

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

REGINA SOUZA AIRES

**DESNUTRIÇÃO MATERNA E INIBIÇÃO DA CICLOOXIGENASE 2:
REPERCUSSÃO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO PLACENTÁRIO,
REGULAÇÃO MATERNA DE VOLUME E DESENVOLVIMENTO RENAL FETAL**

Recife
2015

REGINA SOUZA AIRES

**DESNUTRIÇÃO MATERNA E INIBIÇÃO DA CICLOOXIGENASE 2:
REPERCUSSÃO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO PLACENTÁRIO,
REGULAÇÃO MATERNA DE VOLUME E DESENVOLVIMENTO RENAL FETAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Inovação Terapêutica da Universidade
Federal de Pernambuco, para a obtenção
do Título de Mestre em Inovação
Terapêutica.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Durce Oliveira da Paixão

Recife
2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Aires, Regina Souza

Desnutrição materna e inibição da ciclooxigenase 2: repercussão sobre o estresse oxidativo placentário, regulação materna de volume e desenvolvimento/ Regina Souza Aires – Recife: O Autor, 2015.

75 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Ana Durce Oliveira da Paixão

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Inovação Terapêutica, 2015.

Inclui bibliografia

- 1. Desnutrição 2. Feto- desenvolvimento I. Paixão, Ana Durce Oliveira da (orientadora) II. Título**

616.39

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015- 175

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: AIRES, Regina Souza

Título: DESNUTRIÇÃO MATERNA E INIBIÇÃO DA CICLOOXIGENASE 2:
REPERCUSSÃO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO PLACENTÁRIO,
REGULAÇÃO MATERNA DE VOLUME E DESENVOLVIMENTO RENAL FETAL

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do
título de Mestre em Inovação Terapêutica

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Profa. Dra. Paloma Lys De Medeiros (Titular interno)

Instituição: Departamento de Histologia e Embriologia - UFPE

Assinatura: _____

Profa. Dra. Gardênia Carmen Gadelha Militão (Titular externo)

Instituição: Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFPE

Assinatura: _____

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira (Titular externo)

Instituição: Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE

Assinatura: _____

Dr. Edjair Vicente Cabral (Suplente externo)

Instituição: Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFPE

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A minha querida mãe Graciete Aires por todo amor e proteção, ao meu pai Reginaldo Souza (*in memorian*) pelos ensinamentos jamais esquecidos. Ao meu amigo Jorge Peixoto (*in memorian*) por todos os momentos de alegria e risadas compartilhadas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar a força e a proteção necessária para seguir em frente. Por me proporcionar grandes conquistas. E claro, pelo dom da vida.

À minha família, por formarem uma estrutura sólida que me proporcionou crescer e seguir no caminho certo.

À professora Ana Durce Oliveira da Paixão, por se empenhar no papel de educadora compartilhando seus conhecimentos. Agradeço pela orientação acadêmica e por ter me ajudado na construção, no andamento e na conclusão deste trabalho.

Ao professor Leucio Duarte, pela consideração e ajuda fundamental para elaboração deste trabalho.

A todos os integrantes que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Renal, que de formas variadas contribuíram para a construção desse trabalho e que por vezes sacrificaram seus tempos, finais de semana, feriados, em virtude dos experimentos aqui apresentados.

Aos integrantes do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e também do Departamento de Biofísica, pela disposição em ceder tempo, espaço e auxílio com os equipamentos.

Às técnicas do CETENE, “Gaby” e “Josy” pela colaboração na realização de parte dos experimentos.

A Paulo Germano pela sua competência, paciência e colaboração ao longo do mestrado.

A todos os mestres que foram tão importantes na minha vida acadêmica e no desenvolvimento desta dissertação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica e à Universidade Federal de Pernambuco por proporcionar-me um ótimo perfil acadêmico para a vida profissional.

Às instituições de fomento, em especial a CAPES pela bolsa concedida durante meus dois anos de mestrado.

À minha irmã Raiane Souza Aires por estar junto comigo nessa jornada, apoiando-me.

A Pablo Vasconcelos pelo seu amor e companheirismo. Por estar ao meu lado em momentos difíceis e compartilhar momentos de alegria.

E sem dúvidas, aos meus pais Reginaldo Souza (*in memoriam*) e Graciete Aires por terem iniciado minha vida e possibilitado todas as minhas conquistas que pertencem acima de tudo a eles.

"Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia. Pois o triunfo pertence a quem se atreve."

Charles Chaplin

RESUMO

AIRES, Regina Souza. Desnutrição Materna e Inibição da Ciclooxigenase 2: Repercussão sobre o Estresse Oxidativo Placentário, Regulação Materna de Volume e Desenvolvimento Renal Fetal. 2015. Dissertação. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Neste trabalho, nimesulida, um inibidor preferencial da ciclooxigenase-2 (COX-2), foi utilizado na investigação de um possível elo entre a inflamação induzida por desnutrição, que culmina com o aumento do estresse oxidativo placentário e a regulação do volume extracelular materno. Além disso, devido à importância da COX-2 durante a nefrogênese, o desenvolvimento renal fetal também foi investigado. Ratas Wistar prenhes foram mantidas com dieta *ad libitum*, o grupo controle (n=12) ou com 50% de restrição dietética, o grupo desnutrido (n=12). Parte de cada grupo (n=6) foi tratada com nimesulida (5mg/kg/dia, via oral) do 7º ao 20º dia de gestação, formando os grupos controle nimesulida e desnutrido nimesulida. A gravidez foi suspensa no 20º dia para avaliação do estresse oxidativo placentário e hepático materno, bem como do estresse oxidativo hepático fetal e desenvolvimento renal fetal, apenas dos fetos machos. Além disso, parâmetros maternos indicadores de volemia foram avaliados. O estresse oxidativo foi avaliado pela mensuração da peroxidação lipídica e dos níveis de glutatona reduzida. O desenvolvimento renal fetal foi avaliado através da medida da área nefrogênica, e pela expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e expressão tecidual da angiotensina II, por imunohistoquímica. A expressão proteica da COX-2 foi avaliada por imunoblotting. As diferenças estatísticas entre os grupos foram avaliadas utilizando two way ANOVA seguida pelo teste Bonferroni, com diferenças significantes para $p < 0,05$. Restrição alimentar da ordem de 50% levou a um aumento do balanço hídrico para manter o volume plasmático materno, apesar do déficit de sódio produzido pela dieta. A peroxidação lipídica apresentou-se aumentada no fígado materno, placenta e fígado fetal de ratos desnutridos, embora a expressão proteica de COX-2 na placenta destas mães tenha se apresentado diminuída. Marcadores do desenvolvimento renal indicaram um retardo na nefrogênese em fetos desnutridos. A nimesulida impediu o aumento do balanço hídrico nas mães desnutridas, assim como, previniu o aumento na peroxidação lipídica no fígado materno, na placenta e no fígado fetal. No entanto, a nimesulida produziu um retardo na nefrogênese. Pode-se concluir que o estresse oxidativo placentário, observado em mães desnutridas é mediado pela atividade da COX-2. No entanto, a atividade da COX-2 se faz necessária para manter a homeostase do volume extracelular materno em ratas grávidas desnutridas e também é necessário para manter o desenvolvimento renal fetal.

Palavras-chave: Desnutrição. Inibição da COX-2. Estresse oxidativo placentário. Desenvolvimento fetal.

ABSTRACT

AIRES, Regina Souza. Maternal malnutrition and Inhibition of Cyclooxygenase 2: Effect on Oxidative Stress Placental, Maternal Regulation Volume and Development Fetal Renal. 2015. Dissertation. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

In this work, nimesulide, a preferential cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor, was used to investigate whether it could be a link between undernutrition-induced inflammation that culminates with increased placental oxidative stress and maternal handling of extracellular volume. Furthermore, because of the importance of COX-2 during nephrogenesis, fetal kidney development was also investigated. Pregnant Wistar rats were maintained with ad libitum diet, the control group or 50% of dietary restriction, the undernourished group. Part of each group was treated with nimesulide (N, 5mg/kg/ day in drinking water), forming the groups control nimesulide and undernourished nimesulide. Pregnancy was suspended on 20th day for assessment of placental, maternal and fetal liver and fetal kidney development from male fetuses. Moreover, indicators of maternal blood volume parameters were evaluated. Oxidative stress was assessed by measuring lipid peroxidation and reduced glutathione (GSH) levels. Fetal kidney development was assessed by measuring nephrogenic zone and the presence of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and presence of angiotensin II by immunohistochemistry. Protein expression of cyclooxygenase was assessed by immunoblotting. Statistical differences between groups were evaluated using two-way ANOVA followed by the Bonferroni test for significant differences with $P < 0.05$. Fifty percent dietary restriction led to increased water balance to maintain plasma volume, despite the restricted sodium intake. Lipid peroxidation was increased in maternal liver, placenta and fetal liver of undernourished rats, although COX-2 protein expression was reduced in placenta. Markers of fetal kidney development indicated a delayed nephrogenesis in undernourished fetuses. Nimesulide prevented the increment of water balance in undernourished mothers, prevented the increment in lipid peroxidation in maternal liver, placenta and fetal liver and recovered COX-2 expression in placenta of undernourished mothers. However, nimesulide produced a delay on nephrogenesis. It may be concluded that COX-2 activity mediates the placental oxidative stress in undernourished mothers. However, COX-2 activity is necessary to maintain maternal extracellular volume homeostasis in undernourished pregnant rats and also it is necessary to maintain the fetal kidney development.

Key Words: Undernutrition. COX-2 inhibitor. Placental oxidative stress. Fetal development.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figure 1. Deficiência materna em nutrientes e/ou alterações na placenta leva a restrição de crescimento fetal com consequentes alterações na organogênese	20
Figure 2. Comparação anatômica entre a placenta de ratos e de humanos	21
Figure 3. Biossíntese dos prostanóides.....	24
Figure 4. Desenvolvimento de estruturas primárias que precedem o rim.....	26
Figure 5. Desenvolvimento do néfron.....	27

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figure 1. Maternal handling of extracellular volume	58
Figure 2. Markers of oxidative stress in maternal liver, placenta and fetal liver	59
Figure 3. Expression of COX-2 protein in placenta.....	60
Figure 4. Expression of COX-2 protein and nephrogenic zone in fetal kidney.....	61
Figure 5. AngII immunolocalization in tubulointerstitial area and glomeruli.....	62
Figure 6. PCNA immunolocalization in glomeruli.....	64

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
ANG II	Angiotensina II
BSA	Albumina bovina sérica
COX	Ciclooxigenase
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético, do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EPM	Erro padrão da média
GPX	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione
MDA	Malondialdeído
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, do inglês <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen</i>
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PGG ₂	Prostaglandina G ₂
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PGI ₂	Prostaciclina
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
SRRA	Sistema renina angiotensina aldosterona
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TXA ₂	Tromboxano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 GERAL	17
2.2 ESPECÍFICOS	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 DESNUTRIÇÃO E DESENVOLVIMENTO FETAL	18
3.2 PLACENTA E DESENVOLVIMENTO INTRAUTERINO	20
3.3 ESTRESSE OXIDATIVO NA PLACENTA	21
3.4 PROSTANÓIDES NA PLACENTA: PAPEL NO ESTRESSE OXIDATIVO	23
3.5 INIBIDORES DA COX-2	25
3.6 DESENVOLVIMENTO RENAL	26
3.7 COX-2 NO DESENVOLVIMENTO RENAL	29
4 METODOLOGIA	31
4.1 MATERIAIS	31
4.2 ASPECTOS ÉTICOS	31
4.3 ANIMAIS	31
4.4 PARÂMETROS METABÓLICOS	32
4.5 INDICADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO	33
4.6 SDS-PAGE E WESTERN BLOTTING	34
4.7 MARCADORES DE DESENVOLVIMENTO RENAL FETAL	35
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
5 RESULTADOS	37
5.1 ARTIGO: CYCLOOXYGENASE-2 DERIVATIVES MEDIATE OXIDATIVE STRESS IN PLACENTA OF UNDERNOURISHED RATS	38
6 CONCLUSÃO	65
7 PERSPECTIVAS	66
REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

Fatores ambientais adversos, como a desnutrição intrauterina têm potencial para perturbar processos de proliferação e diferenciação celular (LANGLEY-EVANS, 2006). Muitos são os fatores envolvidos nesse processo, existindo uma forte interação entre mãe, placenta e feto. Tendo em vista que o feto adapta-se ao ambiente adverso, este pode vir a apresentar alterações irreversíveis no seu desenvolvimento anatômico e funcional (MURPHY et al., 2006). Em curto prazo, essas alterações são importantes, porém aumentam o risco do desenvolvimento de doenças na vida adulta, como hipertensão, doenças cardiovasculares e doenças renais (ZANDI-NEJAD et al., 2006).

