício tubular, resultando em excesso de “cicatrização” renal e declínio da função excretória (MOGENSEN, 1976; VIBERTI et al, 1979; JONES et al, 1979; PARVING et al, 1981).

PROGRAMAÇÃO FETAL E EPIGENÉTICA

Como já citado, os efeitos da programação fetal nem sempre se limitam a alterações morfológicas e as consequências adversas do ambiente intra-uterino alterado podem não estar limitadas a primeira geração, sendo transmitidas ao longo das gerações subsequentes (DRAKE & WALKER, 2004; ZAMBRANO et al, 2005; BURDGE et al, 2007). O mecanismo pelo qual a restrição materna de nutrientes pode levar a alterações em longo prazo na expressão gênica da prole é a regulação epigenética (WATERLAND, 2009).

Epigenética é definida como mudanças herdáveis na expressão gênica sem alteração na sequência de DNA (EGGER et al, 2004). Os processos epigenéticos são essenciais na determinação de quando e onde genes específicos serão expressos, sendo que alterações na regulação epigenética dos genes pode levar a profundas alterações fenotípicas. Os principais processos epigenéticos são: metilação do DNA, modificações nas histonas e microRNAs (miRNAs). Dentre estes o processo mais estudado e, portanto mais conhecido é a metilação do DNA. Um grupo de pesquisadores do Texas vem desenvolvendo estudos focando o papel da metilação do DNA como mecanismo potencial na programação fetal (WATERLAND, 2009).

Segundo Kim (2009), existe pelo menos três classes de pequenos RNAs, que são codificados em nosso genoma, essa classificação é feita de acordo com seu mecanismo biogênico e com o tipo de proteína Argonauta (Ago) a qual eles estão associados. As classes são denominadas: miRNAs, RNA de interferência (endo-siRNAs) e RNAs de interação Piwi (piRNAs).

As funções dos pequenos RNAs variam desde a formação de heterocromatina para desestabilização do mRNA e controle da tradução (CHU & RANA, 2007; FILIPOWICZ et al, 2008), até a participação em quase todos os processos biológicos, incluindo diferenciação, proliferação e morte celular, controle metabólico, silenciamento de transposons e defesa antiviral (KIM et al, 2009).

Estudos sugerem que os fatores ambientais, incluindo nutrição e exposição aumentada a glicocorticoides, podem influenciar a expressão gênica e afetar potencialmente o crescimento fetal e o risco de doenças tardiamente (THOMASSIN et al, 2001; WATERLAND & JIRTLE, 2003 e 2004; WEAVER et

al, 2002). Quando essas modificações epigenéticas não são “apagadas” durante a gametogênese e embriogênese, esses “efeitos programados” são transmitidos por herança transgeracional (REIK et al, 2003).

miRNAs são RNAs de fita simples com aproximadamente 22 nucleotídeos de comprimento, que são gerados a partir de transcritos endógenos “hairpin” (KIM, 2005). Lee em 1993, descobriu os miRNAs em um nematóide (*Caenorhabditis elegans*). A descoberta e caracterização dos miRNAs está revolucionando a compreensão da regulação gênica, diferenciação celular, proliferação, apoptose, metabolismo e fisiopatologia de muitas doenças, incluindo as doenças renais (LI et al, 2010).

Estes RNAs não codificantes, são transcritos no núcleo como um miRNA primário, clivados em pré-miRNA pela Drosha, uma RNase III, e um cofator chamado DGCR8 (LEE et al, 2003; LEE et al, 2004; HAN et al, 2004; GREGORY et al, 2004). Os pré-miRNAs são transportados do núcleo para o citoplasma, pela Exportina-5. Uma vez no citoplasma, são clivados em sua forma madura com 20-22 nucleotídeos pela Dicer, outra RNase III (YI, 2003; HUTVÁGNER, 2001). Depois de clivado, o miRNA duplex é desenrolado e a fita funcional é carregada pelo complexo RISC. O miRNA maduro guia o complexo RISC para uma sequência complementar, geralmente na região 3' (UTR) de um alvo de mRNA (DU & ZAMORE, 2005). Esta ligação reduz o nível de expressão da proteína alvo via inibição ou degradação do mRNA (LIANG et al, 2009) (FIGURA 3).

Cada miRNA pode regular a tradução de um grande número de diferentes mRNAs e cada mRNA pode ter múltiplos sítios de ligação para um único ou muitos miRNAs diferentes, isso porque a especificidade do miRNA é

determinada, principalmente, por pareamento de bases (Watson e Crick) na região 5' do miRNA (BENTWICH et al, 2005). Atualmente, mais de 20.000 miRNAs de 115 espécies estão registrados no banco de dados miRBase (miRBase v. 18.0); são conhecidos 1527 seqüências precursoras de miRNAs no genoma humano.

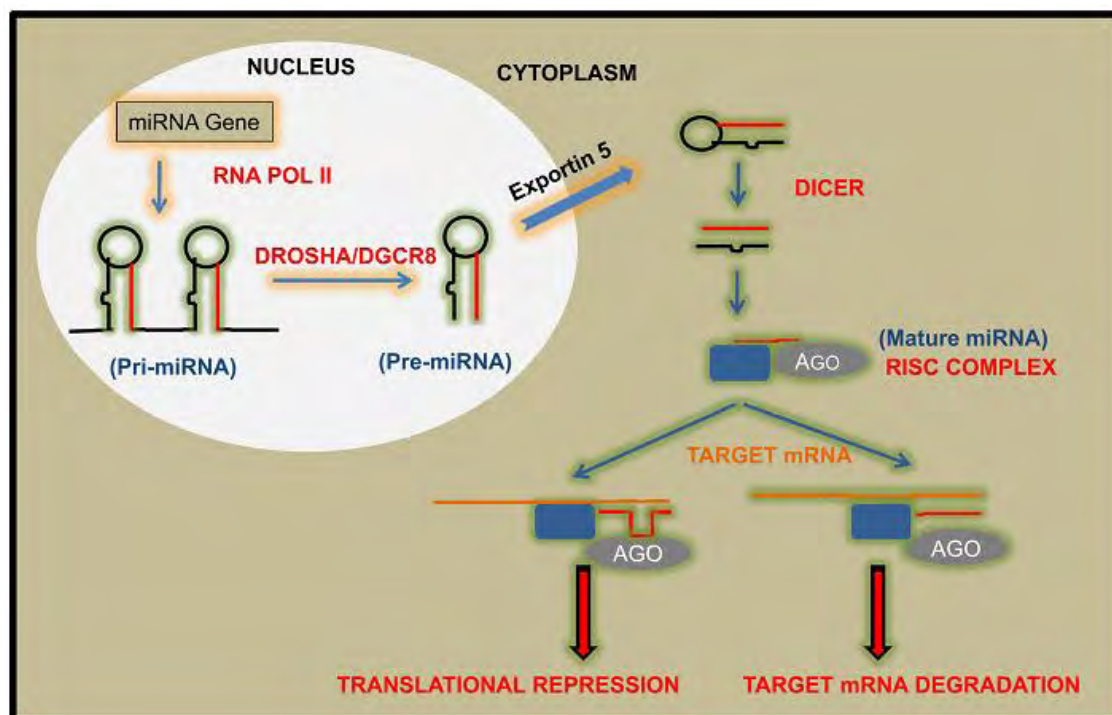


Figura 3: Biogênese do microRNA. Extraída de Bhatt, 2011.

MICRORNA E A TRANSIÇÃO EPITÉLIO MESENQUIMAL (EMT)

Embora a bioquímica e a fisiologia da função renal tenham sido bem estabelecidas a longo tempo, apenas recentemente é que se tornou evidente o envolvimento de miRNAs na regulação renal. Agora é claro que os miRNAs constituem parte vital na cascata de regulação do desenvolvimento e

manutenção da função renal bem como na progressão de nefropatias (HARVEY et al, 2008; HO & MARSDEN, 2008).

Todas as células do nosso corpo são derivadas de uma única célula, e os diferentes fenótipos existentes são resultado da expressão específica de um transcriptoma definido que facilita ainda mais a diversidade funcional. Durante décadas, foi proposto que o epitélio precisaria de um estágio terminal de diferenciação para executar suas funções e que, uma vez que esse estágio fosse atingido, estaria protegido de futuras alterações fenotípicas. Entretanto isso foi baseado em conjecturas sem evidência experimental e por isso vem sendo desafiado, por observações de que o epitélio diferenciado pode mudar seu fenótipo sob influência de estresse, por exemplo (BOYER et al, 2000; NIETO, 2002; TSAI et al, 2002).

A EMT é um processo biológico que permite que uma célula epitelial polarizada, sofra inúmeras modificações bioquímicas, assumindo fenótipo de célula mesenquimal, passando a ter maior capacidade migratória, invasiva, resistência à apoptose e produção de componentes da MEC (KALLURI & NEILSON, 2003). A transição é caracterizada pela perda celular de proteínas epiteliais como E-caderina, zônula de oclusão-1 (ZO-1) e citoqueratina, e aquisição de novos marcadores mesênquimais incluindo vimentina, α -SMA (α -smooth muscle actin), FSP1 (fibroblast-specific protein-1). Com isso há produção de componentes da matriz intersticial, como colágeno tipo I, e fibronectina (LIU, 2004; STRUTZ, 2009).

A EMT é classificada em três diferentes subtipos, baseando-se no contexto biológico em que ocorre. O tipo I está associado com a implantação, embriogênese e desenvolvimento do órgão – as células mesenquimais

possuem duas características chave que são importantes no desenvolvimento embrionário: elas são capazes de migrar através de uma matriz extracelular e subsequentemente se diferenciar em muitos tipos celulares diferentes da linhagem mesenquimal, incluindo fibroblasto (FRAGIADAKI & MASON, 2011); o tipo II está relacionado com a regeneração tecidual e fibrose e o tipo III ocorre em células neoplásicas (KALLURI & WEINBERG, 2009; ZEISBERG & NEILSON, 2009) (FIGURA 4 e 5).

Em nosso trabalho trataremos sobre a EMT do tipo II, que está associada com inúmeras mudanças na expressão de proteínas (ZEISBERG & NEILSON, 2009) que afetarão os componentes das junções intercelulares, as moléculas envolvidas na interação célula-ECM, os componentes do citoesqueleto e reguladores transcricionais (QUAGGIN & KAPUS, 2011). Dentre as alterações juncionais temos: 1) perda de componentes das junções de adesão epiteliais, como E-caderina; 2) redução na expressão de constituintes da junção "tight", como a ZO-1, ocludina e várias claudinas (FAN et al, 1999; YANG & LIU, 2001; MASSZI et al, 2003; MEDICI et al, 2006; POLLACK et al, 2007); e 3) aumento na expressão de proteínas de junção mesenquimal como N-ou OB-caderina (STRUTZ et al, 2002; HUANG et al, 2009). Mudanças relacionadas aos componentes da ECM englobam a superexpressão de algumas proteínas da matriz (por exemplo, fibronectina e colágeno I), enquanto que mudanças nos elementos do citoesqueleto incluem a expressão diminuída de citoqueratina e expressão aumentada de vimentina, juntamente com a expressão de FSP1 e ocasionalmente de SMA. Juntamente com estes eventos, citados acima, uma grande variedade de ativadores ou

repressores transcricionais são utilizados para gerar as alterações características que ocorrem durante EMT (QUAGGIN & KAPUS, 2011).

Strutz et al (1995) foram os primeiros a demonstrar a presença de EMT em fibrose renal, utilizando a proteína Fsp1 como marcador em um modelo de doença anti-membrana basal tubular (TBM), e notaram que as células epiteliais tubulares podem expressar FSP1, que é normalmente expresso em fibroblastos e não no epitélio. Dessa forma postularam que a EMT pode servir como um novo caminho para a produção de fibroblastos na fibrose renal. Já que no rim normal, os túbulos renais, são compostos por células epiteliais sobre a membrana basal tubular, que estão circundados por uma pequena quantidade de tecido intersticial, composto de uma MEC na qual, ocasionalmente, residem fibroblastos (NEILSON, 2006).

Em 1998, um grupo de pesquisadores encontrou evidências morfológicas e fenotípicas para a existência da EMT em rins remanescentes após 5/6 de nefrectomia. Após três semanas da nefrectomia, foi detectada a expressão de α -SMA (α -smooth muscle actin) bem como de filamentos de actina no epitélio tubular. Com a progressão da doença, as células epiteliais tubulares perdem sua polaridade apical-basal e tornam-se alongadas migrando para o interstício peritubular através da membrana basal tubular danificada (NG et al, 1998).

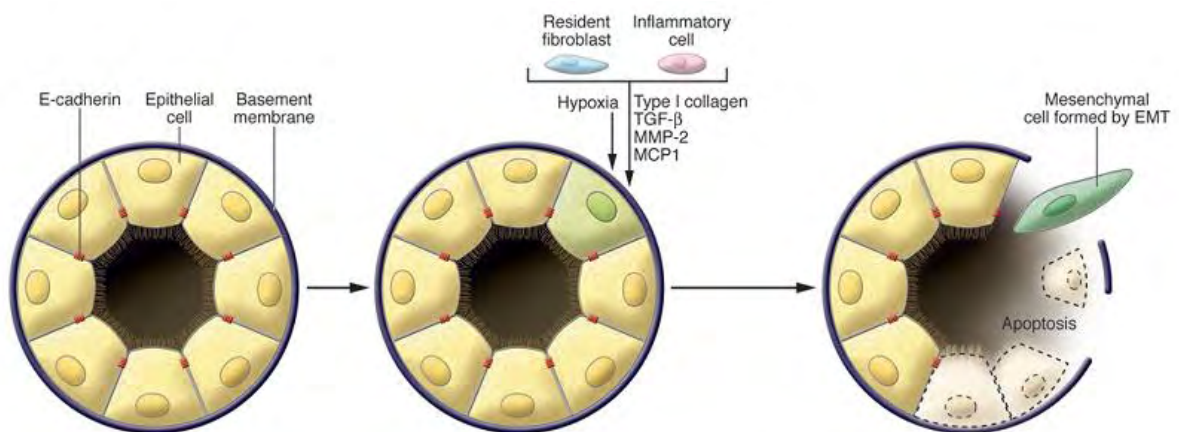


Figura 4: Transição Epitélio Mesênquimal (tipo II) e fibrose. (Figura extraída de Kalluri & Weinberg, 2009).

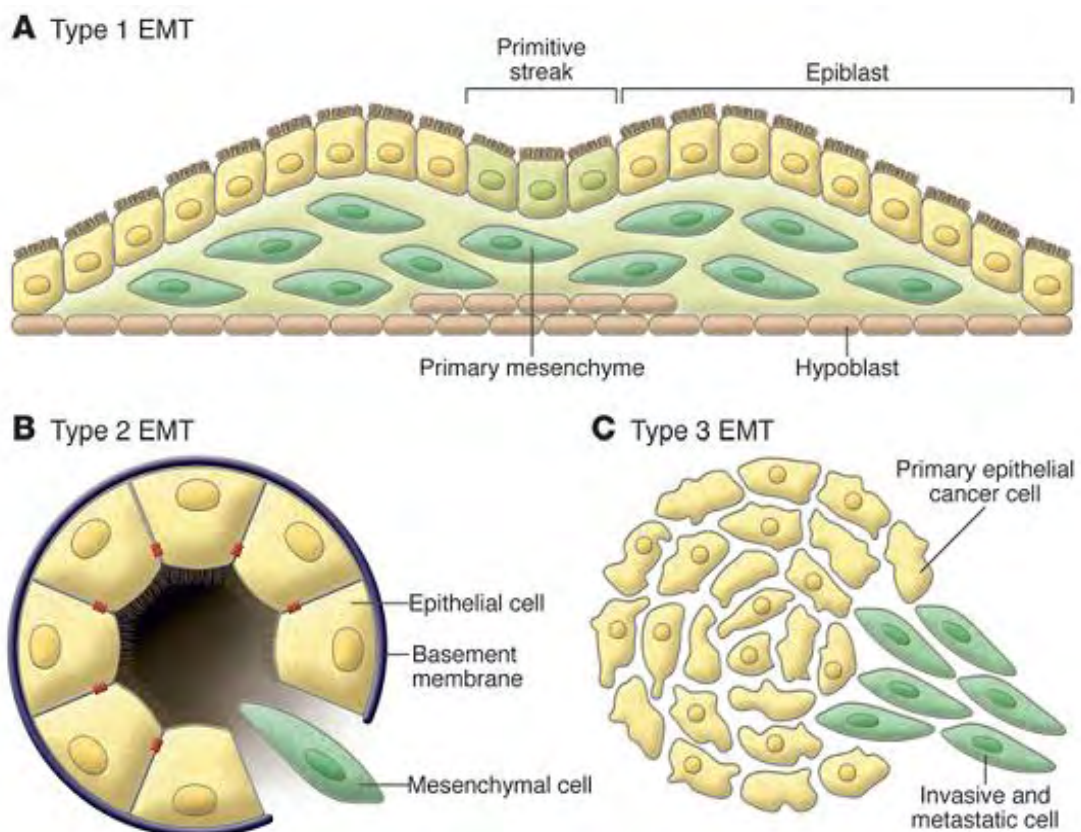


Figura 5: Diferentes tipos de EMT. A) Tipo I, está associado com a embriogênese e implantação. B) Tipo II, relaciona-se com a regeneração tecidual e fibrose. C) Tipo III, ocorre em células neoplásicas. (Figura extraída de Kalluri & Weinberg, 2009).

