

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 20/12/2018.



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



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

Letícia de Barros Sene

**Botucatu-SP
2016**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

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

Letícia de Barros Sene

Orientadora: Dra. Patrícia Aline Boer

Co-Orientador: Dr. Wellerson Rodrigo Scarano

Colaborador: Dr. José Antonio Rocha Gontijo

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

Orientadora: Dra. Patricia Aline Boer

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

Sene, Leticia de Barros.

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

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

Orientador: Patrícia Aline Boer

Coorientador: Wellerson Rodrigo Scarano

Capes: 20600003

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

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

Botucatu, 20 de dezembro de 2016.

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

Banca Examinadora

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Aline Boer

Membros

Profa. Dra. Priscylla Tatiana C. G. Okamoto

Profa. Dra. Guiomar Nascimento Gomes

Profa. Dra. Ana Paula Coelho Balbi

Dr. Bruno Fantinatti

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

(Theodore Roosevelt)

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

(Arthur Schopenhauer)

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

RESUMO

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

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

ABSTRACT

ABSTRACT

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

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

Lista de Abreviaturas

BCL6 – *B-cell lymphoma 6*.

BU – Broto do ureter

CEMIB – Centro de Bioterismo da UNICAMP.

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais.

CM – Cap mesenquimal.

Col 1 – Colágeno tipo 1.

DAG – Distância anogenital.

DE – Diferencialmente expressos.

DEX - Dexametasona

DNA – Ácido desoxirribonucleico.

EMT – Transição epitélio mesenquimal.

FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura.

GDNF – *Glial cell neurotrophic factor*.

IGF1 – *Insulin-like growth factor 1*.

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

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

MAP2K2 – *Mitogen activated protein kinase kinase 2*.

MET – Transição mesênquima epitelial.

MI – Mesoderma intermediário.

miRNAs, miRs – microRNAs.

MKI67 – *Marker of proliferation ki-67*.

MM – Mesênquima metanefrogênico

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro.

MTOR – *Mechanistic target of rapamycin*.

MYC – *Myelocytomatosis oncogene*.

NGS – Sequenciamento de nova geração

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

PCNA – Proliferation cell nuclear antigen.

PCR – Reação em cadeia da polimerase.

PRDM1 – *PR/SET domain 1*.

RNA – Ácido ribonucleico.

RET – *Ret proto-oncogene*.

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

SIX2 – *SIX homeobox 2*

TGF β -1 – *Transforming growth fator beta 1.*

VEGF – *Vascular endothelial growth factor.*

WT1 – *Wilms' tumor 1.*

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

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

11 β -HSD2 – 11- β -hidroxiesteróide desidrogenase do tipo 2.

17 DG – 17 dias gestacionais (c).

21 DG – 21 dias gestacionais (a).

7 DPN – 7 dias pós-natal (b).

Lista de Figuras

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

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

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

Lista de Tabelas

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

SUMÁRIO

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

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CONCLUSÃO

VI. CONCLUSÕES

Os principais achados:

No 17 DG:

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

No 21 DG:

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

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

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

No 7 DPN:

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

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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