A dieta materna influencia diretamente o desenvolvimento do feto, por isso, o fornecimento adequado de nutrientes durante a organogênese e crescimento fetal é imprescindível para que não ocorram danos celulares irreversíveis. Desnutrição intrauterina pode levar a vasoconstrição placentária e assim reduz o aporte nutricional necessário para o desenvolvimento fetal (HOET; HANSON, 1998; WHU et al., 2012). Quando ocorre uma redução no fluxo sanguíneo uteroplacentário, a disponibilidade de nutrientes para o feto é prejudicada. Isso compromete o desenvolvimento fetal e conseqüentemente, retarda o crescimento intrauterino (BELKACEMI, et al., 2011).

A placenta, durante o desenvolvimento embrionário, contribui para manutenção e viabilidade da gestação, e é através dela que os nutrientes da mãe passam para o feto. Por suas propriedades, a placenta desempenha um papel fundamental na etiologia da programação de desenvolvimento através do seu impacto sobre o transporte de nutrientes (BRETT et al., 2014).

Durante o período gestacional, as repercussões da má-nutrição podem envolver deficiências de proteínas e/ou micronutrientes relacionados com a ação antioxidante (BLOCK et al., 2002). A placenta como fonte de peróxidos lipídicos é um local vulnerável ao estresse oxidativo (MUTLU-TURKOGLU et al., 1998). Além do mais, a elevação do estresse oxidativo diminui a biodisponibilidade de óxido

nítrico nas células trofoblásticas, evento que contribui com vasoconstrição placentária (KAY et al., 2000), e diminuição do aporte de nutrientes para os fetos.

Estresse oxidativo elevado na placenta tem sido um fator relacionado com o estímulo da síntese de tromboxano (TXA₂) e simultânea inibição da síntese de PGI₂ (WALSH, 2004), levando a vasoconstrição placentária e comprometimento da nutrição fetal. A diminuição na relação PGI₂/TXA₂ na interface materno-fetal pode contribuir para pré-eclâmpsia, restrição de crescimento intrauterino e hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido (MAJED; KHALIL, 2012).

A produção de ROS, além de ser dependente de atividade aumentada da NADPH oxidase, também é regulada por metabólitos do ácido araquidônico originados da atividade das COXs. Desse modo, a inibição da COX pode diminuir o estresse oxidativo placentário. Esses inibidores da COX tem amplo espectro de atuação para analgesia, inflamação e profilaxia contra doenças cardiovasculares. No entanto persistem os efeitos adversos na função renal, moderados sintomas gastrointestinais (dispepsia, náusea) e prováveis consequências cardiovasculares e na fertilidade, efeitos atribuídos, em sua maioria, a inibição da COX-1, ao contrário dos efeitos terapêuticos resultantes da inibição da COX-2 (DARMMANN, 1999).

Há evidências que suportam a ideia de que inibidores da COX-2 podem reduzir a presença de ROS e diminuir atividade da NADPH oxidase (KOPFF ET al., 2007; LV et al., 2007; LÓPEZ-VILLODRES et al., 2012; MARTINEZ-REVELLES et al., 2012). No entanto há divergências quanto à segurança desses agentes durante a gestação. Na clínica, os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) são comumente utilizados para prevenir o parto prematuro (SAWDY, 1997; LOUDON, 2003), ou ainda para tratar ou prevenir a persistência do canal arterial em recém-nascidos prematuros (IRMESI et al., 2014). A utilização de AINEs nesse período pode comprometer a organogênese, uma vez que prostanóides derivados da COX-2 são importantes para o desenvolvimento de alguns órgãos, como os rins. Inibir COX-2 durante o período de desenvolvimento renal pode retardar nefrogênese e promover alterações na hemodinâmica renal em idades tardias (SILVA, 2010; REVERTE et al., 2011).

Alterações na expressão da COX-2 durante a nefrogênese reduzem volume cortical e comprometem desenvolvimento glomerular (KÖMHOFF et al., 2000). Por

outro lado, a desnutrição materna interfere na regulação de genes envolvidos na morfogênese renal, e também altera a expressão de prostaglandinas no feto. Essas alterações se estendem até a vida adulta, com expressão de COX-2 diminuída, em paralelo com elevação dos níveis pressóricos (BRENNAN et al., 2006).

Assim, compreender o papel dos prostanóides no controle celular e homeostase corpórea, bem como os mecanismos subjacentes das suas ações podem fornecer importantes informações sobre os caminhos para o desenvolvimento de novas terapias para doenças inflamatórias e hipertensão. Na desnutrição produzida por 50% de restrição alimentar, COX-2 poderia ser um elo entre a inflamação induzida pela desnutrição e manuseio materno de volume extracelular.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Investigar os efeitos da inibição da ciclooxigenase 2 em um modelo de desnutrição, produzida por 50% de restrição alimentar.

2.2 ESPECÍFICOS

- Investigar os efeitos da inibição da ciclooxigenase 2 sobre o volume plasmático em ratas normonutridas e desnutridas;
- Investigar os efeitos da inibição da ciclooxigenase 2 sobre a peroxidação lipídica na placenta e no tecido hepático materno e fetal;
- Investigar os efeitos da inibição da ciclooxigenase 2 sobre o desenvolvimento renal.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 DESNUTRIÇÃO E DESENVOLVIMENTO FETAL

O ambiente no qual o feto se desenvolve é determinante para sua vida pós-natal (FOWDEN et al., 2006). Muitos são os fatores envolvidos nesse processo, existindo uma forte interação entre mãe e o feto. É através da placenta que os nutrientes e oxigênio oriundos da mãe passam para o feto, influenciando o fornecimento de nutrientes e a produção de hormônios que regulam o metabolismo materno. Fatores ambientais adversos que atuam durante o período de desenvolvimento têm o potencial para perturbar os processos de proliferação e diferenciação celular (LANGLEY-EVANS, 2006).

Tendo em vista que o feto adapta-se ao ambiente adverso, este pode vir a apresentar alterações irreversíveis no seu desenvolvimento anatômico e funcional (MURPHY et al., 2006). Em curto prazo, essas alterações são importantes, porém aumentam o risco do desenvolvimento de doenças na vida adulta (ZANDI-NEJAD et al., 2006). Essa é a descrição da hipótese de programação intrauterina, a qual mostra que alterações no ambiente intrauterino podem induzir alterações na programação metabólica e aumentar a susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças crônicas na idade adulta (BARKER et al., 2006; BAVDEKAR et al., 1999; HALLAN et al., 2008).

A dieta materna influencia diretamente o desenvolvimento do feto, por isso, o fornecimento adequado de nutrientes durante a organogênese e crescimento fetal é imprescindível para que não ocorram danos celulares irreversíveis. A má-nutrição durante o período gestacional pode induzir adaptações metabólicas maternas, que podem levar a vasoconstrição placentária e assim reduzir o aporte nutricional necessário para o desenvolvimento fetal (HOET; HANSON, 2008; WHU et al., 2012). Quando ocorre uma redução no fluxo sanguíneo uteroplacentário, a disponibilidade de nutrientes para o feto é prejudicada. Isso compromete o desenvolvimento fetal e consequentemente, retarda o crescimento fetal (BELKACEMI, et al., 2011).

Assim, desnutrição materna, bem como alterações no fluxo sanguíneo uteroplacentário podem comprometer a nutrição fetal e levar a prejuízos no

crescimento e maturação de alguns órgãos. Há retardo no desenvolvimento renal e cardíaco, evidenciado por uma redução no número de néfrons e de cardiomiócitos, respectivamente (ZOHDl et al., 2014). Essas alterações estão relacionadas com restrição do crescimento intrauterino, baixo peso ao nascimento e risco aumentado de desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta, como doenças renais e hipertensão (BARKER et al., 2006; HALLAN et al., 2008; HENRY et al., 2010; HOY et al., 1999; ZOHDl et al., 2014). Além disso, outras consequências são observadas, com alterações nas funções cardiovasculares, endócrinas e metabólicas, pois também há alterações na função endotelial, no eixo hipotálamo-hipófise e no pâncreas através da secreção de insulina reduzida, respectivamente (LUCAS, 1992; HABEK et al., 2004; REIK et al., 2003; ZOHDl et al., 2014) (Figura 1).

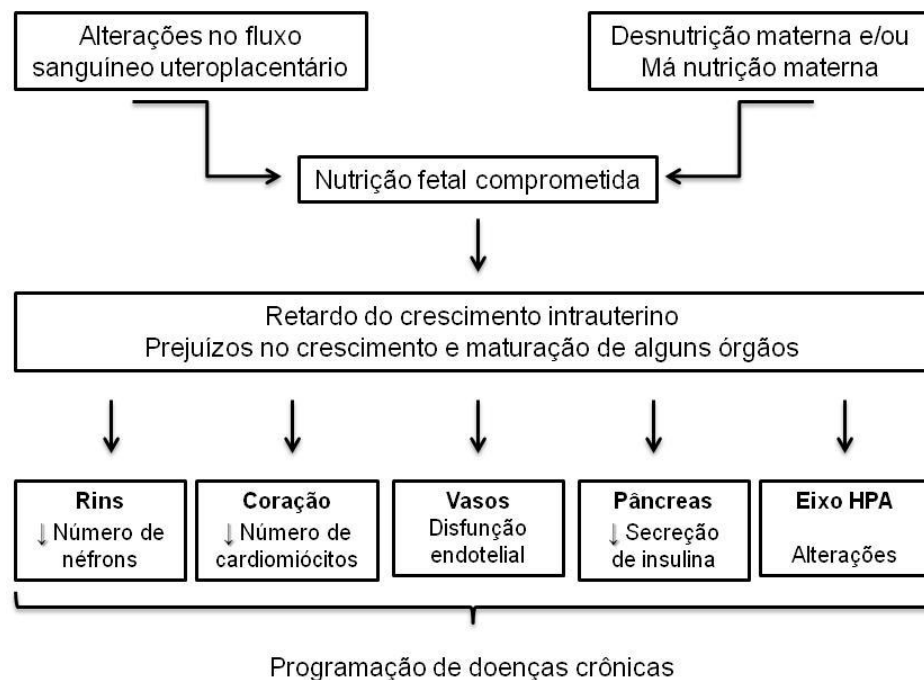


Figura 1. Deficiência materna em nutrientes e/ou alterações na placenta leva a restrição de crescimento fetal com consequentes alterações na organogênese. Estas alterações podem repercutir em doenças crônicas em longo prazo. **Modificado de ZOHDl et al., 2014.**

3.2 PLACENTA E DESENVOLVIMENTO INTRAUTERINO

Morfologicamente, a placenta do rato, se assemelha à dos humanos (Figura 2), por ter uma forma discoide e ser do tipo hemocorial, que significa que o tecido fetal penetra o endométrio a ponto de estar em contato com o sangue materno. Em ratos, a placenta se divide em duas principais zonas distintas, a zona juncional (ZJ) e a zona do labirinto (ZL), que executam diferentes funções (FURUKAWA et al., 2011). A ZJ é responsável principalmente, pela produção de hormônios, enquanto a ZL é a principal região de trocas metabólicas da placenta (GEORGIADES et al., 2002). A ZL sofre angiogênese rápida e intensa, resultando em expansão de capilares no espaço materno e fetal. Isso se torna necessário para garantir a eficiência placentária e o desenvolvimento do feto até o final da gravidez (COAN et al., 2004).