Cheng e Lovett (2003) demonstraram que a lesão inflamatória no rim de camundongo pode resultar no recrutamento de uma variedade de células que podem desencadear uma EMT através da liberação de fatores de crescimento como TGF- β , PDGF, EGF, FGF-2. No local da lesão se acumulam macrófagos e fibroblastos que liberam esses fatores de crescimento, além disso, essas liberam quimiocinas e metaloproteinases (MMPs). Células epiteliais sob a influência desses sinais moleculares e, agindo junto com as células inflamatórias, induzem danos à membrana basal pela degradação do colágeno tipo IV e da laminina. Estas alterações na expressão de proteínas são geralmente acompanhadas por mudanças morfológicas, pois as células passam a apresentar uma aparência fibroblástica e maior capacidade migratória (LIU, 2010). Esta transição está correlacionada ao declínio da função renal (RASTALDI et al, 2002; HERTIG et al, 2008).

Assim a fibrose renal é caracterizada pelo acúmulo de fibroblastos e proteínas da matriz extracelular, e juntamente com a perda da funcionalidade dos néfrons representam as principais características patológicas da doença renal crônica (EDDY & NEILSON, 2006).

A principal força motriz da EMT durante a fase fibrogênica da fibrose renal parece envolver vários fatores de crescimento profibróticos, incluindo TGF β (ZAVADIL & BOTTINGER, 2005; YANG & LIU, 2001). TGF- β 1 pertence a superfamília de proteínas TGF β , que são expressas em todos os tipos celulares de mamíferos (RUNYAN et al, 2009). TGF β 1 é o mais estudado, além de ser o mais potente indutor de EMT (ZAVADIL & BOTTINGER, 2005; WILLIS & BOROK, 2007), tendo a capacidade de iniciar e completar o curso inteiro do

processo de EMT (YANG & LIU, 2001). O TGF- β 1 é uma citocina pró-inflamatória e tem como função regular a proliferação celular, apoptose, resposta imune e inflamatória (LETTERIO & ROBERTS, 1998; ROBERTS, 1998).

Wang et al (2010) encontrou mudanças morfológicas induzidas pelo TGF- β , em células mesangiais de ratos, além de aumento da expressão de α SMA, vimentina e fibronectina. A morfologia dos podócitos também foi drasticamente alterada em células tratadas com TGF- β , que perderam a sua forma irregular e arborizada e tornando-se mais densas e alongadas.

O TGF- β reduz a expressão de ZEB1 e ZEB2, que são repressores do gene E-caderina, e induz a expressão do gene para colágeno tipo 1 (Col1 α 2). (SEKIDO et al, 1994; VERSCHUEREN et al, 1999; EGER et al, 2005; PONTICOS et al, 2004; MURRAY et al, 2000). Em condições basais, os repressores ZEB1/2 regulam negativamente a expressão Col 1 α 2, ligando-se a elementos E-box na região do promotor do Col 1 α 2 (KATO et al, 2007; YAMAMOTO et al, 1993; REEVES & ANDREOLI, 2000; PARK et al, 1997; ZIYADEH et al, 2000; ZHU et al, 2005; WANG et al, 2004; WEIGERT et al, 2004; KATO et al, 2010).

Sun et al (2004) demonstraram que os miRNAs: miR-192, miR-194, miR-204, miR-215 e miR-216, são altamente expressos no rim em relação a outros órgãos. Outros estudos demonstram que a transição epitélio-mesenquimal é regulada por miRNAs, especialmente os da família miR-200 e miR-205 (GREGORY et al, 2008a; PARK et al, 2008; KORPAL et al, 2008; BURK et al, 2008).

A família miR-200 é composta por cinco membros: miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 e miR-429, estes são divididos em dois grupos, de acordo com sua sequência *seed*, sendo um grupo formado pelos miRNAs miR-141 e miR-200a e o outro grupo composto pelos miRNAs miR-200b, miR-200c e miR-429 (KATO et al, 2011).

A expressão do miR-200a, miR-200b, miR-141, miR-429, miR-205 e miR-192 está significativamente aumentada em pacientes com nefroesclerose hipertensiva em relação aos controles, sendo que o grau de aumento está positivamente correlacionado com a severidade da doença (WANG et al, 2010).

Kato et al (2007) demonstraram que em células mesangiais, sob condições diabéticas, a expressão do miR-192 está aumentada, enquanto a expressão de Zeb1 e 2 está diminuída e a do col1 α 2 aumentada. Sugeriram que o TGF- β pode induzir a expressão de colágeno pela diminuição de Zeb 1/2, que é o mecanismo chave para a expressão aumentada do gene para colágeno. *In vitro*, miR-192 foi induzido por TGF- β e mediou a indução da expressão de colágeno em células mesangiais pela expressão diminuída de Zeb2.

Em outro estudo Kato et al (2009), mostraram que alguns membros da família miR-200 tem a expressão aumentada na presença de TGF- β em células mesangiais. Assim estes autores sugerem que, na patogênese de nefropatia diabética, o TGF- β induz o aumento da expressão do miR-192 e de alguns membros da família miR-200 que podem coordenar a expressão diminuída dos repressores E-box, Zeb1 e 2, aumentando a expressão do Col1 α 2 em células mesangiais.

Como o miR-192 tem se mostrado importante na glomeruloesclerose diabética, o grupo de Chung (2010) investigou se o miR-192 também é importante em casos de fibrose tubulointersticial no rim obstruído. Eles verificaram que o miR-192 estava altamente expresso, tanto em modelo de obstrução quanto em modelo de doença renal remanescente.

Em contraste, um estudo recente demonstrou que o TGF- β suprime a expressão do miR-192 em células epiteliais tubulares e a perda do miR-192 promove a fibrogênese em nefropatia diabética (KRUPA et al, 2010).

Os membros da família miR-200 inibem diretamente a expressão de ZEB1 e ZEB2, os dois principais fatores de transcrição repressores de E-caderina, que é o principal marcador de células epiteliais (GREGORY et al, 2008b; BRACKEN et al, 2008; PATERSON et al, 2008). Durante a EMT, quando os níveis de miR-200 se encontram diminuídos, a expressão de ZEB1 e ZEB2 se torna elevada (Kasinski & Slack, 2011).

Tem sido demonstrado que o miR-192, também reprime a expressão de ZEB2 e aumenta a síntese de colágeno $1\alpha 2$ pelas células mesangiais (KATO et al, 2007). De acordo com os trabalhos citados acima podemos concluir que os miRNAs exercem papel chave para o desenvolvimento de fibrose renal.

Justificativa e Objetivos

Sabendo-se que:

- a programação fetal por dieta hipoprotéica gestacional em ratos leva à redução no número de nefrons, hipertensão, proteinúria e alterações podocitárias;
- a sobrecarga funcional renal pode causar fibrose e/ou EMT e os miRNAs estão implicados nestes processos;
- os processos epigenéticos são essenciais na determinação de quando e onde genes específicos serão expressos podendo levar a profundas alterações fenotípicas;
- A programação fetal envolve mecanismos epigenéticos;
- A expressão de miRNAs pode diferir em glomérulos e rim total;
- A expressão de miRNAs no modelo de restrição proteica gestacional não está estabelecida.

Os objetivos deste trabalho são verificar em ratos programados pela restrição proteica *in útero*, comparativamente aos controles:

- a expressão e localização de proteínas envolvidas na fibrose e na EMT
- o perfil de expressão dos miRNAs da família miR-200 e miR-192 no rim total e glomérulos isolados em animais de 12 dias (quando termina a nefrogênese em ratos) e adultos da prole.
- a expressão de mRNAs alvos destes miRNAs e/ou marcadores de EMT

Artigo

Altered micro-RNAs renal expression involved in epithelial-to-mesenchymal transition in adult rats programmed by maternal low protein diet

Sene LB¹, Moraes LN², Garcia GJF², Gontijo JAR³, Carvalho R², Boer PA¹.

¹Fetal Programming Laboratory, Morphology Department, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil

²Laboratory of Striated muscle, Morphology Department, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, SP, Brazil

³Renal Function Laboratory, Campinas State University, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

Correspondence: Dra. Patrícia Aline Boer, Morphology Department, Biosciences Institute, São Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil. E-mail: boer@ibb.unesp.br

Financial Support: CAPES and FAPESP

ABSTRACT

The concept of the developmental origin of adult diseases, also called “fetal programming” has consequences related to kidney dysfunction and chronic hypertension. We have demonstrated previously, in a model of gestational protein restriction, reduction of nearly 27% of kidney nephron, proteinuria, and not altered glomerular filtration rate in adulthood in parallel with podocyte hypertrophy that may lead to accelerated cellular senescence, fibroses and additional nephron loss. How miR-200 family and miR-192 expression contribute to epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) that has been related to many forms of chronic kidney diseases the present study investigated the mRNA and protein expression of fibrosis and/or EMT markers in total renal tissue and isolated glomeruli of adult rats submitted to gestational protein restriction. 16 weeks-old LP rats presented significant increased immunoreactivity of TGF- β 1, fibronectin, and collagen type I in glomeruli and cortical peritubular matrix. In isolated glomeruli of LP the level of miR-200a, miR-141 and miR-429 are reduced and conversely, in total kidney the level of miR-200c, miR-141, miR-429 were significantly higher. ZEB2 mRNA was upregulated in glomeruli and in total renal tissue was ZEB1 that presented raised expression. Col I α 1/2 mRNA were upregulated but the other EMT markers studied are not altered. The fetal programmed rats presented adult glomerulosclerosis that led us to suggest that miR200 family and miR-192 are up-regulated in glomeruli by TGF- β 1 at early time points to induce type I collagen expression. This increase in collagen may subsequently induce glomeruli EMT by decreasing these miRNAs at later time points. Thus we suppose that miRNAs expression may be cell-type specific and context dependent with tubular response occurring later.

INTRODUCTION

Barker theory had proposed that any adverse event during intrauterine development induces response in the fetus that has altered phenotype that predisposes to hypertension and cardiovascular disease in later life (1). Thus, environmental as well as genetic factors can interfere with organ development leading to dysfunctional and/or structural effects in tissues and organs. Nutritional restriction can result in intrauterine growth retardation (IUGR), impaired nephrogenesis and nephron underdosing (2). Also, protein restriction has been most widely used to show how IUGR affects the cardiovascular system and the kidney (3-5).

Recently we found that offspring from mothers submitted to gestational low protein diet, at 16-wk-age, presented pronounced reduction of nephron number associated with decreased fractional urinary sodium excretion and hypertension when compared with the control age-matched group. These results occurred despite unchanged glomerular filtration rate and 17% enhanced glomerular tufts area, suggesting that prior tubular dysfunction with enhanced water and sodium reabsorption might, at last in part, be responsible by programming of adult hypertension. Conversely, these morpho-functional changes could be attributed to an adaptation caused by reduced nephron number and glomerular hyperfiltration/overflow that account for the glomerular filtration barrier breakdown and early development of glomerulosclerosis (2,6) in low protein diet offspring.

Transforming growth factor- β (TGF- β) is a key regulator of extracellular matrix (ECM) protein deposition in renal tissue (7). Podocyte increased expression of TGF- β mRNA and/or protein has been associated to focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) (8), membranous nephropathy (9,10) and diabetic

nephropathy (11). Renal TGF- β 1 expression is implicated in the pathogenesis of fibrosis in both glomerular and interstitial compartments (12,13).

TGF- β 1 inhibits the expression of the E-box repressors, ZEB1/2. Also, ZEB1/2 are now widely recognized E-box repressors of genes such as E-cadherin and collagens (14-18).

It is clear that the well-described phenomenon of EMT type II plays a pivotal role in organ fibrosis progression (19). EMT describes a phenotypic change induced in epithelial cells that lose their defined cell-cell-basement membrane contacts and their structural polarity to become spindle-shaped and morphologically similar to mesenchymal/myofibroblast cells (20-22).

A number of studies have implicated altered expression of several miRNAs with the phenotypic change that occurs during EMT, development of fibrosis (23-26.) and in progressive kidney disease (24).

MicroRNAs (miRNAs) have been implicated in progressive kidney disease (24). miRNAs are short (~22 nucleotides) noncoding RNAs that are important regulators of gene expression (27,28). miRNAs induce post-transcriptional gene repression by blocking protein translation via binding to the 3' untranslated region (UTR) of their target genes, or by inducing mRNA degradation, and therefore have the potential to play central roles in gene expression under physiological and pathological conditions.

Members of the miR200 family are markedly downregulated in TGF- β -induced EMT and act as protectors of the normal epithelial phenotype (25, 26, 29-32). miR-192 and miR-200 family members regulate ZEB1/2 in epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in cancer cells and other established cell lines as ZEB1/2 are also repressors of E-cadherin (25,29,31-34).

Despite changes in kidney physiologi and morphology in adult maternal Lp pffspring, the pattern of miRNAs expression in renal tissues is unknown.

Here we studied the differentially expressed miRNAs and markers of fibrosis and EMT in isolated glomeruli and total renal tissue of 16-wk old male rats offspring from maternal low protein diet compared with controls.

MATERIALS AND METHODS

Animals and diets

Experiments were approved by the ethical committee for experimental research at Institute of Biosciences (292-CEEA), São Paulo State University. Wistar female rats were fed either a normal-protein (NP-17% casein) or a low-protein (LP-8% casein) diet during all the gestation. During lactation the rats were fed a normal-protein diet. After bith, only male offspring were used. Males offspring were fed a normal-protein diet until the end of the experiment.

Groups were euthanized with 12 days and 16th week of age. Kidney tissues were collected for immunohistochemistry and real-time PCR analyses. Glomeruli were sieved from renal tissue as described (35).

Immunohistochemistry

Animals 16th week of age were perfused with saline containing heparin, followed by perfusion with 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) containing 4% paraformaldehyde. After the perfusion, kidneys were removed and placed in the same fixative for 2h, followed 70% alcohol until be processed. Were used five-micrometer paraffin kidney sections. Primary antibodies used were anti-collagen I (Sigma; 1:1000), anti-fibronectin (NovoCastra; 1:200) and anti-TGF- β 1 (Santa Cruz; 1:100). Sections were incubated with

the primary antibody overnight at 4°C. Secondary antibodies were used according to the primary antibody. Finally, sections were revealed with DAB, counterstained with Mayer's hematoxylin, dehydrated, and mounted. Images were obtained using the optical microscope.

Total RNA extraction

Total renal tissue and isolated glomeruli RNA were isolated using Trizol reagent (Invitrogen), according to the instructions specified by manufacturer. Total RNA quantity was determined by the absorbance at 260 nm using nanoVue spectrophotometer (GE healthcare, USA) and the RNA purity was assessed by the A 260nm/A 280nm and A 260nm/A 230nm ratios (acceptable when both ratios were > 1.8). RNA Integrity was ensured by obtaining a RNA Integrity Number - RIN > 8 with Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Germany).