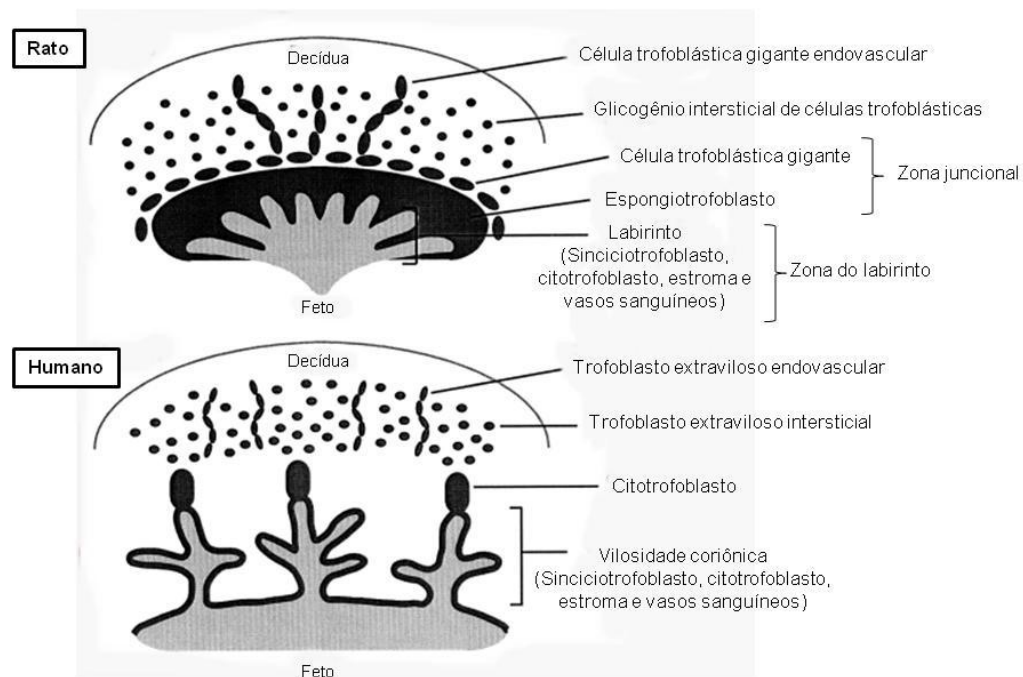


Figura 2. Comparação anatômica entre a placenta de ratos e de humanos. Traduzido de CROSS et al., 2003.

Durante o desenvolvimento embrionário, a placenta contribui para manutenção e viabilidade da gestação, e é através dela que os nutrientes da mãe passam para o feto. Por suas propriedades, a placenta desempenha um papel

fundamental na etiologia da programação de desenvolvimento através do seu impacto sobre o transporte de nutrientes (BRETT et al., 2014). Quando expostas a desnutrição materna, as placentas apresentam menor tamanho e mudanças estruturais, com alargamento da zona de troca de labirinto à custa da zona juncional (BURTON et al., 2012). Isso fornece uma capacidade de reserva funcional para maximizar o crescimento fetal durante a gestação tardia, quando o crescimento placentário é comprometido (COAN et al., 2008).

A maturação da placenta ocorre por uma sucessão de eventos que controlam a diferenciação das células trofoblásticas. Esses eventos são regulados pela interação de tensão de oxigênio, fatores de transcrição, hormônios, fatores de crescimento e outras moléculas de sinalização. Na ocorrência de um desenvolvimento placentário anormal, a invasão das células trofoblásticas para o útero torna-se limitada e prejudica a remodelação das artérias uterinas, o que se acredita ser uma causa da pré-eclampsia, doença grave caracterizada por hipertensão e proteinúria (JI et al., 2012), e que também pode ser causa de programação de doenças na vida intrauterina (FOWDEN et al., 2006).

Para que o crescimento fetal ocorra normalmente, é preciso que o aporte de oxigênio e nutrientes seja eficiente para suprir a demanda metabólica da gestação. Recentemente foi demonstrado que insuficiência uteroplacentária programa alterações vasculares na prole adulta (MAZZUCA et al., 2010). A elevação do estresse oxidativo é uma condição que pode induzir vasoconstrição (SILVA et al., 2012), e desse modo limitar os recursos de oxigênio e nutrientes, levando ao desenvolvimento de insuficiência uteroplacentária.

3.3 ESTRESSE OXIDATIVO NA PLACENTA

Espécies reativas de oxigênio (ROS), como ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), são resultantes do metabolismo celular normal e tem um papel importante no funcionamento e sinalização celular (SIMON et al., 1998; UTTARA et al., 2009). No entanto, são moléculas muito reativas que em altas concentrações podem danificar carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, e alterar suas funções. Por outro lado, os antioxidantes

endógenos, como superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR) e glutathione (GSH) são substâncias que neutralizam os radicais livres, reduzindo-os pela adição de um elétron do íon hidrogênio (SIES, 1997).

Em condições normais, o sistema antioxidante dos organismos aeróbios, é capaz de bloquear os efeitos nocivos do ROS. No entanto, quando as concentrações de ROS estão muito elevadas, ou quando os sistemas antioxidantes estão diminuídos, o estresse oxidativo, leva a perturbações na sinalização redox e consequente dano celular (BETTERIDGE, 2000). Dessa forma, o estresse oxidativo compromete o funcionamento de diversos tecidos e órgãos, o que contribui para o desenvolvimento de várias patologias, como câncer, envelhecimento, diabetes, doenças cardiovasculares e outras doenças degenerativas em humanos (BIRBEN et al., 2012; UTTARA et al., 2009).

Durante o período gestacional, as repercussões da má-nutrição podem envolver deficiências de proteínas e/ou micronutrientes relacionados com a ação antioxidante (BLOCK et al., 2002). A placenta como fonte de peróxidos lipídicos é um local vulnerável ao estresse oxidativo (MUTLU-TURKOGLU et al., 1998). Além do mais, a elevação do estresse oxidativo diminui a biodisponibilidade de óxido nítrico nas células trofoblásticas, evento que contribui para vasoconstrição placentária (KAY et al., 2000), e diminuição do aporte de nutrientes para os fetos.

Placentas de mães com pré-eclâmpsia e diabetes apresentam variações na sua função, que levam a diminuição da perfusão placentária. Estas alterações estão correlacionadas com estresse nitrosativo, que ocorre após o estresse oxidativo (MYATT; CUI, 2004). Além disso, a presença da NADPH oxidase, enzima envolvida na geração de ROS, em placentas normais reforçam o papel desta enzima no mecanismo de defesa placentária, contudo, sua atividade aumentada, pode estar relacionada à peroxidação lipídica na placenta (MATSUBARA; SATO, 2001).

No entanto, pouco se sabe sobre a programação nutricional da placenta e a influência de ROS no desenvolvimento fetal. Sabe-se que uma das vias de sinalização ativadas por ROS é a via de síntese de prostanóides (SIMÕES et al., 2015), e que estes, tem um papel fundamental na regulação da função placentária.

3.4 PROSTANÓIDES NA PLACENTA: PAPEL NO ESTRESSE OXIDATIVO

Prostanóides formam um grupo de mediadores lipídicos sintetizados a partir da ação das enzimas ciclooxygenases (COXs). Essas enzimas são responsáveis pela conversão inicial do ácido araquidônico a prostaglandina G_2 (PGG_2) e, subsequentemente, para prostaglandina H_2 (PGH_2) e por fim sintetizam os prostanóides: prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PGI_2) e tromboxanos (TXs), como podem ser observados na figura 3 (NARUMIYA, 2007).

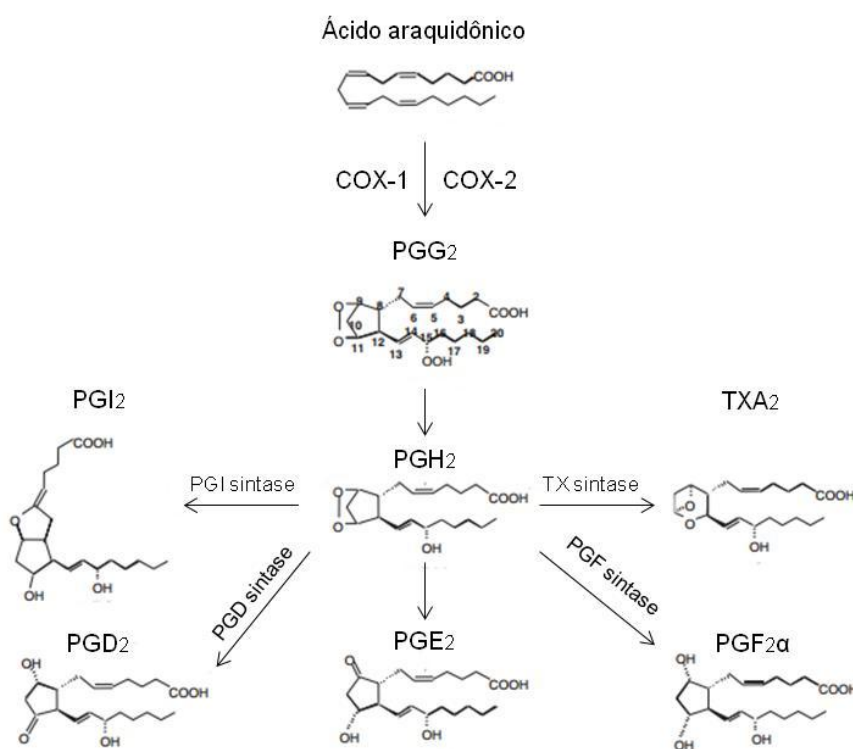


FIGURA 3. Biossíntese dos prostanóides. Ácido araquidônico é metabolizado pela ação das COXs, resultando na prostaglandina endoperóxido (PGG_2) e depois gerando PGH_2 , que é convertida a várias PGs e TXA_2 por suas sintases. Traduzido de NARUMIYA, 2007.