Reverse Transcription of miRNA and mRNA

cDNA was synthesized using TaqMan[®] microRNA Reverse Transcription kit (Life Technologies, EUA), combined with Stem-loop RT Primers (Life Technologies, EUA), and High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Life Technologies, EUA) according the manufacturer's guidelines. For miRNA, 3 µl (10 ng) total RNA was mixed with specific primers (3 µl), dNTPs (100mM), MultiScribe[™] Reverse Transcriptase (50 µl), 10X RT Buffer, RNase inhibitor (20 µl) and made up to 4,5 µl with H₂O. The cycling conditions were: 16 °C for 2 min, 42°C for 1min, 50 °C for 1 seconds and 85 °C for 5 min. For mRNA, 10 µl total RNA was mixed with 4 µl Master Mix, 2 µl specific primers and made up to 20 µl with H₂O. The cycling conditions were: 25 °C for 5 min, 42 °C for 30 min, and 85 °C for 5 min.

Real-time quantitative PCR (miRNAs)

Each cDNA of miRNAs 200 family (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 and miR-429) and miR-192 were quantified by real-time quantitative PCR using ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Life Technologies, USA). Were used, for each reaction, 10 μ l TaqMan[®] Universal PCR Master Mix, 2 μ l TaqMan MicroRNA Assay Mix (Life Technologies, USA), 1,5 μ l cDNA and made up to 20 μ l reaction volume. The cycling conditions were: 95 °C for 10 minutes; 45 cycles of 95 °C for 15 seconds, and 60 °C for 1 minute.

Real-time quantitative PCR (mRNAs)

For the analysis of expression level of ZEB1, ZEB2, desmin, fibronectin, ZO-1, E-cadherin, TGF- β 1, col 1 α 1 and col 1 α 2, in renal cortex and glomeruli, RT-qPCR was carried out with SYBR green Master Mix, using specific primers for each gene (table 1). Reactions were set up in a total volume of 20 μ L using 5 μ l of cDNA (diluted 1:100), 10 μ L SYBR green Master Mix (Life Technologies, USA) and 2,5 μ L of each specific primer (5 nM) and performed in the ABI Prism 7300 real-time PCR system (Life Technologies, USA). The cycling conditions were: 95 °C for 10 minutes; 45 cycles of 95 °C for 15 seconds, and 60 °C for 1 minute.

Analysis of the expression

To analyze the differential expressions, the miRNA or mRNA levels obtained for each gene were compared Kidney group with respect to the CT group. Normalization of miRNA expression was made using the expression of the snRNA U6 and snRNA U87 reference genes (Accession: NR_004394 and AF272707, respectively), and for mRNA expression, the genes GAPDH, β -actin and TBP. Relative gene

expression was evaluated using the comparative quantification method (36). All relative quantifications was assessed using DataAssist software v 3.0, using the $\Delta\Delta CT$ method. PCR efficiencies calculated by linear regression from fluorescence increase in the exponential phase in the program LinRegPCR v 11.1 (37).

Table 1: Genes

GENES	SEQUENCE (Forward)	SEQUENCE (Reverse)
ZEB 1	5'-CATTTGATTGAGCACATGCG-3'	5'-AGCGGTGATTTCATGTGTTGAG-3'
ZEB 2	5'-CCCTTCTGCGACATAAA TACGA-3'	5'-TGTGATTTCATGTGCTGCGAGT-3'
DESMIN	5'-GCGTGACAACCTGATAGACG-3'	5'-GTTGGATTTCCCTCCTGTAGTTTG-3'
FIBRONECTIN	5'-AGACCCCAGGCACCTATCAC-3'	5'-TGGCCGTTTCAGGAAGGTTG-3'
TGFβ-1	5'-GGACTCTCCACCTGCAAGAC-3'	5'-GACTGGCGAGCCTTAGTTTG-3'
COL1α2	5'-ACAAGGTGCTCGTGGTTTCC -3'	5'-GCACCAGGCTGTCCTTTCAA -3'
E-CADHERIN	5'-ATGAGGTCGGTGCCCGTATT-3'	5'-CTCGTTGGTCTTGGGGTCTGT-3'
ZO-1	5'-GAGGCTTCAGAACGAGGCTATTT-3'	5'-CATGTCCGAGAGTAGAGGTTCTCA-3'
COL1α1	5'-ACCTGTGTGTTCCCCACTCA-3'	5'-CTTCTCCTTGGGGTTTGGGC-3'

Statistical Analyses

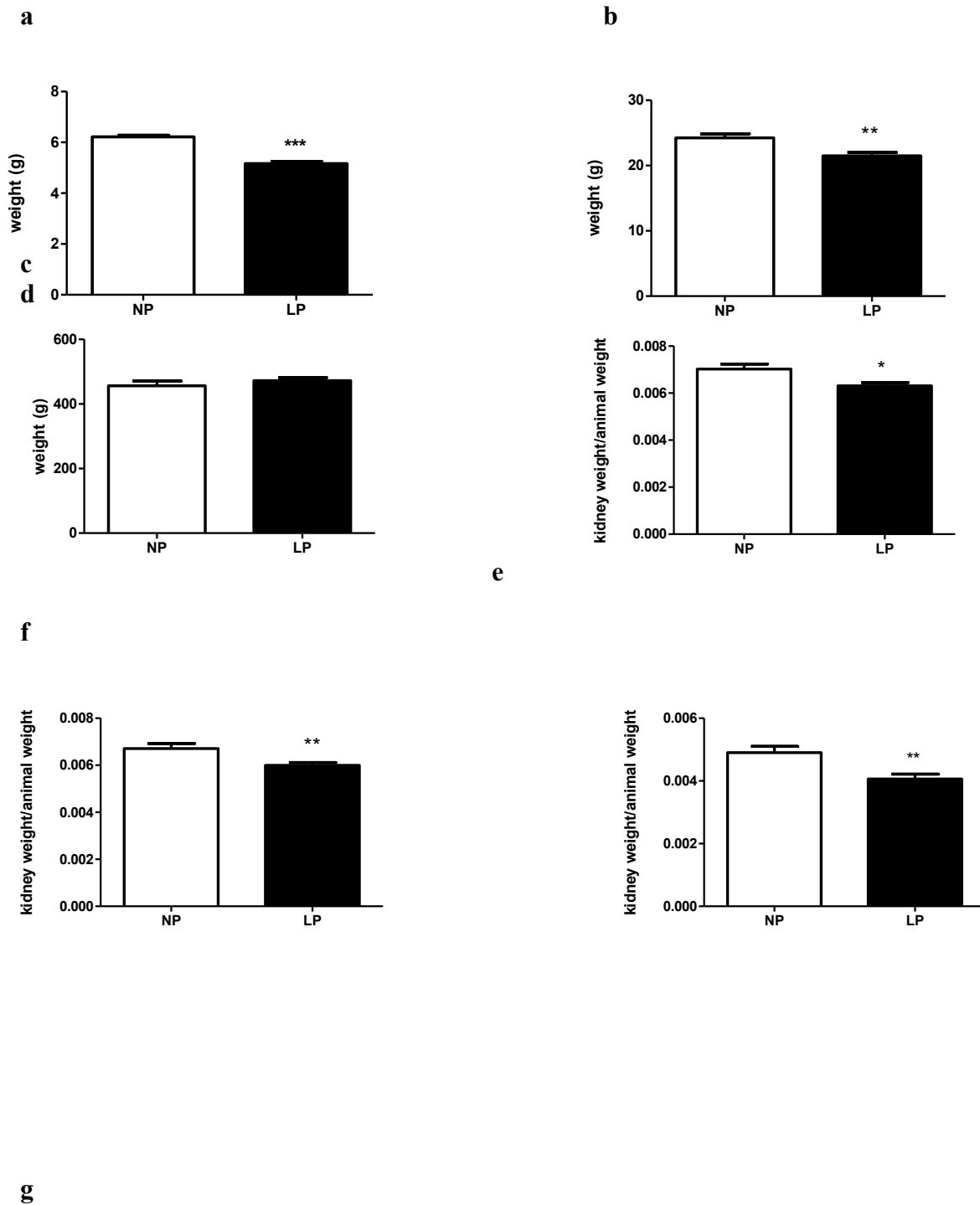
Data obtained from this study are expressed as the mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using Student *t*-test from GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc., USA). Significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Male offspring: Birth weight, with 12 days, and 16-week-age and kidney weight.

Birth weight in male offspring was significantly lower in group LP (Figure 1a). Male rats weight with 12 days of age, group LP, were significantly lower compared to

control group (Figure 1b). However at 16 weeks of life the animals showed no difference in weight between groups (Figure 1c). Both the right kidney weight and the left kidney weight of animals of group LP 12 days were significantly lower (Figure 1d, 1e). Right kidney weight was significantly lower in group LP (Figure 1f), compared to control, and however left kidney weight not different between groups (Figure 1g).



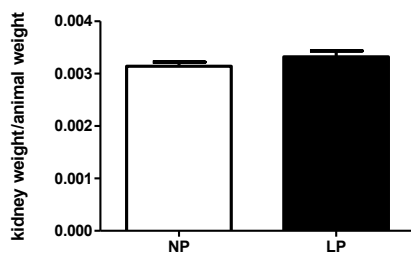


Figure 1: Male Offspring weight. (a) Birth weight (NP = 6.216 ± 0.06 , n = 32; LP = 5.163 ± 0.089 , n = 35; $p < 0.0001$). (b) Animals with 12 days (NP = 24.25 ± 0.6053 , n = 19; LP = 21.49 ± 0.5291 , n = 18; $p = 0.0017$). (c) Animals with 16th (NP = 456.1 ± 15.12 , n = 7; LP = 472.1 ± 9.85 , n = 7; $p = 0.3927$). (d) Right kidney weight of 12 days animals (NP = 0.007 ± 0.0002 , n = 12; LP = 0.0063 ± 0.00014 , n = 11; $p = 0.0128$). (e) Left kidney weight of 12 days animals (NP = 0.0067 ± 0.0002 , n = 12; LP = 0.006 ± 0.0001 , n = 11; $p = 0.0089$). (f) Right kidney weight of 16 weeks (NP = 0.0049 ± 0.0002 , n = 7; LP = 0.004 ± 0.0001 , n = 7; $p = 0.0057$). (g) Left kidney weight of 16 weeks (NP = 0.003 ± 0.00008 , n = 6; LP = 0.003 ± 0.0001 , n = 6; $p = 0.21$).

Immunolocalization of fibrosis markers.

By the immunohistochemistry analyze we observed in 90% of LP animals presented enhanced TGF- β 1 immunoreactivity, in nearly to 80% of the whole kidney area compared to unmarked control kidneys (Figures 2A, and 2B). Conversely, the medullar kidney zone present TGF- β 1 expression in control kidneys (Figure 2C) that was enhanced in LP group (Figure 2D).

The enhanced fibronectin expression was observed in LP rats in glomerular and peritubular stroma with predominance in the adventitia of blood vessels (Figure 3A), when compared to that observed in control (Figs 3A and B). The medullar expression is also enhanced in LP (Figure 3D), when compared to that observed in control (Figure 3C).

The collagen type I expression in the LP group showed a intensive immunostain in both perivascular adventitia and peritubular and glomerular ECM comparatively to

control group (Figures 4A, and B). The medullar expression also raised in LP comparatively to NP (Figures 4C, and D).

By more detailed investigation of glomeruli we verified an intensive rise in LP TGF- β 1 expression that can be localized in the basement membrane of parietal epithelium of Bowman capsule (Figure 5B). Although all glomerular tufts presented enhanced expression of this protein we can see more intensively localized in the glomerular basement membrane delimiting glomerular capillaryes (Fig 5B). Fibronectin expression is also more accentuated in LP glomeruli (Figure 5D). The type I coll expression, conversely to glomeruli from control rats (Figure 5E), is highly expressed in LP glomeruli (Figure 5F).

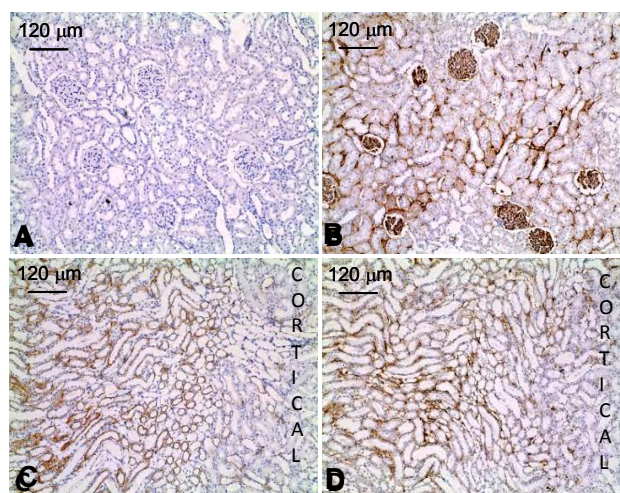


Figure 2: TGF- β 1 immunolocalization in NP cortex (A) and corticomedullar zone (C). Enhanced cortical (B) and corticomedullar (d) expression were found in LP kidneys.

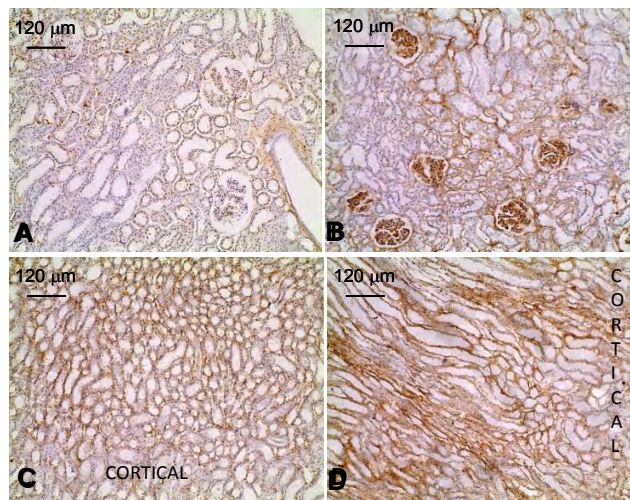


Figure 3: Fibronectin immunolocalization in NP cortex (A) and corticomedullar zone (C). Enhanced cortical (B) and corticomedullar (d) expression were found in LP kidneys.

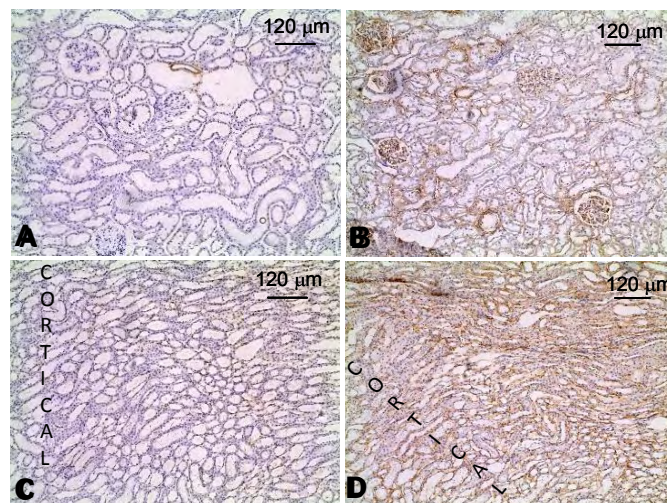


Figure 4: Collagen Type I immunolocalization in NP cortex (A) and corticomedullar zone (C). Enhanced cortical (B) and corticomedullar (d) expression were found in LP kidneys.

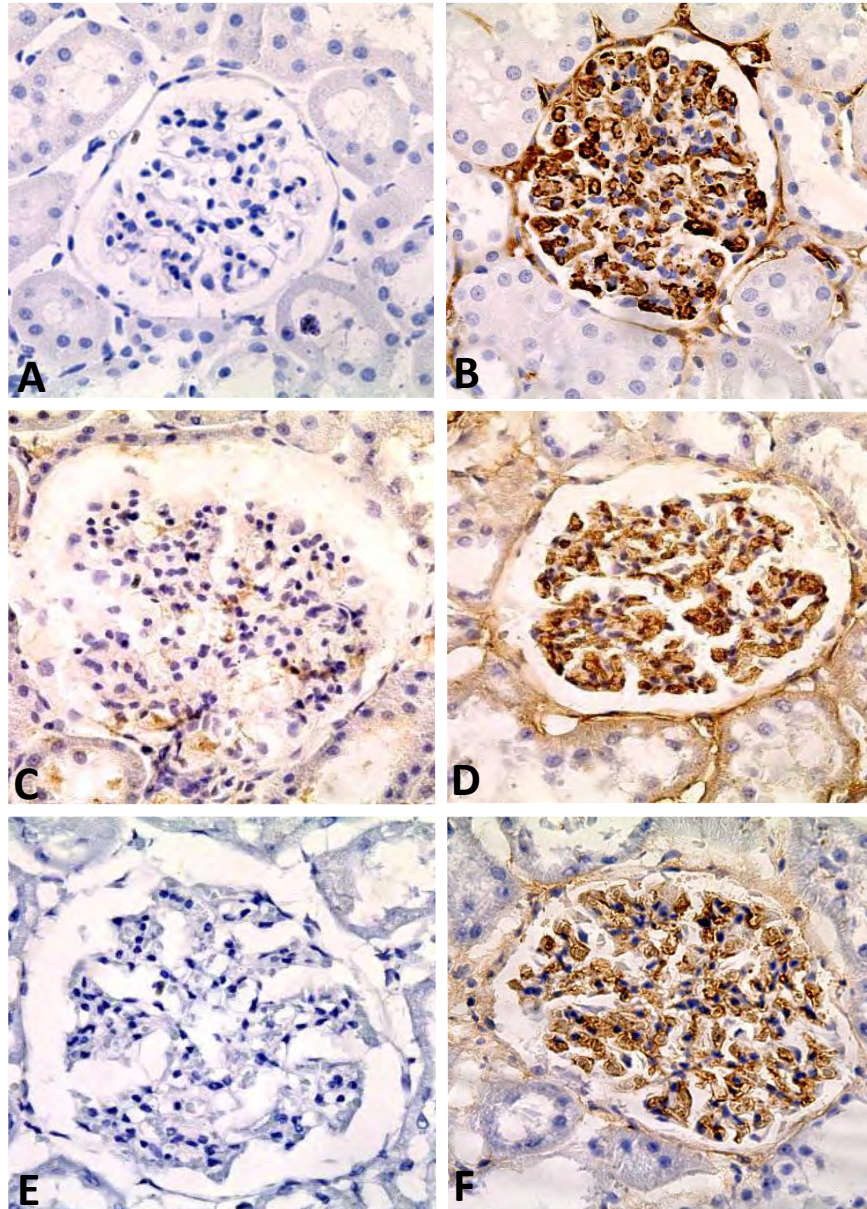


Figure 5: Detailed glomerular pattern of expression for TGF- β 1 (A and B), fibronectin (C and D) and Collagen type I (E and F). A, C and E shows glomeruli from NP rats and B, D and F from LP rats.

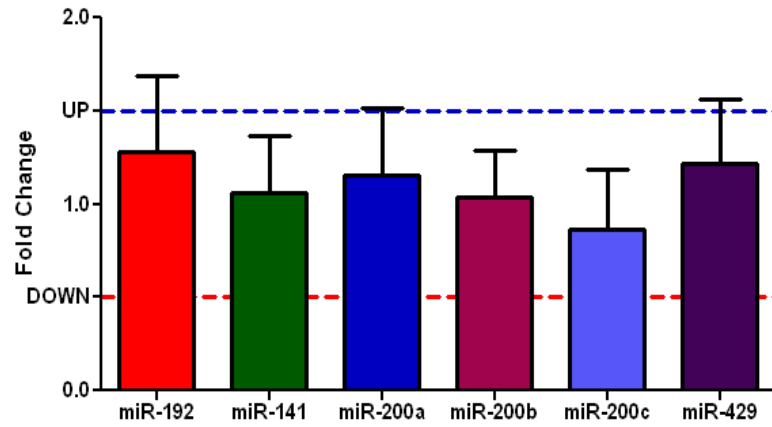
Expression profile of family miR-200 and of miR-192 in total kidney and isolated glomeruli

The miR-200 family is divided into two groups according to their sequence seed: group 1(miR-141 and miR-200a) and group 2(miR-200b, miR-200c, and miR-429) (38). In the total kidney of 12 days animals family miR-200 and the miR-192 expression level no difference in between groups (Figure 6a). In the total kidney of 16 weeks animals miR-141, miR-200c and miR-429 expression level were significantly up regulated (Figure 6b). However in isolated glomeruli, of 16 weeks animals, miR-141, miR-200a, miR-200b, and miR-429 were significantly down regulated (Figure 6c).

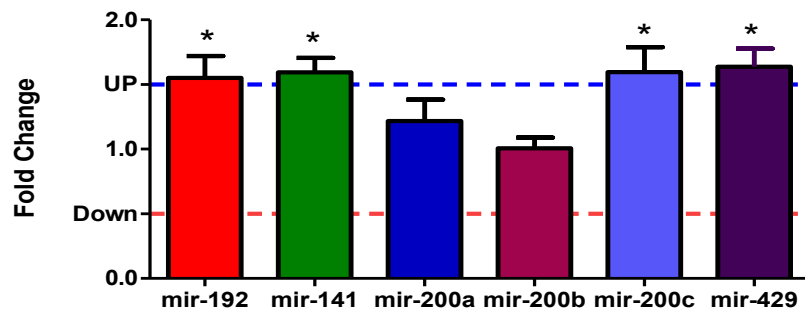
Gene expression in total kidney and isolated glomeruli

miR-200 family members target both ZEB1 and ZEB2 (39). Col 1 α 1 and col 1 α 2 gene expression were significantly increased in both the isolated glomeruli and total kidney (Figure 7). While in isolated glomeruli ZEB2 gene was higher (Figure 7b) and in the total kidney ZEB1 was up regulated (Figure 7a).

A



B



C

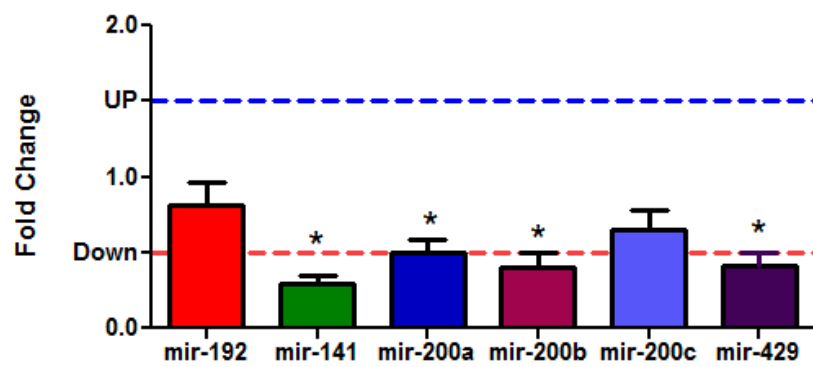


Figure 6. The expression of miR-200 family and the miR-192. Expression levels of miR-192, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c and miR-429 estimated by TaqMan RT-qPCR in A) Total kidney of 12 days, B) Total kidney of 16 weeks, and C) Glomeruli of 16 weeks rats LP. Expression of each microRNA was normalized to U6 and U87 genes. Data are expressed as fold change (mean \pm SD, n=5) relative to control group. *Significantly different from control group ($P \leq 0.05$).

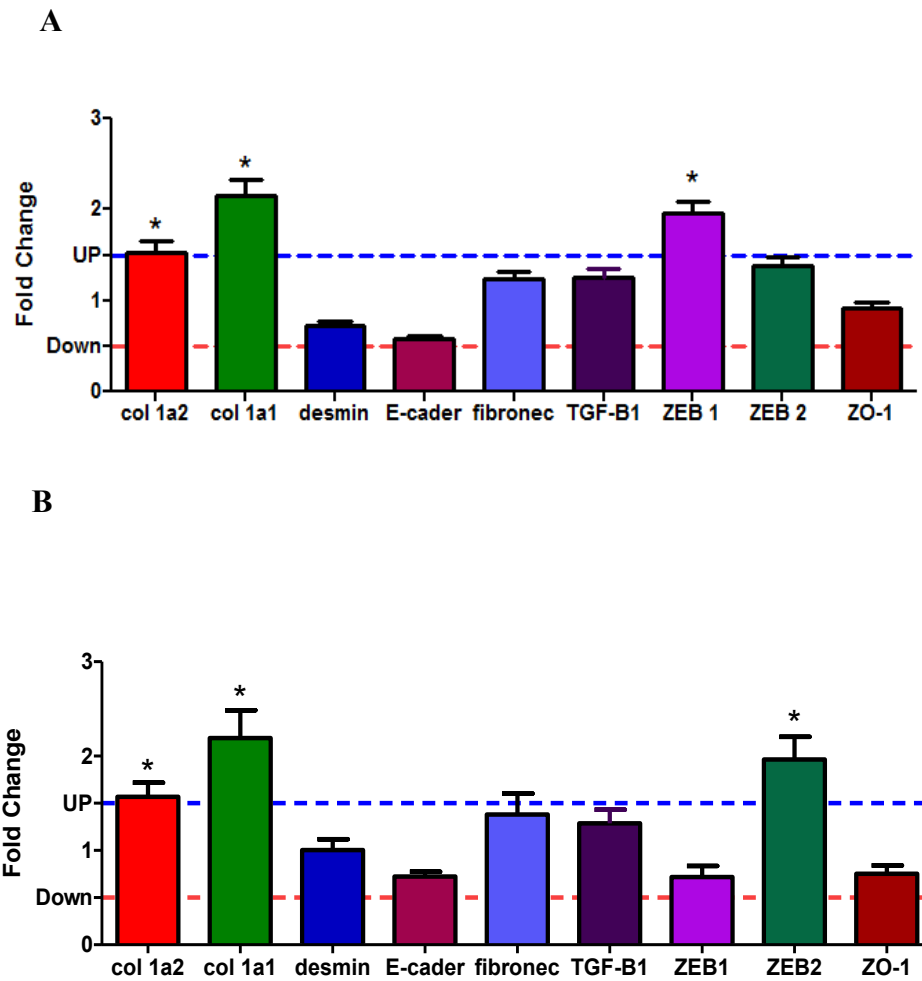


Figure 7. Expression levels of mRNAs. Expression levels of col 1 α 1, col 1 α 2, desmin, E-cadherin, fibronectin, TGF- β 1, ZEB1, ZEB2 and ZO-1 estimated by SyBR green RT-qPCR in A) Total kidney and B) Glomeruli of rats LP. Expression of each mRNA was normalized to GAPDH, β -actin and TBP genes. Data are expressed as fold change (mean \pm SD, n=5) relative to control group. *Significantly different from control group ($P \leq 0.05$).

DISCUSSION

More and more evidence is emerging that highlights the far-reaching consequences of prenatal programming on organ function and adult disease. In humans, low birth weight occurs more frequently in disadvantaged communities among whom there is often a disproportionately high incidence of adult cardiovascular disease, hypertension, diabetes mellitus, and kidney disease (40).

Brenner et al. (1988) (41) proposed that congenital or programmed reduction in nephron number explains why some individuals are susceptible to hypertension and renal injury whereas others with sodium excess or diabetes seem relatively resistant under similar circumstances. A reduction in nephron number and therefore whole-kidney glomerular filtration area would result in reduced sodium excretory capacity, enhanced susceptibility to hypertension, and reduced renal reserve, thereby limiting compensation for renal injury and possibly explaining the higher prevalence of hypertension and renal disease observed in populations with high prevalence of low birth weight (42-44). An increase in glomerular size is consistent with hyperfiltration due a reduction in total filtration area, which suggests a congenital nephron deficit. Hyperfiltration manifests clinically as microalbuminuria and accelerated loss of renal function, the prevalence of which are higher among adults who had been of low birth weight. In addition, a kidney with a reduced nephron number has less renal reserve to adapt to dietary excesses or to compensate for renal injury.

Here, confirming previous report the birth weight of male LP offspring was 19.9% lower, that was associated with 27% reduced nephron number and enlarged remaining glomeruli (2). By the immunohistochemistry, we verified enhanced glomerular expression of TGF- β 1, fibronectin and type I collagen that were related to fibrotic process. An important observation is that nearly 10% of LP animals have not increased expression of these proteins and, in with that we found enhance, its occur in approximately 80% of the renal cortex. In the medullar zone of control rats we have positive stain for TGF- β 1, fibronectin and col I, that were increased in LP rats.

In our model the significant rise in the arterial pressure appeared after 12 wk of age (2,6) and overload in remaining nephrons in LP can be a preponderant factor for the development of fibrous process observed here.

Plank et al (2006) demonstrated in rats that offspring from protein-restricted mothers had increased susceptibility to more severe and potentially chronic course when an acute mesangioproliferative glomerulonephritis was induced (4).

In humans patients that presented IUGR the course of kidney diseases, how for example, membranous glomerulonephritis (45) an idiopathic nephritic syndrome (46) is aggravated.

How miRNAs have been suggested to play important roles in a variety of kidney diseases we investigated the expression of miR200 family and miR 192 in total renal samples and isolated glomeruli from LP comparatively to NP and rats.

By studying isolated glomeruli we verified that LP rats presented downregulation of miR 141(71%), 200a (50%), 200b (60%) and 429 (59%). Thus, in the glomeruli, in parallel to enhanced expression of TGF beta 1, a major inducer of EMT in epithelial cells (47, 48) we found downregulation of miR200 family members that are potent inhibitors of EMT and upregulation of ZEB2, an EMT-inducing transcriptional factor (29,31,48,49). Additionally, occurred a gain in expression of proteins considered mesenchymal markers, including fibronectin and col 1 alpha 1 e 2. Liu 2010 (50) speculates that transition of podocytes after injury may play a critical role in causing podocyte dysfunction, which ultimately leads to defective glomerular filtration, proteinuria and glomerulosclerosis.

Recent findings indicate that glomerular podocytes undergo phenotypic conversion, characterized by loss of podocyte-specific markers and gain of transitional features, a process reminiscent of EMT (51). The enhanced mRNA expression of col I α 1 (219%) and α 2(157%) in observed in immunohistochemical study but we not found desmin, E-caderin and ZO-1 mRNA alterations in LP. We cannot exclude the possibility of a post transcriptional event in the way of reduce desmin, E-caderin and ZO-1 protein

expression. Also fibronectin and TGF- β 1 mRNA expression are not altered but, by immunohistochemistry we observed more intensive localization in glomeruli from LP rats. The production of interstitial matrix compounds suggests that podocytes have adapted a mesenchymal phenotype after injury, which could profoundly change their functions (51). These authors point a important factor that the podocytes may not undergo EMT in a synchronized fashion after injury and therefore a whole spectrum of podocytopathies that reflect different stage of podocyte EMT could be envisioned *in vivo*. Really, how previously cited approximately 80% of glomeruli of LP presented enhanced expression of matrix compounds.

TGF- β tiggers tubular EMT, and its expression is up-regulated in virtually every type of cronic kidney disease (52,53). How cited above, TGF- β is a potent tigger for podocyte EMT (51). These authors suggests that EMT is an early and predominant response of podocytes in most pathophysiological conditions.

Using culture of immortalized mouse podocyte, Li et al (2008) (51) also showed that after TGF- β stimulation occurred loss of epithelial markers how ZO-1 and acquisition of mesenquimal markers how desmin, col I and fibronectin.

In isolated glomeruli we not found alterated mRNA expression of desmin and ZO-1 in LP rats. By the other side we observed intensively enhanced ecpresion

Wang et al (54) (2010) have demonstrated that intrarenal expression of miR 200a/b, 141, 429, 205 and 192 were increased in patients with hypertensive nephosclerosis and that the degree of upregulation is correlated with disease severity. In total kidney samples we also verified upregulation of miR 141, 429, 205 and 192 but 200a/b expression is not altered. Additionally to established differential profile of miRNAs expression between the renal cortex and medulla (55) we obtained totally different pattern when consider total kidney tissue and isolated glomeruli.