Devido a sua expressão constitutiva na maioria dos tecidos, a enzima ciclooxygenase 1 (COX-1) está envolvida primariamente na produção de prostanóides relevantes em processos fisiológicos, como proteção da mucosa gastrointestinal (BUJOK, et al., 2014), controle do fluxo sanguíneo renal (HARRIS et al., 1994), homeostasia, respostas imunológicas, funções pulmonares e do sistema nervoso central, cardiovasculares e reprodutivas (O'BANNION, 1999; SHEWCHUK, 2014). Enquanto a isoforma induzível da ciclooxygenase (COX-2) é majoritariamente responsável pela produção de prostanóides ligados a processos inflamatórios.

Recentemente, as ações da COX-2 têm sido associadas com processos que regulam a homeostase do epitélio vascular, através da síntese de PGs protetoras do epitélio contra danos gerados por tensão de cisalhamento (BATLOUNI, 2010).

Adicionalmente, foi proposto a existência de uma terceira isoforma, a ciclooxigenase 3 (COX-3), que ao contrário da COX-1 e COX-2, não produz prostanóides pró-inflamatórios, mas sim substâncias anti-inflamatórias, o que explicaria os períodos de remissão em casos de doenças inflamatórias crônicas, como artrite reumatoide (WILLOUGHBY et al., 2000).

As PGs e TXs exercem suas funções biológicas predominantemente através da ativação de receptores de membrana, acoplados a proteína G, na superfície de células alvo (MATSUOKA; NARUMIA, 2007). A partir da PGH_2 podem ser produzidas prostaglandinas ativas: prostaglandina D_2 (PGD_2), prostaglandina E_2 (PGE_2), prostaglandina F_2 ($PGF_2\alpha$) e a prostaglandina I_2 (PGI_2 ou prostaciclina) (NARUMIYA, 2007).

Ações gerais das prostaglandinas incluem, ação vasodilatadora sistêmica e renal, inibição da agregação plaquetária, recrutamento de leucócitos na resposta inflamatória, motilidade gastrointestinal, controle da secreção de HCl pela mucosa gástrica e controle do tônus muscular brônquico (BURDAN et al., 2006). Por outro lado, os tromboxanos são compostos derivados da PGH_2 pela ação da tromboxano A_2 sintetase. O tromboxano A_2 (TXA_2) é um potente vasoconstritor e agregador plaquetário, o que explica o seu potencial para a formação de trombos (KUMMER; COELHO, 2002; NARUMIYA, 2007).

Em relação ao período gestacional, os prostanoides estão em constante biossíntese e são fundamentais durante o parto. Em particular, a PGE_2 e PGF_2 são estimuladores potentes da contratilidade miometrial (THIEX et al., 2010). Além disso, na placenta, os prostanóides são responsáveis pela regulação do tônus vascular e resistência placentária (HAUSERMANN; ST-LOUIS, 2011). O equilíbrio PGI_2/TXA_2 é essencial para regulação da função vascular materna e fetal durante a gravidez e após o nascimento.

Estresse oxidativo elevado na placenta tem sido um fator relacionado com o estímulo da síntese de tromboxano (TXA_2) e simultânea inibição da síntese de PGI_2 (WALSH, 2004), levando a vasoconstrição placentária e comprometimento da nutrição fetal. A diminuição na relação PGI_2/TXA_2 na interface materno-fetal pode

contribuir para pré-eclâmpsia, restrição de crescimento intrauterino e hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido (MAJED; KHALIL, 2012).

A produção de ROS, além de ser dependente de atividade aumentada da NADPH oxidase, também é regulada por metabólitos do ácido araquidônico originados da atividade das COXs. Desse modo, a inibição da COX pode diminuir o estresse oxidativo placentário. Esses inibidores da COX tem amplo espectro de atuação para analgesia, inflamação e profilaxia contra doenças cardiovasculares. No entanto persistem os efeitos adversos na função renal, moderados sintomas gastrointestinais (dispepsia, náusea) e prováveis consequências cardiovasculares e na fertilidade, efeitos atribuídos, em sua maioria, a inibição da COX-1, ao contrário dos efeitos terapêuticos resultantes da inibição da COX-2 (DARMMANN, 1999).

3.5 INIBIDORES DA COX-2

Há evidências que suportam a ideia de que inibidores da COX-2 podem reduzir a presença de ROS e diminuir atividade da NADPH oxidase (KOPFF et al., 2007; LV et al., 2007; LÓPEZ-VILLODRES et al., 2012; MARTINEZ-REVELLES et al., 2012). Outros estudos indicam que a inibição preferencial da COX-2 por nimesulida diminui os níveis de TBARS, restaura os níveis de GSH, e reverte a resistência a insulina em um modelo de ratos obesos (TIAN et al., 2011), o que prova sua eficácia sobre o estresse oxidativo sistêmico.

Dentre os efeitos conhecidos da nimesulida, destacam-se: inibição da síntese de produtos das enzimas COXs e lipooxygenase, inibição de ROS e secreção de enzima lisossomal, prevenção de agregação e a adesão e quimiotaxia de neutrófilos. Nimesulida é também reconhecida como agente tocolítico (SAWDY, 1997), e tem efeito supressor no câncer por inibir proliferação celular (HIDA, 2000). Além disso, outros efeitos da nimesulida englobam o bloqueio de anions superóxidos liberados por leucócitos, inibição da fosfodiesterase tipo IV, prevenção da liberação de TNF- α , aumento dos níveis de GSH tecidual, bloqueio da liberação histamina e inibição de metaloproteinases (DALLEGRI; OTTONELLO, 2007).

No entanto há divergências quanto à segurança desses agentes durante a gestação. Na clinica, os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) são comumente

utilizados para prevenir o parto prematuro (SAWDY, 1997; LOUDON, 2003), ou ainda para tratar ou prevenir a persistência do canal arterial em recém-nascidos prematuros (IRMESI et al., 2014). A utilização de AINEs nesse período pode comprometer a organogênese, uma vez que prostanoídes derivados da COX-2 são importantes para o desenvolvimento de alguns órgãos, como os rins. Inibir COX-2 durante o período de desenvolvimento renal pode retardar nefrogênese e promover alterações na hemodinâmica renal em idades tardias (SILVA, 2010; REVERTE et al., 2011).

A inibição das prostaglandinas pode resultar em efeitos clinicamente relevantes, como hipoperfusão renal e insuficiência renal aguda, porém são efeitos adversos geralmente reversíveis, no recém-nascido (LOPES et al., 2010). Em coelhos neonatos, o uso de nimesulida aumentou a resistência vascular renal em paralelo com redução do ritmo de filtração glomerular e fluxo sanguíneo renal (PREVOT et al., 2004). Uma redução no número de néfrons e elevação da pressão arterial também foram observadas quando a atividade de COX-2 estava diminuída durante o desenvolvimento renal (SAEZ et. al., 2009).

3.6 DESENVOLVIMENTO RENAL

O desenvolvimento renal envolve dois processos básicos: a formação morfológica e por fim, a obtenção da função. Nos mamíferos, os rins passam por três estágios de maturação: pronefro, mesonefro e metanefro. O pronefro é constituído por um aglomerado de células na região cervical, que formam unidades excretoras, denominadas nefrótomos, estruturas rudimentares e não funcionais, que logo se degeneram. O mesonefro encontra-se na região torácica e lombar superior e consiste em glomérulos e túbulos mesonéfricos que se abrem nos ductos mesonéfricos. É um sistema funcional durante um período, mas depois se degenera. No sexo feminino, o mesonefro regride totalmente, enquanto no sexo masculino, dá origem ao epidídimo e ducto deferente. O metanefro se localiza na região sacral e é o primórdio dos rins permanentes. Desenvolve-se a partir do divertículo metanéfrico (broto uretérico): uma evaginação do ducto mesonéfrico e a partir do blastema metanefrogênico: derivado da parte caudal do cordão nefrogênico; origina os

glomérulos, cápsula de Bowman, túbulo contorcido distal e proximal e alça de Henle (LECHNER; DRESSLER, 1997; MORITZ et al., 2008.) (Figura 4).

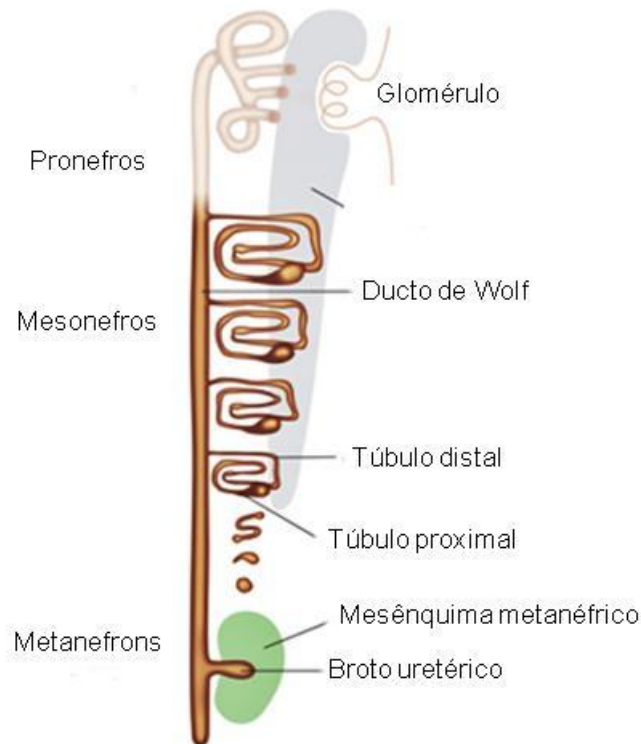


Figura 4. Desenvolvimento de estruturas primárias que precedem o rim. **Traduzida de MORITZ et al., 2008.**

Néfrons justamedulares são os primeiros néfrons formados que seguem em transformação mesenquima-epitelial até a área periférica do rim, formando a zona nefrogênica (BARD, 1992). Na zona nefrogênica, glomérulos imaturos e primitivos se desenvolvem e dão origem a sucessivas gerações de glomérulos maduros, que se dispõem no córtex renal de forma colunar. Cada néfron se desenvolve em uma sequência de cinco fases bem distintas: a fase I, ou vesículas renais; fase II, corpo em forma de vírgula; fase III, corpo em forma de S com capilares glomerulares e segmentação epitelial; fase IV, com alargamento dos glomérulos; fase V, a alça de Henle atinge o lúmen e o néfron assemelha-se a morfologia do adulto, mas continua se desenvolvendo (Figura 5) (LECHNER; DRESSLER, 1997; MORITZ et al., 2008.)