At 12 days of life we have not altered expression of these miRNAs in total kidney samples. By the other side, at 16 week of life we found significantly higher kidney expression of miR 192 (155%), miR 141 (160%), miR 200c (160%) and miR 429 (163%) in LP comparatively to NP rats. Paralelly, the mRNA for col I α 1 and 2 are also significantly enhanced (215 and 153%, respectively). Using total kidney tissues Chung et al 2010 (48) found that miR192 was highly upregulated in diseased kidney with progressive renal fibrosis in a mouse model of unilateral ureteral obstruction and in a rat model of remnant kidney disease.

How observed in isolated glomeruli, in total kidney TGF- β 1 protein expression is enhanced in the similar pattern that observed to col type I, but your mRNA is not altered in both total renal tissue and glomeruli of LP rats. TGF- β induces reduction in ZEB 1 expression. ZEB 1 is a repressor of col I e II genes (17,18,56). Conversely to this concept we found a rise of 196% in ZEB1 mRNA in total kidney of LP. In this way ZEB1 mRNA rise is not sufficient for inhibit the coll I gene and we can suppose that post transcriptional mechanism can be involved. How ZEB1 is also repressor of E-cadherin gene (16) we investigated its expression but we not found alteration in the mRNA expression of this protein. Thus, the two genes that have expression controlled by ZEB1 were not downregulated. Additional studies investigating ZEB 1 protein expression in this model is necessary.

An important observation that we need consider is that tubular epithelial cells and endothelial cells, after injury *in vivo*, may not undergo a complete EMT in many circumstances; rather, they undergo a partial EMT, also known as pre-EMT or *in situ* EMT, in which these cells only change one or two phenotypic markers but not actually leave their local microenvironment (57).

Our contrasting findings highlight the complex nature of miRNA research. Kato et al (2009) (24) have considered that the effects of renal miRs may be cell type specific and that the miR signaling networks that mediate the effects of TGF β on different EMT types may not be the same. In a recent review Carew et al (2012) (19) have concluded that the precise role of miRNAs in regulating EMT and the pathogenesis of fibrosis remains a fertile area for research.

These are the first results showing renal miRNAs modulation in our protein restriction model of fetal programming. The fetal programmed rats presented adult glomerulosclerosis with an accentuated stage of fibrosis, that led us to suggest that miR200 family were upregulated in glomeruli by TGF- β 1 at early time points to induce type I collagen expression. This increase in collagen may subsequently induce glomeruli EMT by decreasing these miRNAs at later time points. Considering that the glomeruli is the first nephron structure affected for pressure overload, we suppose that here miRNAs expression may be cell-type specific and context dependent with tubular response occurring later.

REFERENCES

1. Barker DJ. Intrauterine programming of adult disease. *Mol Med Today* 1995; **1**: 418-423.
2. Mesquita FF, Gontijo JA, Boer PA. Expression of renin-angiotensin system signalling compounds in maternal protein-restricted rats: effect on renal sodium excretion and blood pressure. *Nephrol Dial Transplant* 2010; **25**:380-388.
3. Woods LL, Ingelfinger JR, Nyengaard JR, et al. Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatr* 2001; **49**: 460-467.
4. Plank C, Ostreicher I, Hartner A, et al. Intrauterine growth retardation aggravates the course of acute mesangioproliferative glomerulonephritis in the rat. *Kidney Int* 2006; **70**: 1974-1982.
5. Elmes MJ, Gardner DS, Langley-Evans SC. Fetal exposure to a maternal low-protein diet is associated with altered left ventricular pressure response to ischaemia-reperfusion injury. *Br J Nutr* 2007; **1**: 93-100.
6. Mesquita FF, Gontijo JA, Boer PA. Maternal undernutrition and the offspring kidney: from fetal to adult life. *Braz J Med Biol Res* 2010; **43**: 1010-1018.
7. Lee HS. Mechanisms and consequences of TGF- overexpression by podocytes in progressive podocyte diseases. *Cell Tissue Res* 2012; **347**: 129-140. Review.
8. Kim JH, Kim BK, Moon KC, et al. Activation of the TGF- β /Smad signaling pathway in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2003; **64**:1715–1721.
9. Kim TS, Kim JY, Hong HK, et al. mRNA expression of glomerular basement membrane proteins and TGF- β 1 in human membranous nephropathy. *J Pathol* 1999; **189**:425–430.
10. Shankland SJ, Hugo C, Coats SR, et al. Changes in cell-cycle protein expression during experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* 1996; **50**:1230-1239.
11. Wahab NA, Schaefer L, Weston BS, et al. Glomerular expression of thrombospondin-1, transforming growth factor beta and connective tissue growth factor at different stages of diabetic nephropathy and their interdependent roles in mesangial response to diabetic stimuli. *Diabetologia* 2005; **48**: 2650–2660.
12. Sharma K, Ziyadeh FN. Hyperglycemia and diabetic kidney disease. The case for transforming growth factor-beta as a key mediator. *Diabetes* 1995; **44**:1139–1146.

13. Sharma K, Ziyadeh FN, Alzahabi B, et al. Increased renal production of transforming growth factor-beta1 in patients with type II diabetes. *Diabetes* 1997; **46**: 854–859
14. Sekido R, Murai K, Funahashi J, et al. The delta-crystallin enhancer-binding protein delta EF1 is a repressor of E2-box-mediated gene activation. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 5692-5700.
15. Verschueren K, Remacle JE, Collart C, et al. SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes. *J Biol Chem* 1999; **274**: 20489-20498.
16. Eger A, Aigner K, Sonderegger S, et al. DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene* 2005; **24**: 375-2385.
17. Ponticos M, Partridge T, Black CM, et al. Regulation of collagen type I in vascular smooth muscle cells by competition between Nkx2.5 and deltaEF1/ZEB1. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 6151–6161.
18. Murray D, Precht P, Balakir R, et al. The transcription factor deltaEF1 is inversely expressed with type II collagen mRNA and can repress Col2a1 promoter activity in transfected chondrocytes. *J Biol Chem* 2000; **275**: 3610–3618.
19. Carew RM, Wang B, Kantharidis P. The role of EMT in renal fibrosis. *Cell Tissue Res* 2012; **347**: 103–116.
20. Badid C, Desmouliere A, Babici D, et al. Interstitial expression of alpha-SMA: an early marker of chronic renal allograft dysfunction. *Nephrol Dial Transplant* 2002; **17**: 1993–1998.
21. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, et al. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 1999; **277**:C1–9
22. Roberts IS, Burrows C, Shanks JH, et al. Interstitial myofibroblasts: predictors of progression in membranous nephropathy. *J Clin Pathol* 1997; **50**:123–127.
23. Kato M, Zhang J, Wang M, et al. MicroRNA-192 in diabetic kidney glomeruli and its function in TGF-beta-induced collagen expression via inhibition of E-box repressors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 3432-3437.
24. Kato M, Arce L, Natarajan R. MicroRNAs and their role in progressive kidney diseases. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; **4**: 1255-1266.
25. Wang B, Herman-Edelstein M, Koh P, et al. E-Cadherin Expression Is Regulated by miR-192/215 by a Mechanism That Is Independent of the

- Profibrotic Effects of Transforming Growth Factor- β . *Diabetes* 2010; **59**: 1794-1802.
26. Wang B, Koh P, Winbanks C, Coughlan MT, et al. miR-200a prevents renal fibrogenesis through repression of TGF- β 2 expression. *Diabetes* 2011; **60**: 280–287.
27. Inui M, Martello G, Piccolo S. MicroRNA control of signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; **11**: 252-263.
28. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; **136**: 215-233.
29. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, et al. The mir-200 family and mir-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* 2008; **10**: 593-601.
30. Gregory PA, Bracken CP, Bert AG, et al. MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle* 2008; **7**: 3112–3118.
31. Korpál M, Lee ES, Hu G, et al. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cells by targeting the E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem* 2008; **283**: 14910-14914.
32. Park SM, Gaur AB, Lengyel E, et al. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev* 2008; **22**: 894-907.
33. Krupa A, Jenkins R, Luo DD, et al. Loss of microRNA-192 promotes fibrogenesis in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2010; **21**: 438-447.
34. Burk U, Schubert J, Wellner U, et al. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep* 2008; **9**: 582-589.
35. Yamamoto T. Isolation and Enrichment of Glomeruli Using Sieving Techniques, in Renal and Urinary Proteomics: Methods and Protocols (ed V. hongboonkerd), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 2009. KGaA, Weinheim, Germany.
36. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 2001; **29**: e45.
37. Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, et al. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic acids research* 2009; **37**: e45.

38. Kato M, Arce L, Wang M, et al. A microRNA circuit mediates transforming growth factor- β 1 autoregulation in renal glomerular mesangial cells. *Kidney Int* 2011; **80**: 358-368.
39. miRBase. The microRNA database. <http://www.mirbase.org>. Accessed in february 12, 2012.
40. Luyckx VA, Brenner BM. Low birth weight, nephron number, and kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2005 **97**: S68-77.
41. Brenner BM, Garcia DL, Anderson S: Glomeruli and blood pressure: Less of one, more the other? *Am J Hypertens* **1**: 335–347, 1988
42. Lackland DT, Bendall HE, Osmond C, et al. Low birth weights contribute to high rates of early-onset chronic renal failure in the Southeastern United States. *Arch Intern Med* 2000; **160**: 1472–1476.
43. Hsu CY, Lin F, Vittinghoff E, Shlipak MG: Racial differences in the progression from chronic renal insufficiency to end-stage renal disease in the United States. *J Am Soc Nephrol* 2003; **14**: 2902–2907.
44. Lackland DT, Egas BM, Syddall HE, et al. Associations between birth weight and antihypertensive medication in black and white *Medicaid recipients*. *Hypertension* 2002; **39**: 179–183.
45. Brenner BM, Garcia DL, Anderson S. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am J Hypertens* 1998; **1**: 335-347.
46. Brenner BM, Lawler EV, Mackenzie HS. The hyperfiltration theory: a paradigm shift in nephrology. *Kidney Int* 1996; **49**: 1774-1777.
47. Zavadil J, Narasimhan M, Blumenberg M, et al. Transforming growth factor-beta and microRNA:mRNA regulatory networks in epithelial plasticity. *Cells Tissues Organs* 2007; **185**: 157–161.
48. Chung ACK, Huang XR, Meng X, et al. miR-192 Mediates TGF- β /Smad3-Driven Renal Fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2010; **21**: 1317–1325.
49. Bracken CP, Gregory PA, Kolesnikoff N, et al. A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* 2008; **68**: 7846-7854.
50. Liu Y. New insights into Epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2010; **21**:212-22.
51. Li Y, Kang YS, Dai C. Epithelial-to-mesenchymal transition is a potential pathway leading to podocyte dysfunction and proteinuria. *Am J Pathol* 2008; **172**: 299-308.

52. Yang J, Liu Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am J Pathol* 2001; **159**: 1465–1475.
53. Böttinger EP, Bitzer M. TGF-beta signaling in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; **13**: 2600-2610.
54. Wang G, Kwan BCH, Lai FMM, et al. Intrarenal expression of miRNAs in Patients with hypertensive nephrosclerosis. *Am J Hypertension* 2010; **23**: 78-84.
55. Tian Z, Greene AS, Pietrusz JL, et al. Micro-RNA target pairs in the rat kidney identified by microRNA microarray, proteomic, and bioinformatics analysis. *Genome Res* 2008; **18**: 404–11.
56. Terraz C, Toman D, Delauche M, et al. Delta Efl binds to a far upstream sequence of the mouse pro-alpha 1(I) collagen gene and represses its expression in osteoblasts. *J Biol Chem* 2001; **276**: 37011–37019.
57. Hertig A, Anglicheau D, Verine J, et al. Early epithelial phenotypic changes predict graft fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2008; **19**:1584–1591.

Conclusões

Este estudo demonstrou que:

- A restrição proteica gestacional provocou redução de 16,95 % no peso dos neonatos.
- Com 12 dias de vida os animais submetidos a restrição proteica gestacional não apresentam alteração na expressão de microRNAs da família 200 e miRNA 192.
- Com 16 semanas de vida os animais LP apresentam glomerulosclerose caracterizada pelo aumento de col I e fibronectina. A fibrose foi encontrada nos espaços peritubulares corticais e medulares.
- Com 16 semanas os animais LP apresentam diminuição na expressão glomerular de miRs 141, 200^a, 200b e 429 sendo que a expressão de miR 200c e 192 não foi alterada. Os mRNAs para col 1 alfa 1 e 2 e para ZEB 2 apresentam expressão aumentada.
- No tecido renal total os animais LP de 16 semanas de vida apresentam aumento na expressão de miR 141, 200c, 429 e 192 sendo que a expressão de 200^a e b não foi alterada. Os mRNAs para col 1 alfa 1 e 2 e para ZEB 1 tem expressão aumentada
- Com 16 semanas de vida os animais do grupo LP apresentam alterações diferentes, quando comparamos o tecido renal total e os glomérulos isolados, na expressão de miRs da família 200 e miR 192 e de mRNAs para ZEB 1/2.

Estes resultados sugerem que a expressão de miRs renais é específica em diferentes tipos celular. Além disso a rede de sinalização dos miRs, que medeiam os efeitos de TGF beta em diferentes compartimentos renais, pode atuar em momentos diferentes nas

células glomerulares e nos epitélios tubulares refletindo padrões diferentes de transição epitélio-mesenquimal. Desta forma, podemos supor que a redução na expressão glomerular dos miRs da família 200 está induzindo a EMT, enquanto a expressão aumentada de miRs da família 200 e do miR 192 nos epitélios tubulares está reprimindo este processo.

Referências Bibliográficas

Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds, SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 1989; 2: 577-580.

Barker DJ. Intrauterine programming of adult disease. *Mol Med Today* 1995; 1: 418-423.

Barker DJ. Fetal nutrition and cardiovascular disease in later life. *British Medical Bulletin* 1997; 53: 96-108.

Barker DJ. The developmental origins of chronic adult disease. *Acta Paediatrica* 2004; 93(Suppl): 26-33

Beitens IZ, Bayard F, Ances IG, Kowarski A, Migeon CJ. The metabolic clearance rate, blood production, interconversion and transplacental passage of cortisol and cortisone in pregnancy near term. *Pediatr Res* 1973; 7: 509-519.

Benediktsson R, Lindsay RS, Noble J, Seckl JR, Edwards CR. Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension. *Lancet* 1993; 341: 339-341.

Benediktsson R, Calder AA, Edwards CRW, Seckl JR. Placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 is the placental barrier to maternal glucocorticoids: *ex vivo* studies. *Clin Endocrinol* 1997; 46: 161-166.

Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, Barzilai A, Einat P, Einav U, Meiri E, Sharon E, Spector Y, Bentwich Z. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet* 2005; 37: 766-770.

Bernal AL, Flint APF, Anderson ABM, Turnbull AC. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity (E.C.1.1.1.146) in human placenta and decidua. *J Steroid Biochem* 1980; 13: 1081-1087.

Bertram C, Trowern AR, Copin N, Jackson AA, Whorwood CB. The maternal diet during pregnancy programs altered expression of the glucocorticoid receptor and type 2 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase: potential molecular mechanisms underlying the programming of hypertension *in utero*. *Endocrinology* 2001; 142: 2841-2853.

Bhatt K, Mi QS, Dong Z. microRNAs in kidneys: biogenesis, regulation, and pathophysiological roles. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; 300: 602-610.
Boyer B, Valles AM, Edme N. Induction and regulation of Epithelial-mesenchymal transitions. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 1091-1099.

Bracken CP, Gregory PA, Kolesnikoff N, Bert AG, Wang J, Shannon MF, Goodall GJ. A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* 2008; 68: 7846-7854.

Burdge GC, Slater-Jefferies J, Torrens C, Phillips ES, Hanson MA, Lillycrop KA. Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations. *Br J Nutr* 2007; 97: 435-439.

Burk U, Schubert J, Wellner U, Schmalhofer O, Vincan E, Spaderna S, Brabletz T. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep* 2008; 9: 582-589.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* 2009; 55: 611-622.

Campbell AL, Murphy BEP. The maternal-fetal cortisol gradient during pregnancy and at delivery. *J Clin Endocrinol Metab* 1977; 45: 435-440.

Cheng S, Lovett DH. Gelatinase A (MMP-2) is necessary and sufficient for renal tubular cell epithelial-mesenchymal transformation. *Am J Pathol* 2003; 162: 1937-1949.

Chu CY, Rana TM. Small RNAs: regulators and guardians of the genome. *J Cell Physiol* 2007; 213: 412-419.

Chung AC, Huang XR, Meng X, Lan HY. miR-192 mediates TGF-beta/Smad3-driven renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 1317-1325

Cole TJ, Blendy JA, Monaghan AP, Schmid W, Aguzzi A, Schutz G. Molecular genetic analysis of glucocorticoid signaling during mouse development. *Steroids* 1995; 60: 93-96.

Diaz R, Brown RW, Seckl JR. Distinct Ontogeny of Glucocorticoid and Mineralocorticoid Receptor and 11b-Hydroxysteroid Dehydrogenase Types I and II mRNAs in the Fetal Rat Brain Suggest a Complex Control of Glucocorticoid Actions. *J Neurosci* 1998; 18: 2570-2580.

Dodic M, Abouantoun T, O'Connor A, Wintour EM, Moritz KM. Programming effects of short prenatal exposure to dexamethasone in sheep. *Hypertension* 2002; 40: 729-734.

Doherty CB, Lewis RM, Sharkey A, Burton GJ. Placental Composition and Surface Area but not Vascularization are Altered by Maternal Protein Restriction in the Rat. *Placenta* 2003; 24: 34-38

Drake AJ, Walker BR. The intergenerational effects of fetal programming: non-genomic mechanisms for the inheritance of low birth weight and cardiovascular risk. *J Endocrinol* 2004; 180: 1-16.

Du T, Zamore PD. microPrimer: The biogenesis and function of microRNA. *Development* 2005; 132: 4645-4652.

Eddy AA, Neilson EG. Chronic kidney disease progression. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17: 2964-2966.

Edwards CR, Benediktsson R, Lindsay RS, Seckl JR. Dysfunction of placental glucocorticoid barrier: a link between the fetal environment and adult hypertension? *Lancet* 1993; 341: 355-357.

Edwards LJ, McFarlane JR, Kauter KG, McMillen IC. Impact of periconceptional nutrition on maternal and fetal leptin and fetal adiposity in singleton and twin pregnancies. *Am J Physiol Regul Comp Physiol* 2005; 288: 39-45.

Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004; 429: 457-463

Eger A, Aigner K, Sonderegger S, Dampier B, Oehler S, Schreiber M, Berx G, Cano A, Beug H, Foisner R. DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene* 2005; 24: 2375-2385.

Escoda MSQ. Para a crítica da transição nutricional. *Ciência & Saúde Coletiva* 2001; 7: 219-226.

Fan JM, Ng YY, Hill PA, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Atkins RC, Lan HY. Transforming growth factor-beta regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in vitro. *Kidney Int* 1999; 56: 1455-1467.

FAO. United Nations Food and Agriculture Organization.
<http://www.fao.org/publications/sofi/en.2010>. Accessed in november 22, 2011.

Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008; 9: 102-114.

Forsdahl A. Observations throwing light on the high mortality in the county of Finnmark. Is the high mortality today a late effect of very poor living conditions in childhood and adolescence? *Int J Epidemiol* 2002; 31: 302-308.

Forsdahl S. Are poor living conditions in childhood and adolescence an important risk factor for arteriosclerotic heart disease? *Br J Prev Soc Med* 1967; 3: 249-256.

Fórsen T, Eriksson JG, Tuomilehto J, Tiramo K, Osmond C, Barker DJ. Mother's weight in pregnancy and coronary heart disease in a cohort of Finnish men: follow-up study. *BMJ* 1997; 315: 837-840.

Fowden AL, Giussani DA, Forhead AJ. Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. *Physiology (Bethesda)* 2006; 21: 29-37.

- Fragiadaki M, Mason MR. Epithelial-mesenchymal transition in renal fibrosis-evidence for and against. *Int J Exp Path* 2011; 92: 143-150.
- Godfrey KM. The role of the placenta in fetal programming - a review. *Placenta* 2002; 23: S20–S27.
- Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. The microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 2004; 432: 235-240.
- Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Farshid ATG, Vadas MA, Goodall YK, Goodall GJ. The mir-200 family and mir-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting Zeb1 and SLP1. *Nat Cell Biol* 2008a; 10: 593-601.
- Gregory PA, Bracken CP, Bert AG, Goodall GJ. MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle* 2008b; 7: 3112-3118.
- Guidi E, Menghetti D, Milani S, Montagnino G, Palazzi P, Bianchi G. Hypertension may be transplanted with the kidney in humans: a long-term historical prospective follow-up of recipients grafted with kidneys coming from donors with or without hypertension in their families. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 1131-1138.
- Hales CN, Barker DJP. The thrifty phenotype hypothesis. *British Medical Bulletin* 2001; 60:5-20.
- Hales CN, Barker DJP. Type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992; 35: 595-601.
- Han J, Lee Y, Ycom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 2004; 18: 3016-3027.
- Harvey SJ, Jarad G, Cunningham J, Goldberg S, Schermer B, Harfe BD, McManus MT, Benzing T, Miner JH. Podocyte-specific deletion of dicer alters cytoskeletal dynamics and causes glomerular disease. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 2150-2158.
- Hertig A, Anglicheau D, Verine J, Pallet N, Touzot M, Ancel PY, Mesnard L, Brousse N, Baugey E, Glotz D, Legendre C, Rondeau E, Xu-Dubois YC. Early epithelial phenotypic changes predict graft fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 1584–1591.
- Ho JJ, Marsden PA. Dicer cuts the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 2043-2046.
- Huang WY, Li ZG, Rus H, Wang X, Jose PA, Chen SY. RGC-32 mediates transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in human renal proximal tubular cells. *J Biol Chem* 2009; 284: 9426–9432.

Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 2001; 293: 834-838.

Jansson T, Powell TL. Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clin Sci* 2007; 113: 1-13.

Jones RH, Hayakawa H, Mackay JD, Parsons V, Watkins PJ. Progression of diabetic nephropathy. *Lancet* 1979; 1: 1105-1106.

Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 2003; 112: 1776–1784.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119: 1420-1428.

Kato M, Zhang J, Wang M, Lanting L, Yuan H, Rossi JJ, Natarajan R. microRNA-192 in diabetic kidney glomeruli and its function in TGF- β -induced collagen expression via inhibition of E-box repressors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 3432-3437.

Kato M, Arce L, Natarajan R. MicroRNAs and their role in progressive kidney diseases. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4: 1255-1266.

Kato M, Wang L, Putta S, Wang M, Yuan H, Sun G, Lanting L, Todorov I, Rossi JJ, Natarajan R. Posttranscriptional upregulation of Tsc-22 by Ybx1, a target of miR-216a, mediates TGF- β -induced collagen expression in kidney cells. *J Biol Chem* 2010; 285: 34004–34015.

Kato M, Arce L, Wang M, Putta S, Lanting L, Natarajan R. A microRNA circuit mediates transforming growth factor- β 1 autoregulation in renal glomerular mesangial cells. *Kidney Int* 2011; 80: 358-368.

Kato M, Park JT, Natarajan R. MicroRNAs and the glomerulus. *Exp Cell Res*. 2012; 318: 993-1000.

Kasinski AL, Slack FJ. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2011; 11:849-864.

Kim VN. microRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 376-385.

Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10:126-139.

Korpál M, Lee ES, Hu G, Kang Y. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cells by targeting the E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem* 2008; 283: 14910-14914.

Krupa A, Jenkins R, Luo DD, Lewis A, Phillips A, Fraser D. Loss of microRNA-192 promotes fibrogenesis in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 438-447.

Langley-Evans SC, Phillips GJ, Jackson AA. In utero exposure to maternal low protein diets induces hypertension in weanling rats, independently of maternal blood pressure changes. *Clin Nutr* 1994; 13: 319-324.

Langley-Evans SC, Jackson AA. Captopril normalises systolic blood pressure in rats with hypertension induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 1995; 110: 223-228.

Langley-Evans SC, Gardner DS, Jackson AA. Association of disproportionate growth of fetal rats in late gestation with raised systolic blood pressure in later life. *J Reprod Fertil* 1996a; 106: 307-312.

Langley-Evans SC, Phillips GJ, Benediktsson R, Gardner DS, Edwards CR, Jackson AA, Seckl JR. Protein intake in pregnancy, placental glucocorticoid metabolism and the programming of hypertension in the rat. *Placenta* 1996c; 17: 169-172

Langley-Evans SC, Welham SJM, Sherman RC, Jackson AA. Weanling rats exposed to maternal low protein diets during discrete periods of gestation exhibit differing severity of hypertension. *Clin Sci* 1996d; 91:607-615.

Langley-Evans SC. Fetal nutrition and adult disease – Programming of Chronic Disease through Fetal Exposure to Undernutrition. *CABI Publishing*, UK. 2004

Langley-Evans SC. Developmental programming of health and disease. *Proc Nutr Soc* 2006; 65: 97-105.

Langley-Evans SC. Nutrition programming of disease: unraveling the mechanism. *J Anat* 2009; 215: 36-51.

Langley-Evans SC, McMullen S. Developmental origins of adult disease. *Med Princ Pract* 2010; 19: 87-98.

Lau C, Rogers JM. Embryonic and fetal programming of physiological disorders in adulthood. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2004; 72: 300-312.

Lazinski MJ, Shea AK, Steiner M. Effects of maternal prenatal stress on offspring development: a commentary. *Arch Womens Ment Health* 2008; 11: 363-375.

Lee RC. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75: 843-854.

Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Lei J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim

VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425: 415-419.

Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004; 23: 4051-4060.

Letterio JJ, Roberts AB: Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 137-161.

Li JY, Yong TY, Michael MZ, Gleadle JM. Review: The role of microRNAs in kidney disease. *Nephrology* 2010; 15: 599-608.

Liang M, Liu Y, Mladinov D, Cowley AWJr, Trivedi H, Fang Y, Xu X, Ding X, Tian Z. microRNA: a new frontier in Kidney and blood pressure research. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 297: 553-558.

Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: Pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1-12.

Liu Y. New Insights into Epithelial-Mesenchymal Transition in Kidney Fibrosis. *J Am Soc Nephro* 2010; 21: 212-222.

Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp* 1991; 156:38-55.

Martins VJ, Toledo FTM, Grillo LP, Carmo PFM, Martins PA, Clemente AP, Santos CD, Fatima AVM, Sawaya AL. Long-lasting effects of undernutrition. *Int J Environ Res Public Health* 2011; 8: 1817-1846.

Masszi A, Di Ciano C, Sirokmany G, Arthur WT, Rotstein OD, Wang J, McCulloch CA, Rosivall L, Mucsi I, Kapus A. Central role for Rho inTGF-beta1-induced alpha-smooth muscle actin expression during epithelial-mesenchymal transition. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284: 911-924.

McMillen IC, Robinson JS. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev* 2005; 85: 571-633.

Medici D, Hay ED, Goodenough DA. Cooperation between snail and LEF-1 transcription factors is essential for TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell* 2006; 17: 1871-1879.

Mesquita FF, Gontijo JAR, Boer PA. Expression of rennin-angiotensin system signaling compounds in maternal protein-restrict rats: effect on renal sodium excretion and blood pressure. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25: 380-388.

miRBase. The microRNA database.
<http://www.mirbase.org>. Accessed in february 12, 2012.

Mogensen CE. Renal function changes in diabetes. *Diabetes* 1976; 25: 872-

879.

Murphy BE, Clark SJ, Donald IR, Pinsky M, Vedady D. Conversion of maternal cortisol to cortisone during placental transfer to the human fetus. *Am J Obstet Gynecol* 1974; 118: 538-541.

Murray D, Precht P, Balakir R, Horton WE Jr. The transcription factor deltaEF1 is inversely expressed with type II collagen mRNA and can repress Col2a1 promoter activity in transfected chondrocytes. *J Biol Chem* 2000; 275: 3610–3618.

Neilson EG. Mechanisms of disease: Fibroblasts-a new look at an old problem. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006; 2: 101-108.

Ng YY, Huang TP, Yang WC, Chen ZP, Yang AH, Mu W, Nikolic-Paterson DJ, Atkens RC, Lan HY. Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. *Kidney Int* 1998; 54: 864-876.

Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 155-166.

Nwagwu MO, Cook A, Langley-Evans SC. Evidence of progressive deterioration of renal function in rats exposed to a maternal low protein diet in utero. *Br J Nutr* 2000; 83: 79–85.

Painter RC, Roseboom TJ, van Montfrans GA, Bossuyt PM, Krediet RT, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP. Microalbuminuria in adults after prenatal exposure to the Dutch famine. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 189-194.

Park IS, Kiyomoto H, Abboud SL, Abboud HE. Expression of transforming growth factor-beta and type IV collagen in early streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes* 1997; 46: 473–480.

Park SM, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev* 2008; 22: 894-907.

Parving HH, Smidt UM, Friisberg B, Bonnevie-Nielsen V, Anderson AR. A prospective study of glomerular filtration rate and arterial blood pressure in insulin-dependent diabetics with diabetic nephropathy. *Diabetologia* 1981; 20: 457-461.

Paterson EL, Kolesnikoff N, Gregory PA, Bert AG, Khew-Goodall Y, Goodall GJ. The microRNA-200 family regulates epithelial to mesenchymal transition. *Scientific World Journal* 2008. 8: 901-904.

Perry VEA, Norman ST, Owen JA, Daniel RCW, Phillips N. Low dietary protein during early pregnancy alters bovine placental development. *Anim Reprod Sci* 1999; 55: 13–21.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 2001; 29: e45.

Pollack V, Sarkozi R, Banki Z, Feifel E, When S, Gstraunthaler G, Stoiber H, Mayer G, Montesano R, Strutz F, Schramek H. Oncostatin M-induced effects on EMT in human proximal tubular cells: differential role of ERK signaling. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 293: 1714–1726.

Ponticos M, Partridge T, Black CM, Abraham DJ, Bou-Gharios G. Regulation of collagen type I in vascular smooth muscle cells by competition between Nkx2.5 and deltaEF1/ZEB1. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 6151–6161.

Quaggin E.S., Kapus A. Scar wars: mapping the fate of epithelial–mesenchymal–myofibroblast transition. *Kidney Intern* 2011; 80: 41-50.

Rastaldi MP, Ferrario F, Giardino L, Dell’Antonio G, Grillo C, Grillo P, Strutz F, Muller GA, Colasanti G, D’amico G. Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies. *Kidney Intern* 2002; 62: 137–146.

Ravelli GR, Stein ZA, Susser MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N England J Med* 1976; 295: 349-353.

Reeves WB, Andreoli TE. Transforming growth factor beta contributes to progressive diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 7667-7669.

Reik W, Constancia M, Fowden A, Anderson N, Dean W, Ferguson-Smith A, Tycko B, and Sibley C. Regulation of supply and demand for maternal nutrients in mammals by imprinted genes. *J Physiol* 2003; 547: 35–44.

Rettig R, Folberth C, Stauss H, Kopf D, Waldherr R, Unger T. Role of the kidney in primary hypertension: a renal transplantation study in rats. *Am J Physiol* 1990; 258: 606-611.

Roberts AB: Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner Electrolyte Metab* 1998; 24: 111–119.

Rose G. Familial patterns in ischaemic heart disease. *Br J Prev Soc Med* 1964; 18: 75-80.

Roseboom TJ, van der Meulen JH, van Montfrans GA, Ravelli AC, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP. Maternal nutrition during gestation and blood pressure in later life. *J Hypertens* 2001; 19: 29-34.

Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJ, Moorman AF. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic acids research* 2009; 37: e45.

Runyan CE, Hayashida T, Hubchak S, Curley JF, Schnaper HW. Role of SARA

(SMAD anchor for receptor activation) in maintenance of epithelial cell phenotype. *J Biol Chem* 2009; 284: 25181-25189.

Schreuder M, Waal HDV, Wijk AV. Consequences of intrauterine growth restriction for the kidney. *Kidney Blood Press Res* 2006; 29: 108-125.

Seckl JR. Glucocorticoids and small babies. *Q J Med* 1994; 87: 259-262.