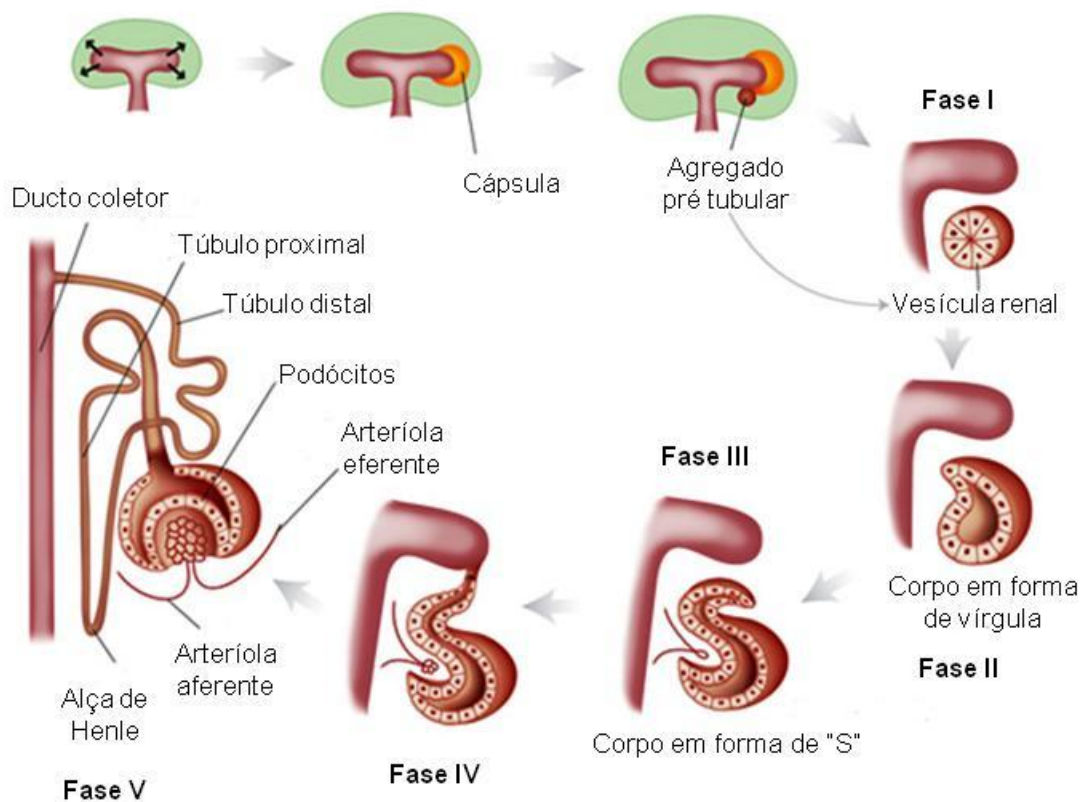


Figura 5. Desenvolvimento do néfron. Fase I: vesículas renais; fase II: corpo em forma de vírgula; fase III: corpo em forma de S com capilares glomerulares e segmentação epitelial; fase IV, com alargamento dos glomérulos, fase V, a alça de Henle atinge o lúmen e o néfron assemelha-se a morfologia do adulto. **Modificada de MORITZ et al., 2008.**

O crescimento do rim é um processo secundário, resultante da combinação de processos proliferativos e hemodinâmicos. A proliferação e o aumento das células são importantes no aumento do tamanho do glomérulo e do rim (EFFMANN et al., 1977). O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é expresso na zona nefrogênica e rapidamente tem sua expressão diminuída pelas células epiteliais renais que estão em diferenciação (SAIFUDEEN et al., 2002).

Componentes do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) também estão envolvidos durante a nefrogênese, sendo necessários para o final da maturação da estrutura renal no período pós-natal. A angiotensina II (ANG II) é o principal efector deste sistema, e juntamente com seu receptor AT1 estão presentes em glomérulos imaturos e maduros na zona nefrogênica e em células musculares lisas de rins de roedores. Estes achados relacionam a atividade do SRAA com o desenvolvimento renal (TUFRO-MCREDDIE et al., 1993).

Além disso, vias de sinalização e eventos críticos, como o remodelamento do broto uretérico, apoptose, transformação mesequimal-epitelial, e vascularização, ocorrem durante o desenvolvimento do rim (LECHNER; DRESSLER, 1997) e estão envolvidos com a interação de fatores, como ANG II e COX-2 (HARRIS et al., 2013).

3.7 COX-2 NO DESENVOLVIMENTO RENAL

No rim adulto, a COX-1 é altamente expressa nos ductos coletores, e em menores níveis é detectada em células intersticiais, células mesangiais glomerulares e células endoteliais arteriolas (HARRIS et al., 1994; YANG et al., 1998; CASTROP et al., 2001; CAMPEAN et al., 2003). Em contraste, a COX-2 é expressa predominantemente nas células intersticiais medulares, no segmento espesso do ramo ascendente da alça de Henle e células adjacentes à mácula densa (GUAN et al., 1997; HARRIS et al., 1994; HAO et al., 1999). As PGs derivadas da COX-2 exercem funções importantes na manutenção do fluxo sanguíneo renal, na mediação da liberação da renina e na regulação da excreção de sódio (NEWAZ M.; YOUSEFIPOUR, 2014).

Além das funções, bem conhecidas, dos prostanoídes no rim adulto, eles também são importantes durante o desenvolvimento renal. Prostanóides derivados da COX-2, como a PGE₂ é necessária para o crescimento e diferenciação de metanefros (AVNER, 1985). Outros prostanóides estão envolvidos com a regulação de efeitos hemodinâmicos e homeostáticos, através da manutenção da vasodilatação renal, e consequente regulação do equilíbrio da filtração glomerular neonatal (ANTONUCCI; FANOS, 2009).

Alterações na expressão da COX-2 durante a nefrogênese reduzem volume cortical e comprometem desenvolvimento glomerular (KÖMHOFF et al., 2000). Por outro lado, a desnutrição materna interfere na regulação de genes envolvidos na morfogênese renal, como o Wnt4, necessário para formação do agregado pré-tubular (MAGEE et al., 2011). A restrição de nutrientes maternos também altera a expressão de prostaglandinas no feto, e essa alteração se estende até a vida adulta, com expressão de COX-2 diminuída (BRENNAN et al., 2006).

Compreender o papel dos prostanoides no estresse oxidativo placentário, especialmente no que diz respeito à condição de desnutrição materna é importante para o entendimento do desenvolvimento fetal, inclusive da nefrogênese. Neste contexto, o estudo contribui com o conhecimento da fisiopatologia da hipertensão arterial.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS

Nimesulida, azul de Evans, verde de metila, L-cysteine, ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB), 1,1,3,3- tetraetoxi-propano (malondialdeído), fluoreto de fenilmetanossulfonilo (PMSF) e inibidor de tripsina (tipo II-S) e 3,3'-diaminobenzidina (DAB) foram adquiridos da Sigma-Aldrich). Pentobarbital sódico foi adquirido de Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos. Anticorpo policlonal rabbit anti-COX-2 (H-62) e anticorpo monoclonal mouse anti-PCNA (PC10), foram adquiridos de Santa Cruz Biotechnology. Anticorpo contra a angiotensina II (Ang II) foi adquirido de Peninsula Laboratories. Anticorpo secundário conjugado com biotina-peroxidase anti-rabbit e anti-mouse foi obtido de Vector Laboratories. Membranas de nitrocelulose e anticorpo conjugado com peroxidase foram obtidos de GE Healthcare.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

Todo o protocolo experimental utilizado neste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco, através do processo nº 23076.055737/2012-23.

4.3 ANIMAIS

Os animais foram provenientes e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco, em ciclo 12h claro/escuro, com temperatura em torno de 21°C, umidade média de 55% e dieta padrão (Purina Agribands, Paulínia, SP, Brasil).

Fêmeas nulíparas da linhagem Wistar, pesando entre 200 e 250 g, aos 90 dias, foram acasaladas, e o 1º dia de prenhez foi determinado pela presença de espermatozoides em esfregaço vaginal. Após a confirmação do acasalamento, as fêmeas foram alocadas em gaiolas individuais e separadas aleatoriamente em quatro grupos: i) o grupo controle (C, n=6), formado por ratas que foram mantidas com ração padrão (Purina Agribands) *ad libitum*; ii) o grupo desnutrido (U, n=6), que teve seu consumo dietético total reduzido em 50% do consumo dietético total do grupo controle; iii) o grupo controle-nimesulida (CN, n=6), formado por ratas com a mesma dieta do grupo C e tratadas com nimesulida (5 mg/kg/dia, via oral), (SILVA, 2010) do 7º até o 20º dia de gestação e iv) o grupo desnutrido-nimesulida (UN, n=6), formado por ratas com mesma dieta do grupo restrição durante toda a gestação e tratadas com nimesulida (5 mg/kg/dia, via oral) do 7º até o 20º dia de gestação. A nimesulida foi dissolvida na água potável com acesso livre. A dose administrada foi aferida com base na ingestão de água apresentada no dia anterior. As mães foram pesadas a cada três dias durante toda a gestação, enquanto o consumo dietético, bem como o consumo de água, foi mensurado diariamente. No 18º dia de gestação, as mães dos grupos experimentais foram alocadas por 24 horas em gaiolas metabólicas (Tecniplast Gazzada Sarl, Buguggiate, Itália) individuais, para avaliação do consumo hídrico e diurese. No 20º dia de gestação, as ratas foram anestesiadas com pentobarbital sódico (60 mg/Kg, i.p), submetidas a avaliação do volume plasmático e hematócrito, bem como foi procedida a coleta das placentas e fetos. Apenas os fetos machos e suas respectivas placentas foram separados e pesados em balança de precisão modelo BL320H (Shimadzu do Brasil Comércio Ltda.), e divididos em preparações contendo dois fragmentos de fígado e placenta, destinadas a avaliação do estresse oxidativo. Os rins dos fetos também foram coletados, o rim direito foi destinado à análise da expressão proteica por western blotting, e o outro rim foi usado para avaliação da nefrogênese por imunohistoquímica.

4.4 PARÂMETROS METABÓLICOS

No 19º dia de gestação as ratas foram alocadas em gaiolas metabólicas, durante 24 horas, para avaliação do consumo hídrico e diurese. O balanço hídrico foi

calculado a partir da diferença entre o consumo hídrico e a diurese. A urina foi utilizada para mensuração de sódio e potássio através de analisador de íons (AVL 9180, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha).

O volume plasmático foi mensurado pelo método do corante azul de Evans, como previamente descrito (FARJANEL et al., 1997; ROY-CLAVEL et al., 1999). Inicialmente, foi coletada uma amostra de sangue através do tubo capilar heparinizado para determinação de microhematócrito. Em seguida, 100 µg do corante em 100 µL de salina foram injetados através de um cateter na artéria femoral. O cateter foi, previamente, preenchido com salina, e após a administração do corante esvaziado com 200 µL de salina. Após 15 minutos, a salina foi removida do cateter arterial e uma amostra sanguínea foi coletada numa seringa heparinizada. O sangue foi centrifugado por 10 minutos para obter a amostra de plasma. O conteúdo de corante na amostra foi determinado espectrofotometricamente a 610 nm (Spectrophotometer UV-VIS RS 0223) e comparado a uma curva padrão desenhada de quantidades conhecidas do corante azul de Evans e amostras de plasma de ratos doadores. O volume plasmático por 100 g de peso corpóreo foi calculado para análise estatística.

4.5 INDICADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

A mensuração dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada pelo método de OHKAWA et al. (1979). Fragmentos da placenta e do fígado foram macerados em banho de gelo com 5 ml de KCl 1,15% + EDTA 3 mM por grama de tecido. Em seguida, 10 mg de tecido foram adicionados a um meio de reação contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,4%, ácido tricloroacético (TCA) 7,5% e ácido tiobarbitúrico 0,3%. Os tubos de reação foram selados e incubados a 95°C por 60 minutos. Após resfriamento em água corrente, foi adicionado um volume de n-butanol para cada volume de reação, e os tubos foram centrifugados a 1000 × g por 10 minutos. A absorbância da fase orgânica foi mensurada em 535 nm. O resultado foi corrigido pela concentração de proteína do homogenato. A dosagem de proteína foi realizada pelo método de Folin (LOWRY et al., 1951), utilizando BSA como padrão.

Os níveis de glutathiona reduzida (GSH) foram determinados através da mensuração de grupamentos sulfidrilas não proteicos (SEDLAK; LINDSAY, 1968). A partir do homogenato obtido para avaliação da peroxidação lipídica, 80 a 160 mg de tecido foram precipitados em solução de TCA 5%. Em seguida, um volume do sobrenadante foi adicionado a um volume de meio de reação contendo TRIS 400 mM, EDTA 4 mM e DTNB 4mM a um pH 8,9. A reação foi incubada em temperatura ambiente por 5 minutos, e a absorbância foi mensurada em 412 nm. O resultado foi corrigido pela concentração de proteína do homogenato.

4.6 SDS-PAGE E WESTERN BLOTTING

As camadas do labirinto e do espongiotrofoblasto da placenta e o tecido renal foram homogeneizadas em solução contendo Hepes-Tris 10 mM (pH 7,4), sacarose 250 mM e EDTA 2 mM (suplementado com inibidor de tripsina tipo II-S 0,15 mg/mL) a 4 °C. A concentração proteica total do homogenato foi determinada pelo método de fenol de Folin (Lowry et al., 1951), utilizando albumina sérica bovina como padrão. Para avaliação da expressão proteica, as proteínas presentes no homogenato placentário e renal foram separadas utilizando-se eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS, e transferidas a uma membrana de nitrocelulose. Para bloquear os sítios de ligação não específicos, foi utilizado leite 5% diluído em tampão Tris salina contendo 0,1% de Tween 20 (TBS-T, pH 7,6) por 40 minutos. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com anti-COX-2 (1/500) por 1 hora, temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (1/3.000) por uma hora, temperatura ambiente. Os blots foram visualizados através de quimioluminescência. Para análise densitométrica foi usado o Scion Image para Windows Alpha 4.0.3.2 (Scion Corporation). A expressão de proteínas foi padronizada pelo marcador de carregamento de proteína, Ponceau S.

4.7 MARCADORES DE DESENVOLVIMENTO RENAL FETAL

Os rins coletados foram fixados em methacarn (metanol: clorofórmio:ácido acético glacial, 6:3:1) por 24 h, e após a fixação, foram lavados em etanol 70%. Em seguida, o órgão foi desidratado, diafanizado e embebido em parafina. Após reidratação, secções de 6 μm do rim foram incubadas com 2% de soro de cabra em tampão salina fosfato (PBS) por 30 minutos para bloquear as ligações às proteínas não específicas. Em seguida os cortes foram incubados com anti-Ang II (1/200) overnight a 4 °C ou anti-PCNA (1/100) por 1 hora em câmara úmida, temperatura ambiente. Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados com PBS e incubados em câmara úmida com anticorpo secundário biotinado, por 1 hora a temperatura ambiente. Os produtos da reação foram detectados com o complexo avidina-biotina-peroxidase e visualizadas com DAB. Os cortes foram contra-corados utilizando verde de metila 0,5%, desidratados e montados. Para controle negativo, os anticorpos primários foram substituídos por concentrações equivalentes de PBS. Células positivas para Ang II e PCNA foram avaliadas em 30 glomérulos, enquanto a marcação para Ang II na área túbulo-intersticial foi avaliada em 30 campos, medindo 20.000 μm^2 .

Durante a nefrogênese, a área nefrogênica localiza-se abaixo da cápsula renal, onde glomérulos imaturos e primitivos se desenvolvem. Eles dão origem a sucessivas gerações de glomérulos maduros, que se dispõem no córtex renal de forma colunar. Portanto, durante o desenvolvimento a área nefrogênica torna-se um indicador seguro de desenvolvimento renal. Ela foi analisada pela média de quatro diferentes secções do córtex renal de cada rato e mensurada através do programa AxioVision version 4.8.1.0.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como média $\pm$ EPM e as diferenças estatísticas entre os grupos foram avaliadas utilizando two-way ANOVA seguido pelo teste Bonferroni. A análise da expressão de proteínas foi avaliada pelo one sample t test.

Foi utilizado o GradPad Prism 5 para todas as análises estatísticas. As diferenças foram consideradas significantes para $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

Artigo para ser submetido ao American Journal of Obstetrics & Gynecology.

Nimesulide prevents oxidative stress in placenta of undernourished rats

Regina S. Aires, Leucio D. Vieira-Filho, Juliane S. Farias, Edjair V. Cabral, Valdilene S. Ribeiro, Natalie E. Ribeiro, Daianna R. Gonçalves, Ana D. Paixão*

Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, Cidade Universitaria, Recife 50670-901, Brazil.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: adpaixao@ufpe.br

The authors report no conflict of interest

Financial support: The present study was supported by CNPq, FACEPE and CAPES. Financial supporters had no involvement in the design and analysis of the study or in the writing of this article.

Abstract

OBJECTIVES: By using nimesulide, a preferential COX-2 inhibitor, we investigated whether COX-2 could be a link between undernutrition-induced inflammation that culminates with increased placental oxidative stress and maternal handling of extracellular volume. Furthermore, renal fetal development was also investigated.

STUDY DESIGN: Pregnant Wistar rats were held on free access to standard diet or on 50% dietary restriction. From the 7th pregnancy day a subset of each group was treated with nimesulide, up to 20th pregnancy day, when placentas and fetuses were harvested from anesthetized dams. Water balance, plasma volume and urinary excretion of sodium and potassium were measured before organ collection.

RESULTS: Fifty percent dietary restriction led to increased water balance to maintain plasma volume, despite sodium deficit. Lipid peroxidation was increased in maternal liver, placenta and fetal liver of undernourished rats, although COX-2 protein expression was reduced in placenta. Markers of fetal development indicated a delayed nephrogenesis in undernourished fetuses. Nimesulide prevented the increment of water balance in undernourished mothers, prevented the increment in lipid peroxidation in maternal liver, placenta and fetal liver and recovered COX-2 expression in placenta of undernourished rats. However, nimesulide produced a delay on nephrogenesis. **CONCLUSIONS:** It may be concluded that COX-2 activity mediates the placental oxidative stress in undernourished mothers. However, COX-2 activity is necessary to maintain maternal extracellular volume homeostasis in undernourished pregnant rats and also it is necessary to maintain the renal fetal development.

Key Words: Undernutrition, COX-2 inhibitor, placenta, oxidative stress, fetal development.

Condensed sentence: COX-2 mediates oxidative stress in placenta

INTRODUCTION

Pro-inflammatory factors have a known role on maternal undernutrition effects in placenta¹ and in its repercussion on the offspring late diseases.^{2,3} When inflammation is induced during pregnancy, inflammatory interleukins that are present in maternal serum^{4,5}, are also present in placenta⁴ and in fetal tissues.^{4,6,7} At least one of the pro-inflammatory factors, the TNF- α , induces NADPH oxidase activation to increase the production of superoxide anions.⁸ Increased superoxide anions in placenta may trigger an increment in cytosolic phospholipase A2 activity and in cyclooxygenase (COX)-2 activity to favor thromboxane A2 synthesis instead prostacyclin I2.⁹ Thus, the placental blood flow that is diminished in face of maternal undernutrition^{10,11} may have additional reduction due to vasoconstrictor prostanoids.

Fifty percent of food restriction has been a useful model to understand maternal undernutrition effects in programming chronic diseases in offspring.^{10,11,12,13} Food restriction, due to reduced sodium intake, has the peculiarity to increase maternal plasma renin levels to maintain sodium and water balance.¹⁴ By retracting maternal extracellular volume, low sodium intake leads to fetal growth restriction¹⁵. Under low sodium intake, renin release is dependent on COX-2-induced prostanoids synthesized in macula densa.^{16,17,18}

Lipid peroxidation is increased in the placenta of pregnant rats under a nutritional inappropriate diet¹⁹. Increased placental lipid peroxidation seems paralleled by a similar profile in the kidney from offspring, at least up to the start of adulthood.^{20,21,22} Elevation in oxidative stress in the kidney is partially accountable for functional renal changes and elevation in blood pressure.^{20,21,22,23} These findings point that maternal and fetal increased oxidative stress are early indicators of late diseases.

In the undernutrition produced by fifty percent of food restriction, COX-2 could be a link between undernutrition-induced inflammation and maternal handling of extracellular volume. Therefore, in this work we associated this model of undernutrition with the administration of nimesulide, a preferential COX-2 inhibitor, to investigate maternal plasma volume, lipid peroxidation in placenta and in fetal liver, as well as, to investigate the fetal renal development.

MATERIAL AND METHODS

Materials

Nimesulide, Evans blue, thiobarbituric acid, 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid), 1,1,3,3-tetraethoxy-propane (malondialdehyde), phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), trypsin inhibitor (type II-S), Folin & Ciocalteu's phenol reagent, bovine serum albumin, acrylamide, N,N'-Methylenebis(acrylamide), N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine, ammonium persulfate, glycine, and 3,3'-diaminobenzidine (DAB were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Pentobarbital was purchased from Cristália (Produtos Químicos Farmacêuticos, Itapira, SP, Brazil). Trichloroacetic acid (TCA), sucrose, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), potassium chloride (KCl) were purchased from Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Nitrocellulose blotting membrane, Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibody and ECL Prime Western blotting system were purchased from GE Healthcare (Buckinghamshire, UK). Rabbit anti-Cox-2 (sc-7951) and mouse anti-PCNA (sc-56) antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology. Antibody against angiotensin II (Ang II) was purchased from Peninsula Laboratories. Conjugated biotin-peroxidase secondary antibody against rabbit was obtained from Vector Laboratories. All other reagents were of the highest purity.

Ethical considerations

The protocols and procedures for this study were approved by Committee for Experimental and Animal Ethics at the Federal University of Pernambuco nº 23076.055737/2012-23.

Animals

Nulliparous female Wistar rats, aged 90 days and weighing 200–250g, were considered pregnant by presence of spermatozoid in vaginal smear. They were maintained in individual cages at 21 °C, under a 12h light–12h dark cycle, with free access to water. From the first pregnancy day, the control group (C, n=12) had free access to standard chow (Purina Agribands, Paulínia, SP, Brazil), while the undernourished (U, n=12) was submitted to 50% restriction of the average daily food consumption of the ad libitum-fed controls. From the 7th to 20th day, when pregnancy was interrupted, a subset of each group was daily treated with nimesulide (N) dissolved in drinking water to warrant a dosage of 5 mg/kg.²¹ Thus, four groups of

mothers were studied: C (n = 6), U (n = 6), CN (n = 6) and UN (n = 6). Dietary and water intake was daily measured. At 19th pregnancy day, dams were housed in metabolic cage (Tecniplast Gazzada Sarl, Buguggiate, Italy) for 24 h to measurement of diuresis, urinary Na⁺ and K⁺ excretion and water balance. Water balance was measured as the difference between 24-h water intake and 24-h diuresis. At 20th pregnancy day, the rats were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) to measurement of plasma volume and to obtain maternal and fetal tissues. From them, one placenta corresponding to a male fetus and the respective male fetus were obtained to harvest their tissues. Labyrinth zone and trophospongium were isolated from placentas. Placentas, fetuses and fetal liver and kidneys were weighed in a precision scale (BL320H, Shimadzu do Brasil Comércio Ltda).