Seckl JR, Cleasby M, Nyirenda MJ. Glucocorticoids, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase, and fetal programming. *Kidney Int* 2000; 57: 1412–1417.

Seckl JR. Glucocorticoids programming of the fetus; adult phenotypes and molecular mechanisms. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 185: 61-71.

Seckl JR. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur J Endocrinol* 2004; 151: 49-62.

Sekido R, Murai K, Funahashi J, Kamachi Y, Fujisawa-Sehara A, Nabeshima Y, Kondoh H. The delta-crystallin enhancer-binding protein delta EF1 is a repressor of E2-box-mediated gene activation. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 5692-5700.

Strutz FM. EMT and proteinuria as progression factors. *Kidney Int* 2009; 75: 475-481.

Strutz F, Okada H, Lo C.W., Danoff T, Carone R.L., Tomaszewski J.E. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol* 1995; 130: 393-405.

Strutz F, Zeisberg M, Ziyadeh FN, Yang CQ, Kalluri R, Müller GA, Neilson EG. Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int* 2002; 61: 1714–1728.

Sun Y, Koo S, White N, Peralta E, Esau C, Dean NM, Perera RJ. Development of a micro-array to detect human and mouse microRNAs and characterization of expression in human organs. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: e188.

Thomassin H, Flavin M, Espinas ML, and Grange T. Glucocorticoid-induced DNA demethylation and gene memory during development. *EMBO J* 2001; 20: 1974–1983.

Tsai RY, Kittappa R, McKay RD. Plasticity, niches, and the use of stem cells. *Dev Cell* 2002; 2: 707–712.

Valente FLS. Fome, desnutrição e cidadania: inclusão social e direitos humanos. *Saúde e Sociedade* 2003; 2: 51-60.

Verschueren K, Remacle JE, Collart C, Kraft H, Baker BS, Tylzanowski P, nelles L, Wuytens G, Su MT, Bodmer R, Smith JC, Huylebroeck D. SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and

binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes. *J Biol Chem* 1999; 274: 20489-20498.

Viberti GC, Pickup JC, Jarrett RJ, Keen H. Effect of control of blood glucose on urinary excretion of albumin and B₂-microglobulin in insulin-dependent diabetes. *N Engl J Med* 1979; 300: 639-641.

Wang B, Herman-Edelstein M, Koh P, Burns W, Jandeleit-Dahm K, Watson A, Saleem M, Goodall GJ, Twigg SM, Cooper ME, Kantharidis P. E-Cadherin Expression Is Regulated by miR-192/215 by a Mechanism That Is Independent of the Profibrotic Effects of Transforming Growth Factor- β . *Diabetes* 2010; 59: 1794-1802.

Wang S, Skorzewski J, Feng X, Mei L, Murphy-Ullrich JE. Glucose up-regulates thrombospondin 1 gene transcription and transforming growth factor-beta activity through antagonism of cGMP-dependent protein kinase repression via upstream stimulatory factor 2. *J Biol Chem* 2004; 279: 34311-34322.

Wang G, Kwan BCH, Lai FMM, Choi PCL, Chow KM, Li PKT, Szeto CC. Intrarenal expression of miRNAs in Patients with hypertensive nephrosclerosis. *Am J Hypertension* 2010; 23: 78-84.

Waterland RA, Jirtle RL. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 5293-5300.

Waterland RA, Jirtle RL. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition* 2004; 20: 63-68.

Waterland RA. Early environmental effects on epigenetic regulation in humans. *Epigenetics* 2009; 4: 523-525.

Weaver ICG, Szyf M, Meaney MJ. From maternal care to gene expression: DNA methylation and the maternal programming of stress responses. *Endocr Res* 2002; 28: 699.

Weigert C, Brodbeck K, Sawadogo M, Häring HU, Schleicher ED. Upstream stimulatory factor (USF) proteins induce human TGF-beta1 gene activation via the glucose-response element-1013/-1002 in mesangial cells: up-regulation of USF activity by the hexosamine biosynthetic pathway. *J Biol Chem* 2004; 279: 15908-15915.

Willis BC, Borok Z. TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293: 525-534.

Woodall SM, Johnston BM, Breier BH, Gluckman PD. Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. *Pediatric Research* 1996; 40: 438-443.

Yamamoto T, Nakamura T, Noble NA, Ruoslahti E, Border WA. Expression of transforming growth factor beta is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1814–1818.

Yamamoto T. Isolation and Enrichment of Glomeruli Using Sieving Techniques. In: V. Thongboonkerd, editor, *Renal and Urinary Proteomics: Methods and Protocols*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co: KGaA, Weinheim, Germany. 2009.

Yang J, Liu Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am J Pathol* 2001; 159: 1465–1475.

Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNA and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003; 17: 3011-3016.

Zambrano E, Martínez-Samayoa PM, Bautista CJ, Déas M, Guillém L, Rodríguez-González GL, Guzmán C, Larrea F, Nathanielsz PW. Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *J Physiol* 2005; 566: 225-236.

Zavadil J, Bottinger EP. TGF- β and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 2005; 24: 5764–5774.

Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 2009; 119: 1429–1437.

Zeman FJ. Effects of maternal protein restriction on the kidney of the newborn young of rats. *J Nutr* 1968; 94: 111-116.

Zeman FJ. Kidney Function of the Progeny of Rats Fed a Low Protein Diet. *J Nutr* 1967; 95: 49-54.

Zhu Y, Casado M, Vaulont S, Sharma K. Role of upstream stimulatory factors in regulation of renal transforming growth factor-beta1. *Diabetes* 2005; 54: 1976–1984.

Ziyadeh FN, Hoffman BB, Han DC, Iglesias-De La Cruz MC, Hong SW, Isono M, Chen S, McGowan TA, Sharma K. Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor-beta antibody in db/db diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 8015–8020.

METODOLOGIA DETALHADA

1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos e fêmeas, procedentes do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB), com 4 semanas de idade. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura de 23 ± 2 °C, umidade relativa do ar $50 \pm 10\%$, e ciclos de iluminação de 12 horas, com luzes acesas das 6h00 às 18h00, no biotério do CEATOX.

2. Acasalamento

Os procedimentos experimentais foram realizados no laboratório de Programação Fetal do Departamento de Morfologia dessa Instituição e aprovados pela Comissão de Ética Experimental em Pesquisa do IB-UNESP (292-CEEA).

Os animais receberam ração padrão comercial até completarem 11 semanas, tanto a ração quanto a água foram fornecidos *ad libitum*. Ao completarem 11 semanas os animais foram acasalados em sistema de harem. O protocolo de acasalamento foi executado durante o ciclo escuro. Para tanto, cada macho foi colocado em uma caixa transparente durante aproximadamente 15 minutos, a fim de reconhecimento e marcação do território. Após este período, duas ou três fêmeas foram colocadas em cada caixa que continha um macho. As fêmeas permaneceram com os machos até o início da manhã do dia seguinte. Para a confirmação da prenhes, foi feito lavado vaginal para a observação de espermatozoides.

3. Grupos

Após a confirmação da prenhez, as ratas foram separadas em caixas individuais, e tiveram seu peso mensurado três vezes por semanas, durante o período gestacional. Durante esta etapa, as ratas passaram a receber a dieta conforme o grupo ao qual pertenciam: **NP** (normal protein) as ratas receberam 30g de ração normoproteica (17% de caseína) por dia, durante toda a gestação e **LP** (low protein) receberam 30g de ração hipoproteica (6% de caseína) diariamente por todo o período gestacional. Ambas as dietas são isocalóricas e normossódicas. Durante a amamentação as ratas voltaram a serem alimentadas com ração padrão comercial.

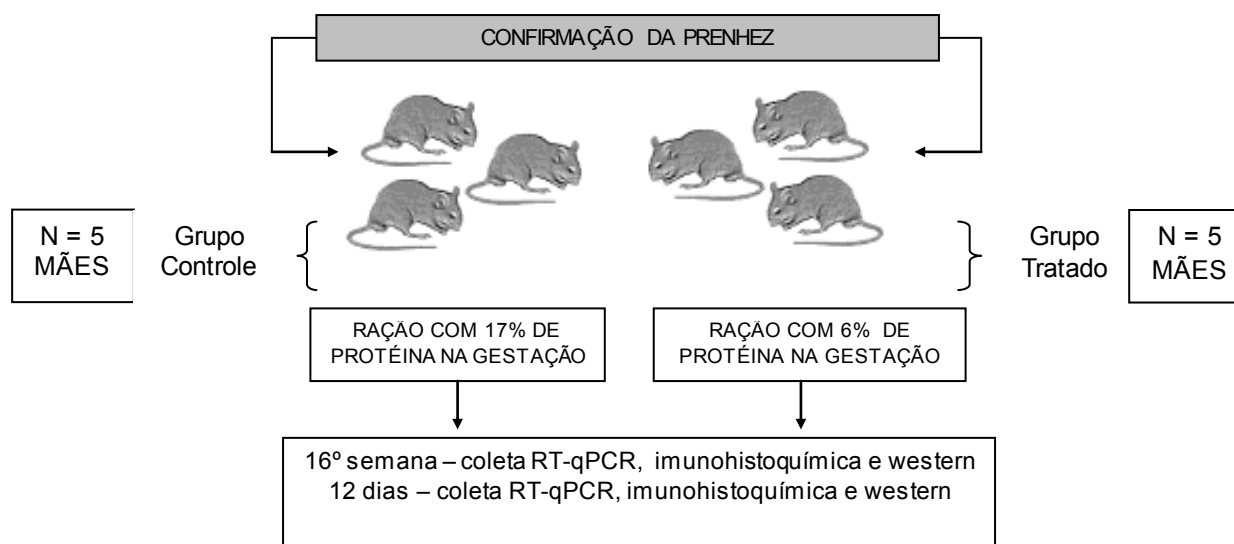


Figura 6: Delineamento experimental.

As dietas normo e hipoproteica foram obtidas da empresa PRAG Soluções (Jaú-SP) e possuem os seguintes itens:

Tabela 1: Itens contidos em 1kg da dieta.

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

4. Filhotes

Após o nascimento, a distância ano-genital foi medida através de um paquímetro digital, a fim de discriminar machos e fêmeas (os animais com valor igual ou maior que 2 mm foram considerados machos e animais com valores menores que 2 mm foram considerados fêmeas), já que utilizamos apenas os machos da prole (FIGURA 7). Todas as ratas tiveram suas ninhadas reduzidas para 8 filhotes, afim de todos os filhotes terem a mesma disponibilidade para se amamentar. Quando possível foi feito reimplante de ninhada, entre os mesmos grupos.

Os filhotes foram pesados em balança analítica no dia do nascimento e a cada semana subsequente de vida. Foram amamentados até 21º dia de vida e

posteriormente retirados da gaiola da mãe e postos em novas gaiolas, estes animais passaram a receber ração padrão comercial, normosódica e normoproteica, e água, ambos *ad libitum*.

Os animais utilizados para o acasalamento, e os filhotes fêmeas foram posteriormente sacrificados em câmara de CO₂.



Figura 7: Distância ano-genital. A imagem a direita representa uma fêmea (menor que 2 mm) e a imagem a esquerda representa um macho (maior que 2mm). As distâncias foram aferidas com um paquímetro digital.

5. Coleta

As coletas foram realizadas no 12º dia de vida (final da nefrogênese em ratos) e na idade adulta (16 semanas). No momento da eutanásia, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de ketamina (75mg/kg) e xilosina (10mg/kg).

5.1. Coleta para Avaliação da Expressão Gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição reversa (RT-qPCR)

Os rins foram retirados, desencapsulados com o auxílio de uma gase, cortados longitudinalmente e posteriormente retirou-se a medula. Parte do córtex renal foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer a -80°C. Os glomérulos foram isolados através de um jogo de peneiras com

diferentes malhas (250 μm , 125 μm e 63 μm) para tal procedimento o tecido cortical renal foi picado e amassado com uma colher, e lavado com água Milli-Q, passando pelas três peneiras (FIGURA 8). Os glomérulos ficam na última peneira, pois o diâmetro de glomérulo de rato é de aproximadamente 122 μm . Após isso, foram centrifugados por 15 minutos, a 1500 rpm, a 4°C, e resuspenso em 1 ml de solução de RNAlater para a estabilização do RNA (Life Technologies, EUA) e armazenados em freezer -80°C, ambos foram mantidos a -80°C até a extração de RNA.

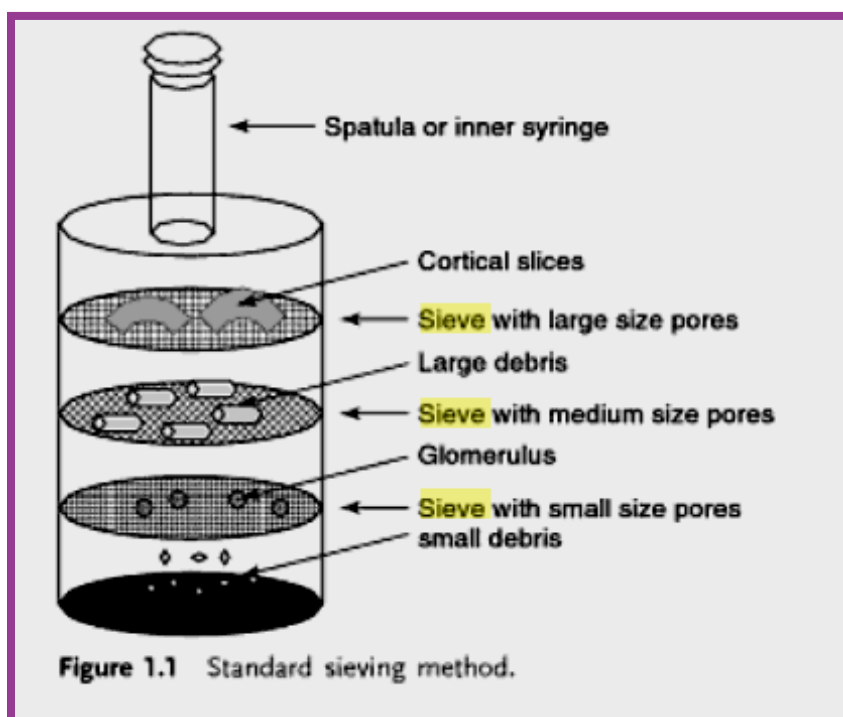


Figura 8: Esquema das peneiras utilizadas para isolar glomérulos. Extraída de Yamamoto (2009).

Os experimentos de RT-qPCR foram realizados seguindo as orientações do MIQE: *Minimum information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment* (BUSTIN et al, 2009).

a. Extração de RNA total

A extração do RNA foi realizada com o Trizol LS Reagent (Invitrogen – Life Technologies), segundo as instruções do fabricante.

As amostras congeladas foram homogeneizadas em aparelho Turrax após a adição de 1 ml de Trizol para cada 100 mg de tecido. O Trizol tem a função de manter a integridade do RNA durante a lise celular que ocorre no processo de homogeneização. Após a homogeneização as amostras foram transferidas para um tubo de 2 ml e incubadas à temperatura ambiente durante 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 0,2 ml de clorofórmio, para cada 1 ml de Trizol. A amostra foi agitada por 15 segundos, manualmente, e incubada, em temperatura ambiente, por 3 minutos. O material foi centrifugado, a 12000 x g durante 15 minutos a 4°C. O processo de centrifugação separará a amostra em 3 fases: a.) uma inferior, de fenol-clorofórmio com coloração rosada, conterá DNA; b.) uma interfase branca com proteínas; e c.) uma fase superior, aquosa, incolor, contendo RNA.