Plasma volume measurement

Plasma volume was measured by using Evans blue dye, as previously described.^{15,24} One basal blood sample was collected to measure hematocrit and the dye (0.1%, dissolved in physiological saline) was administered (100 µg/100 g BW, i.v.). After 15 minutes, 1 mL of blood sample was collected in heparinized syringe to obtain plasma. The dye concentration in plasma was determined spectrophotometrically at 610 nm and compared to a standard curve of known concentrations of Evans Blue dye.

Markers of oxidative stress

Lipid peroxidation was assessed by measurement of malondialdehyde (MDA) according to Ohkawa and coworkers²⁵ with some modifications. Tissue slices were homogenized in 150 mM KCl, 1 g tissue: 5 ml solution, into ice bath, using a tissue grinder, coupled to a rotor IKA RW20, at 1,200 rpm for 2 min. 10 mg of tissue reacted to 0.4% SDS, 7.5% trichloroacetic acid and 0.3% thiobarbituric acid. The reaction was carried out at 95 °C for 1 h. After chilling, n-butanol was added, the samples were centrifuged and the organic phase was used to measure absorbance at 535 nm. The standard curve was performed by using 1,1,3,3-tetraethoxy-propane.

The levels of reduced glutathione (GSH) were measured by assessing the non-protein sulfhydryl groups.²⁶ From the homogenate previously obtained, 80 to 160 mg of tissues reacted to 5% trichloroacetic acid. The supernatant was added in a solution containing 400 mM Tris, 4 mM EDTA and 4 mM 5,5'-dithio-bis- (2-

nitrobenzoic acid), pH 8.9. The reaction was carried out at room temperature for 5 min. Absorbance was measured at 412 nm and L-cysteine was used for the standard curve. Both the MDA and GSH results were corrected for protein concentration. The assays were performed in duplicate.

Protein Expression of COX-2

Placental and renal tissues were minced on ice in 250 mM sucrose, 10 mM HEPES Tris (pH 7.4), 2 mM EDTA, 0.15 mg/l trypsin inhibitor (type IIS) and 1 mM PMSF (1g tissue: 4ml solution). The suspension was homogenized at 1,200 rpm for 1 min using a Potter Elvehjem homogenizer with a Teflon pestle. Aliquots of 80 µg protein were submitted to separation by using polyacrylamide gel (PAGE) containing SDS. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes at 350 mA. 5% skim milk was used to block non-specific binding. The membranes were incubated with antibody to COX-2 (1:500) for 1 h at room temperature. After three times washing, membranes were incubated with Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit (1:3,000) for 1 h at room temperature. Blots were visualized using a chemiluminescence kit (ECL Western blotting system). Densitometric analyses were carried out using Scion Image for Windows Alpha 4.0.3.2 (Scion Corporation), available at www.scionCorporation.com at the time the study was carried out. Protein expression was normalized to protein load using Ponceau Red staining.

Markers of fetal renal development

Fetal kidneys were fixed in Methacarn (methanol:chloroform:glacial acetic acid, 6:3:1) for 24 h. They were washed in ethanol 70%, dehydrated, diaphanized and embedded in paraffin. After rehydration, sections of 6 µm were incubated with antibody for AngII (1:200) overnight at 4 °C or with antibody for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (1:100) for 1 h at room temperature, in humid camera. Non-specific binding were blocked by using 20% goat serum dissolved in phosphate buffer saline (PBS) for 30 min. For negative control, primary antibodies were replaced for PBS. Positive cells to AngII were counted in 30 glomeruli and in 30 fields, measuring 20,000 µm², in tubulointerstitial region, while positive cells to PCNA were counted in 30 glomeruli.

Nephrogenic zone was identified by one observer and measured by using the AxioVision version 4.8.1.0 software. Nephrogenic zone comprises the developing nephrons housed in the outer layers under renal capsule, once the nephrons develop

in a centrifugal direction.²⁷ To each rat, it was obtained an average of four measured fields, moreover nephrogenic zone was indexed to cortical area.²⁸

Analytical methods

Protein in tissues was measured by Folin phenol method²⁹, employing BSA as standard. Urinary Na⁺ and K⁺ were measured by an electrolyte analyzer (AVL 9180, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

Statistical analyses

Statistical differences among the groups were assessed by two-way ANOVA followed by Bonferroni test. Protein expression, evaluated by Western blotting, was compared to CV group by one sample *t* test. These analyses were performed using GraphPad Prism 5 (Version 5.01, GraphPad Software, Inc.). The means were considered different when $P < 0.05$.

RESULTS

General maternal and fetal data during pregnancy

Nimesulide did not change the dietary intake, neither in C, nor in U group (compare CN to C and UN to U, Table 1). Similarly, mean of daily water intake was unchanged along pregnancy into the C group. However, even the U group was under 50% diet restriction; its water intake was similar to C group. Likewise, nimesulide did not change water intake in C nor in U group (compare CN to C and UN to U group). As expected, maternal weight gain along pregnancy in U group was 17% of that in C group and in UN group it was 32% of that in CN group. Nimesulide did not change maternal weight gain, neither in C nor in U groups (compare CN to C and UN to U group). Placental weight, at 20th pregnancy day was lower in U and UN than in their respective groups, C and CN, respectively. However, placental weight was similar between C and CN, as well as, between U and UN. Fetal body weight and renal weight were lower in U than in C group, as well as, they were lower in UN than in CN groups. Nimesulide did not affect fetal body weight and renal weight; these parameters were similar between CN and C group, as well as, in UN and U groups. The fetal renal weight index was the same for all groups.

Maternal handling of extracellular volume

Even water intake was similar between U and C groups and between UN and CN groups (Table 1), diuresis was lower in U compared to C group and also, in UN compared to CN groups, but it was similar between U and UN, as well as, between C and CN groups (Figure 1, A). Water balance was higher in U than in C group. However, it was similar between UN and CN groups (Figure 1, B). Plasma volume was similar between U and C groups, but it was lower in UN than in CN groups (Figure 1, C). C and CN showed the same plasma volume, as well as U and UN showed the same plasma volume. Hematocrit was similar among the groups (Figure 1, D). Urinary sodium (U_{Na}^{+V}) and potassium (U_K^{+V}) excretion were lower in U than in C group, as well as, in UN than in CN group (Figures 1, E and F). On the other hand, these parameters were similar between CN and C groups, as well as, between UN and U groups.

Markers of oxidative stress in maternal liver, placenta and fetal liver

MDA levels were higher in maternal liver, placenta and fetal liver of U group compared to C group. Differently, MDA in these tissues was similar between UN and CN. Moreover, it was lower in UN than in U group, but similar between CN and C group (Figure 2, A). GSH was unaltered in maternal liver of U group compared to C group. However, GSH was lower in placenta and fetal liver of U group than in C group (Figure 2, B). In maternal liver, GSH was lower in UN than in CN, as well as than in U group. In placenta, GSH was similar between UN and CN, but higher in UN than in U group. In fetal liver, GSH was similar between UN and CN, as well as, between UN and U groups.

Expression of COX-2 protein in placenta

Undernutrition reduced the expression of COX-2 protein in placenta (see U vs. C group, Figure 3). COX-2 expression in UN was similar to CN, as well as it was similar to U group.

Markers of fetal renal development

COX-2 protein was reduced in the kidney of undernourished rats (compare U vs. C group, Figure 4, A). Nimesulide reduced COX-2 expression in both control and undernourished rats (compare CN and UN to C group). COX-2 expression was similar between UN and U group. Nephrogenic zone that corresponds to area

showing immature nephrons was higher in U, CN and UN than in C group. Nephrogenic zone was similar between UN and U group (Figure 4, B). The number of cells positive to AngII in tubulointerstitial area was higher in U than in C group. In contrast, it was lower in UN than in U group and similar between CN and C groups (Figure 5, A). In glomeruli, although the number of cells positive to AngII was the same for U and C groups, it was lower in UN than in the other groups (Figure 5, D). PCNA, another marker of renal development was lower in U and UN groups than in C, although it was the same between CN and C groups (Figure 6, B).

DISCUSSION

Undernutrition did not increase expression of COX-2 in placenta, as it was presumed from the axiom that undernutrition is pro-inflammatory^{1,2,3} and inflammatory factors trigger COX-2 transcriptional expression.^{30,31} However, the signs that a fifty percent dietary restriction led a deficit in sodium and compensatory mechanisms dependent on COX-2 were evident in the way dams handled extracellular volume and in the increased number of cells positive to AngII in the kidney of undernourished fetuses. Reduced COX-2 in the placenta of undernourished dams does not indicate necessarily that undernutrition-induced placental oxidative stress was independent on COX-2 derived prostanoids. Since nimesulide prevented placental oxidative stress, COX-2 activity seems increased in placenta of undernourished mothers.

Deficit in sodium intake was evidenced by the lowered urinary sodium excretion, naturally accompanied by reduced urinary potassium excretion (Figure 1, E and F). Even the water intake in U group was similar to C group, diuresis was reduced in U group compared to C group, and then the water balance was increased to maintain plasma volume in U group. The homeostatic mechanisms seem to be dependent on a link between COX-2 activity and renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), since UN group presented the same water balance as C group. Likely, vasopressin is involved³², as it is suggested by paired water intake between U and C groups, even diet intake was cut to 50%, but we did not investigate this line of body volume homeostasis.

Normal pregnancy is characterized by activated RAAS, in part, to increase total blood volume.^{33,34} In tandem, the hematocrit of pregnant rats (Figure 1, D) was low compared to non-pregnant female rats that is around 51%, according data from

our Laboratory.³⁵ Dietary sodium deficit exacerbates pregnancy-induced increment in plasma renin activity.¹⁵ Ang II was increased in the renal tubulointerstitial area of U fetuses and nimesulide prevented it. This finding reinforces that homeostatic mechanisms involves AngII dependent on COX-2 activity.

It is noteworthy that both undernutrition and nimesulide reduced COX-2 protein expression in the fetal kidney. It is early to bring forward the mechanism by which undernutrition leads to reduction in COX-2 expression in fetal kidney. Regarding the nimesulide, it may be suggested that its anti-oxidant effect was accountable for the reduction in COX-2 expression in the fetal kidney. Anti-oxidant effect of nimesulide was well characterized in maternal liver, placenta and fetal liver and it is in line with previous reports showing nimesulide anti-oxidant properties.^{36,37} Lowered levels of GSH in placenta and fetal liver from undernourished mothers may have two uptakes: first, the protein deficit led to reduced levels of methionine that is the sulfur donor for cysteine synthesis, which is the rate-limiting precursor of GSH synthesis³⁸ and second, GSH was wasted against the increased reactive oxygen species.³⁹ Converging with the second possibility, GSH was increased in placenta of undernourished mother treated with nimesulide, while GSH was unchanged in the other groups treated with nimesulide.