A porção com RNA foi transferida para um tubo de 2 ml e adicionado álcool isopropílico na proporção de 0,5 ml/1 ml de Trizol. E então, foi feita mais uma agitação manual por inversão, 10 vezes, e foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente, e posteriormente, foram centrifugadas a 12000 x g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o precipitado de RNA é visualizado por um pellet, um gel esbranquiçado e semitransparente. Este foi lavado com álcool etílico 75% na proporção de 1ml/1ml de Trizol, passado no vórtex, e centrifugado a 7500 x g por 5 minutos à 2°C. O sedimento de RNA foi diluído em 100 µL de água ultrapura.

b. Análise da qualidade do RNA

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

c. Reação de Transcrição Reversa (miRNA)

A transcrição reversa dos miRNAs obtidos do córtex renal e glomérulos isolados foi realizada utilizando o kit *TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Life Technologies, EUA) combinado com o *Stem-loop RT Primers* (Life Technologies, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Esse sistema permite a transcrição reversa apenas de miRNAs maduros e não é afetado pela contaminação com DNA genômico. Para a reação foram utilizados 3 µL (10 ng) de RNA total ao qual serão adicionados os seguintes componentes do kit: *RT Primers* (10X), *dNTPs* (100 mM), *MultiScribe[™] Reverse Transcriptase* (50 U/µL), *10X RT Buffer*, *RNase Inhibitor* (20 U/µL) e o volume completado para 4,5 µL com água livre de nucleases. A mistura foi incubada nas seguintes condições: 40 ciclos de 16 °C por 2 min., 42 °C por 1 min. e 50 °C por 1 seg. seguido, da inativação da transcriptase reversa a 85 °C por 5 min.

d. PCR quantitativo em Tempo Real (miRNA)

Cada amostra de cDNA foi analisada com o RT-qPCR TaqMan MicroRNA Assays (Life Technologies, EUA). Cada ensaio (*primers* e sonda) é capaz de discriminar miRNAs maduros que diferem em apenas uma base, utilizando-se pequena quantidade de RNA inicial. Para cada reação, foram utilizados 10 μL de TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (2X), 2 μL de TaqMan MicroRNA Assay Mix (Life Technologies, USA), 1,5 μL do produto da reação de transcrição reversa e o volume final ajustado para 20 μL com água livre de nucleases. Foram utilizadas as seguintes condições de ciclagem: 95 °C por 10 min., seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15s e 60 °C por 1 min.. As reações foram realizadas no Sistema de PCR em Tempo Real 7900 HT (Life Technologies, EUA). Os valores de Cq foram calculados utilizando o software SDS 2.1, utilizando a configuração automática de *baseline* e um *threshold* de 0,2. O Cq (ciclo de quantificação) refere-se ao ponto de encontro entre a curva de amplificação corrigida pelo *baseline* e o *threshold* (de acordo com o RDML, [HTTP://rdml.org](http://rdml.org)). A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada pelo método do Cq comparativo ($\Delta\Delta\text{Cq}$).

e. Reação de Transcrição Reversa (mRNA)

A transcrição reversa dos mRNAs obtidos do córtex renal e glomérulos isolados foi realizada utilizando o kit *High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix* (Life Technologies, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Para a reação foram utilizados 4 μL de *Master Mix* para a transcrição reversa ao qual foi adicionado 1 μg de RNA e o volume completado para 20 μL com água livre de nucleases. A mistura foi incubada nas seguintes condições: 25 °C por 5 min.,

42 °C por 30 min. seguido da inativação da transcriptase reversa a 85 °C por 5 min.

f. PCR quantitativo em Tempo Real (mRNA)

Para a análise do nível de expressão do gene ZEB 1, ZEB 2, desmina, fibronectina, ZO-1, E-caderina, TGF β -1, colágeno 1 α 1 e colágeno 1 α 2 no córtex renal e nos glomérulos isolados, primeiramente o RNA foi transcrito reversamente, como citado acima. O RT-qPCR foi realizado com SYBR green Master Mix, utilizando primers específicos para cada gene (TABELA 2). As reações foram feitas em um volume total de 20 μ L, usando 5 μ L de cDNA (diluído 1:100), 10 μ L SYBER green Master Mix (Life Technologies, EUA) e 2,5 μ L de cada primer específico (5 nM) e realizadas no sistema ABI Prism 7300 PCR em tempo real (Life Technologies, EUA). As condições de amplificação foram: 95°C durante 10 minutos; 45 ciclos de 95°C durante 15 segundos e 60°C durante 1 minuto.

5.2. Análises da expressão

A análise do nível de expressão dos miRNAs ou dos mRNA foram obtidos para cada gene e o grupo do córtex e dos glomérulos isolados foram comparados com seu respectivo grupo controle. A expressão dos miRNAs foi normalizada utilizando a expressão dos genes de referência snRNA U6 e snRNA U87 (adesão: NR_004394 e AF272707, respectivamente). E para a expressão do mRNA, os genes GAPDH, β -actina e TBP.

A expressão gênica relativa foi avaliada através do método de quantificação comparativo (40). Todas as quantificações relativas foram

avaliadas usando o software DataAssist, v 3.0, utilizando o método $\Delta\Delta CT$. A eficiência da PCR foi calculada por regressão linear do aumento da fluorescência na fase exponencial no programa LinRegPCR v11.1 (42).

Tabela 2: Genes alvos.

GENES	Sequência do primer (Forward)	Sequência do primer (Reverse)
ZEB 1	5'-CATTGATTGAGCACATGCG-3'	5'-AGCGGTGATTCA TGTGTTGAG-3'
ZEB 2	5'-CCCTTCTGCGACATAAATACGA-3'	5'-TGTGATTCA TGTGCTGCGAGT-3'
DESMINA	5'-GCGTGACAACCTGATAGACG-3'	5'-GTTGGATTTCCCTCCTGTAGTTTG-3'
FIBRONECTINA	5'-AGACCCCAGGCACCTATCAC-3'	5'-TGGCCGTTTCAGGAAGGTTG-3'
TGF β -1	5'-GGACTCTCCACCTGCAAGAC-3'	5'-GACTGGCGAGCCTTAGTTTG-3'
COL1 α 2	5'-ACAAGGTGCTCGTGGTTTCC-3'	5'-GCACCAGGCTGTCCTTTCAA-3'
E-CADERINA	5'-ATGAGGTCGGTGCCCGTATT-3'	5'-CTCGTTGGTCTTGGGGTCTGT-3'
ZO-1	5'-GAGGCTTCAGAACGAGGCTATTT-3'	5'-CATGTCCGAGAGTAGAGGTTCCGA-3'
COL1 α 1	5'-ACCTGTGTGTTCCCACTCA-3'	5'-CTTCTCCTTGGGGTTTGGGC-3'

5.3. Predição de alvos de miRNAs

A predição bioinformática de genes alvos e sítios de ligação dos miRNAs foi realizada utilizando-se três programas diferentes:

- miRANDA ([HTTP://www.microrna.org](http://www.microrna.org))
- PicTac ([HTTP://pitac.mdc-berlin.de](http://pitac.mdc-berlin.de))
- TargetScan ([HTTP://genes.mit.edu/targetscan/index.html](http://genes.mit.edu/targetscan/index.html))

As listas de genes preditos foram confrontadas e apenas alvos em comum serão utilizados para a avaliação dos mRNAs e suas respectivas proteínas. A expressão e localização de proteínas, potencialmente alteradas, foram feitas por western blotting e imunohistoquímica.

5.4. Coleta para Western Blotting

Os animais de 12 dias e 16 semanas foram sacrificados por laparotomia e os rins removidos imediatamente, pesados, e após o desencapsulamento e retirada da medula, foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C até o processamento. Os rins foram homogeneizados rapidamente, em homogeneizador tipo Polytron a 4°C , em tampão de extração, depois foi adicionado Triton 10%, os extratos foram centrifugados a 11000 rpm a 4°C em centrifuga refrigerada por 40 minutos, e o sobrenadante foi retirado para ser utilizado no ensaio, e conservado em freezer a -80°C . A quantificação de proteína foi realizada pelo método de Bradford e a leitura realizada no leitor de Elisa.

A escolha da porcentagem do gel resolving dependere do peso molecular da proteína a ser pesquisada. Após o preparo do gel resolving e o gel stacking, as amostras na concentração de 2:1 do tampão da amostra (tampão Laemmli), foram aquecidas em banho a 100°C por 5 minutos, e aplicadas utilizando uma ponteira de ponta fina e comprida. Posteriormente as proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, sob 120 V, até o marcador de peso molecular sair do gel. O próximo passo foi a transferência das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose, com um tampão de transferência, sob 400 miliamperes a 4°C .

Foi realizado o bloqueio das ligações inespecíficas com BSA 3%, por uma hora e meia. E então a membrana foi incubada com o anticorpo primário overnight. Os anticorpos utilizados foram: cytokeratin (Santa Cruz; 1: 500), TGF- β 1 (Santa Cruz; 1: 500), colágeno I (Sigma; 1: 10000), ZEB 1(Santa Cruz; 1: 500), ZEB 2 (Santa Cruz; 1: 500), E-caderina (Santa Cruz; 1: 500),

fibronectina (Santa Cruz; 1: 500), desmina (Santa Cruz; 1: 500), ZO-1 (Santa Cruz; 1: 500). Após lavagem com solução basal (6 vezes de 5 minutos), a membrana foi incubada com anticorpo secundário por duas horas em temperatura ambiente. Novamente a membrana foi lavada com solução basal (6 vezes de 5 minutos).

Utilizando-se luminol (kit Pierce), solução reveladora, as bandas imunoreativas foram detectadas. E as imagens obtidas foram escaneadas e a intensidade das bandas foram quantificadas por densidade ótica (Scion Image Corporation).

Os valores obtidos foram utilizados para análise estatística, foi realizado teste T de Student, e considerado significativo quando $p < 0,05$.

5.5. Coleta para Imonohistoquímica

Nos animais de 12 dias e 16 semana foi feito perfusão, com solução salina heparinizada, para remover o sangue, e posteriormente paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7.4, os rins desses animais ficaram imersos por uma hora no mesmo fixador utilizado. Depois foram lavados em água corrente por uma hora e então ficarão imersos em álcool 70% até serem processados. Ambos os materiais foram desidratados, diafanizados e incluídos em paraplast e os rins foram seccionados em micrótomo, com espessura de 5 μ m, e colocados em lâminas silanizadas. Os cortes histológicos, aderidos em lâminas silanizadas, foram desparafinizados e hidratados, e após serem lavados em PBS pH 7,2 por 5 minutos, foi feita a recuperação antigênica com tampão citrato pH 6,0, por 25 minutos na panela de pressão. As lâminas foram lavadas em PBS por 3 vezes (5 minutos cada). Posteriormente foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena

com peróxido de hidrogênio e metanol, por 10 minutos, no escuro. Os cortes foram lavados em PBS por 3 vezes. O próximo passo é o bloqueio de ligações inespecíficas do anticorpo, para tal as lâminas foram incubadas com solução bloqueadora (leite em pó desnatado 5%, MOLICO, em PBS), por 1 hora. Os cortes foram circulados com caneta hidrofóbica, e então, incubados com o anticorpo primário diluído em BSA 1%, em câmara úmida, overnight, sob refrigeração. Após lavagem com PBS (3 vezes com intervalos de 5 minutos) os cortes foram expostos ao anticorpo secundário específico, diluído em BSA 1%, durante 2 horas à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas com PBS (3 vezes com intervalos de 5 minutos). Os cortes foram revelados com DAB, após lavagens sucessivas com água corrente, as lâminas foram contra coradas com hematoxilina, desidratadas e montadas com lamínula, utilizando-se permount. As imagens foram obtidas utilizando-se o microscópio óptico.

- Solução de anticorpo primário: anticorpo foi diluído em solução de BSA 1% conforme as concentrações: cytokeratin (Santa Cruz; 1: 200), TGF- β 1 (Santa Cruz; 1: 100), colágeno I (Sigma; 1: 1000), ZEB 1(Santa Cruz; 1: 200), ZEB 2 (Santa Cruz; 1: 200), E-caderina (Santa Cruz; 1: 200), fibronectina (Santa Cruz; 1: 100), desmina (Santa Cruz; 1: 200), ZO-1 (Santa Cruz; 1: 200).

- Solução anticorpo secundário: anticorpo foi diluído em solução de BSA 1%, de acordo com o animal em que o anticorpo primário foi produzido; todos na concentração de 1: 200.

6.0. Análises Estatísticas

Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão. E a comparação entre os dois grupos foi realizada com teste t Student; utilizando o software GraphPad Prisma v 5.01 (GraphPad Software, Inc., USA). Médias foram comparadas e quando o valor de p fosse menor do que 0,05 a diferença foi considerada estatisticamente significativa.

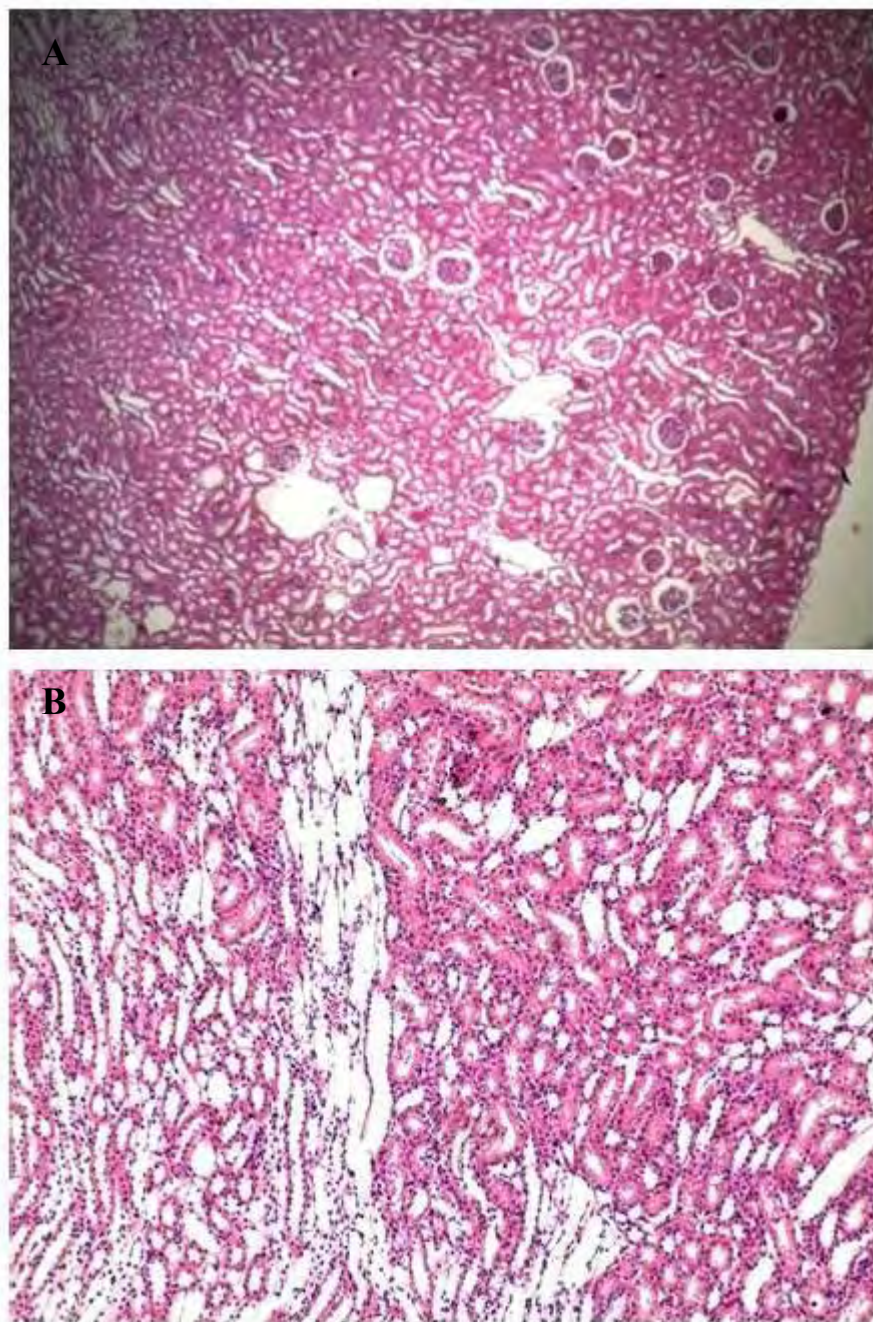


Figura 9: Regiões utilizadas para RT-qPCR: córtex e cortiço-medular. Coloração de hematoxilina e eosina (HE). (A) aumento de 4X e (B) aumento de 10X.