Reduced COX-2 protein expression in the kidney of undernourished fetuses and in both groups treated with nimesulide was coursed with increased nephrogenic zone, an area of developing nephrons, since nephrogenesis in rats finishes around 10th postnatal day.^{40,41} COX-2 products play important roles in the mammalian nephrogenesis.^{42,43,44} AngII also play important roles in mammalian nephrogenesis.^{28,45,46,47} In the present study, the increased number of positive cells to AngII in the developing kidney of U fetuses is not converging to increased nephrogenic zone, likely due to the feature of reduced sodium intake conferred by dietary restriction. However, the number of cells positive to PCNA was reduced in both undernourished groups, U and UN. This is a data converging with increased nephrogenic zone. Nimesulide did not affect PCNA in the kidney of control fetuses, although it had induced increased nephrogenic zone. These findings show that even nimesulide had abolished placental oxidative stress it impaired renal fetal development. They add evidence regarding mechanisms responsible for the known side effects of COX-2 inhibitors when they are used in preterm labour.^{48,49}

We have been suggesting that reducing placental oxidative stress improves renal fetal development and prevents renal dysfunction at adult life.^{23,28} Although nimesulide had reduced placental oxidative stress, it did not ameliorate any marker of fetal development, such as fetal body weight, kidney weight or nephrogenesis. It may be concluded that COX-2 activity mediates the placental oxidative stress in undernourished mothers. However, COX-2 activity might be necessary to maintain maternal extracellular volume homeostasis in undernourished pregnant rats and also to maintain the renal fetal development.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Nielson Torres de Mello for his technical assistance.

REFERENCES

1. Antipatis C, Ashworth CJ, Riley SC, Hannah L, Hoggard N, Lea RG. Vitamin A deficiency during rat pregnancy alters placental TNF-alpha signalling and apoptosis. *Am J Reprod Immunol*. 2002;47(3):151-8.
2. Shen Q, Li ZQ, Sun Y, Wang T, et al. The role of pro-inflammatory factors in mediating the effects on the fetus of prenatal undernutrition: implications for schizophrenia. *Schizophr Res*. 2008;99(1-3):48-55.
3. Reynolds CM, Li M, Gray C, Vickers MH. Pre-weaning growth hormone treatment ameliorates bone marrow macrophage inflammation in adult male rat offspring following maternal undernutrition. *PLoS One*. 2013;8(7):e68262.
4. Ashdown H, Dumont Y, Ng M, Poole S, Boksa P, Luheshi GN. The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2006;11(1):47-55.
5. Beloosesky R, Gayle DA, Amidi F, et al. N-acetyl-cysteine suppresses amniotic fluid and placenta inflammatory cytokine responses to lipopolysaccharide in rats. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;194(1):268-73.
6. Beloosesky R, Weiner Z, Khativ N, et al. Prophylactic maternal n-acetylcysteine before lipopolysaccharide suppresses fetal inflammatory cytokine responses. *Am J Obstet Gynecol*. 2009;200(6):665.e1-5.

7. Beloosesky R, Weiner Z, Ginsberg Y, Ross MG. Maternal N-acetyl-cysteine (NAC) protects the rat fetal brain from inflammatory cytokine responses to lipopolysaccharide (LPS). *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012;25(8):1324-8.
8. Li JM, Fan LM, Christie MR, Shah AM. Acute tumor necrosis factor alpha signaling via NADPH oxidase in microvascular endothelial cells: role of p47phox phosphorylation and binding to TRAF4. *Mol Cell Biol.* 2005;25(6):2320-30.
9. Korbecki J, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Chlubek D. The effect of reactive oxygen species on the synthesis of prostanoids from arachidonic acid. *J Physiol Pharmacol.* 2013;64(4):409-21.
10. Rosso P, Kava R. Effects of food restriction on cardiac output and blood flow to the uterus and placenta in the pregnant rat. *J Nutr.* 1980;110(12):2350-4.
11. Ahokas RA, Anderson GD, Lipshitz J. Effect of dietary restriction, during the last week only or throughout gestation, on cardiac output and uteroplacental blood flow in pregnant rats. *J Nutr.* 1983;113(9):1766-76.
12. Holemans K, Gerber R, Meurrens K, De Clerck F, Poston L, Van Assche FA. Maternal food restriction in the second half of pregnancy affects vascular function but not blood pressure of rat female offspring. *Br J Nutr.* 1999;81(1):73-9.
13. Franco Mdo C, Arruda RM, Dantas AP, et al. Intrauterine undernutrition: expression and activity of the endothelial nitric oxide synthase in male and female adult offspring. *Cardiovasc Res.* 2002;56(1):145-53.
14. Leizea JP, González CG, García FD, Patterson AM, Fernández SF. The effects of food restriction on maternal endocrine adaptations in pregnant rats. *J Endocrinol Invest.* 1999;22(5):327-32.
15. Roy-Clavel E, Picard S, St-Louis J, Brochu M. Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;180(3 Pt 1):608-13.
16. Francisco LL, Osborn JL, DiBona GF. Prostaglandin in renin release during sodium deprivation. *Am J Physiol.* 1982;243(6):F537-42.

17. Schricker K, Hamann M, Kurtz A. Nitric oxide and prostaglandins are involved in the macula densa control of the renin system. *Am J Physiol.* 1995;269(6 Pt 2):F825-30.
18. Schnermann J, Briggs JP. Tubular control of renin synthesis and secretion. *Pflugers Arch.* 2013;465(1):39-51.
19. Vieira-Filho LD, Lara LS, Silva PA, et al. Placental oxidative stress in malnourished rats and changes in kidney proximal tubule sodium ATPases in offspring. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2009;36(12):1157-63.
20. Magalhães JC, da Silveira AB, Mota DL, Paixão AD. Renal function in juvenile rats subjected to prenatal malnutrition and chronic salt overload. *Exp Physiol.* 2006;91(3):611-9.
21. Silva LA, Veira-Filho LD, Barreto IS, Cabral EV, Vieyra A, Paixão AD. Prenatal undernutrition changes renovascular responses of nimesulide in rat kidneys. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2011;108(2):115-21.
22. Vieira-Filho LD, Lara LS, Silva PA, et al. Placental malnutrition changes the regulatory network of renal Na-ATPase in adult rat progeny: Reprogramming by maternal α -tocopherol during lactation. *Arch Biochem Biophys.* 2011;505(1):91-7.
23. Vieira-Filho LD, Cabral EV, Farias JS, et al. Renal molecular mechanisms underlying altered Na⁺ handling and genesis of hypertension during adulthood in prenatally undernourished rats. *Br J Nutr.* 2014;24:1-13.
24. Farjanel J, Denis C, Chatard JC, Geyssant A. An accurate method of plasma volume measurement by direct analysis of Evans blue spectra in plasma without dye extraction: origins of albumin-space variations during maximal exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1997;75(1):75-82.
25. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95(2):351-8.
26. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 1968;25(1):192-205.

27. Carey AV, Carey RM, Gomez RA. Expression of alpha-smooth muscle actin in the developing kidney vasculature. *Hypertension*. 1992;19(2 Suppl):II168-75.
28. Vieira-Filho LD, Cabral EV, Santos FT, Coimbra TM, Paixão AD. Alpha-tocopherol prevents intrauterine undernutrition-induced oligonephronia in rats. *Pediatr Nephrol*. 2011;26(11):2019-29.
29. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
30. Newton R, Kuitert LM, Bergmann M, Adcock IM, Barnes PJ. Evidence for involvement of NF-kappaB in the transcriptional control of COX-2 gene expression by IL-1beta. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;237(1):28-32.
31. Kuwano T, Nakao S, Yamamoto H, Tsuneyoshi M, Yamamoto T, Kuwano M, Ono M. Cyclooxygenase 2 is a key enzyme for inflammatory cytokine-induced angiogenesis. *FASEB J*. 2004;18(2):300-10.
32. de Arruda Camargo LA, Saad WA, Cerri PS. Effects of V1 and angiotensin receptor subtypes of the paraventricular nucleus on the water intake induced by vasopressin injected into the lateral septal area. *Brain Res Bull*. 2003;61(5):481-7.
33. Schrier RW, Ohara M. Dilemmas in human and rat pregnancy: proposed mechanisms relating to arterial vasodilation. *J Neuroendocrinol*. 2010;22(5):400-6.
34. Lumbers ER, Pringle KG. Roles of the circulating renin-angiotensin-aldosterone system in human pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2014 Jan 15;306(2):R91-101.
35. Vieira-Filho LD, Lucena-Júnior JM, Barreto IS, Angelim JL, Paixão AD. Repercussion of acetylsalicylic acid during fetal development on later renal hemodynamics of rats. *Fundam Clin Pharmacol*. 2008;22(4):379-86.
36. Bevilacqua M, Vago T, Baldi G, Renesto E, Dallegri F, Norbiato G. Nimesulide decreases superoxide production by inhibiting phosphodiesterase type IV. *Eur J Pharmacol*. 1994;268(3):415-23.

37. Martínez-Revelles S, Avendaño MS, García-Redondo AB, et al. Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18(1):51-65.
38. Jahoor F. Effects of decreased availability of sulfur amino acids in severe childhood undernutrition. *Nutr Rev*. 2012;70(3):176-87.
39. Khare M, Mohanty C, Das BK, Jyoti A, Mukhopadhyay B, Mishra SP. Free radicals and antioxidant status in protein energy malnutrition. *Int J Pediatr*. 2014:254396.
40. Solomon S. Developmental changes in nephron number, proximal tubular length and superficial nephron glomerular filtration rate of rats. *J Physiol*. 1977;272(3):573-89.
41. Tufro-McReddie A, Romano LM, Harris JM, Ferder L, Gomez RA. Angiotensin II regulates nephrogenesis and renal vascular development. *Am J Physiol*. 1995;269(1 Pt 2):F110-5.
42. Zhang MZ, Wang JL, Cheng HF, Harris RC, McKanna JA. Cyclooxygenase-2 in rat nephron development. *Am J Physiol*. 1997;273(6 Pt 2):F994-1002.
43. Kömhoff M, Wang JL, Cheng HF, et al. Cyclooxygenase-2-selective inhibitors impair glomerulogenesis and renal cortical development. *Kidney Int*. 2000;57(2):414-22.
44. Baserga M, Hale MA, Wang ZM, Yu X, Callaway CW, McKnight RA, Lane RH. Uteroplacental insufficiency alters nephrogenesis and downregulates cyclooxygenase-2 expression in a model of IUGR with adult-onset hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;292(5):R1943-55.
45. Yosypiv IV, Schroeder M, El-Dahr SS. Angiotensin II type 1 receptor-EGF receptor cross-talk regulates ureteric bud branching morphogenesis. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(4):1005-14.

46. Song R, Spera M, Garrett C, Yosypiv IV. Angiotensin II-induced activation of c-Ret signaling is critical in ureteric bud branching morphogenesis. *Mech Dev.* 2010;127(1-2):21-7.
47. Song R, Spera M, Garrett C, El-Dahr SS, Yosypiv IV. Angiotensin II AT2 receptor regulates ureteric bud morphogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;298(3):F807-17.
48. Loudon JA, Groom KM, Bennett PR. Prostaglandin inhibitors in preterm labour. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2003;17(5):731-44.
49. Ali US, Khubchandani S, Andankar P, Parekhji S, Dubhalish V, Padhye B. Renal tubular dysgenesis associated with in utero exposure to Nimuselide. *Pediatr Nephrol.* 2006;21(2):274-6.

Figure Legends

FIGURE 1**Maternal handling of extracellular volume**

A, Diuresis obtained in metabolic cage, at 19th pregnancy day. **B**, Water balance calculated as difference between water intake and diuresis, at 20th pregnancy day. **C**, Plasma volume assessed by administration of Evans blue dye, at 20th pregnancy day. **D**, Hematocrit obtained before plasma volume measurement, at 20th pregnancy day. **E**, urinary sodium excretion (U_{Na}^{+V}), at 19th pregnancy day. **F**, urinary potassium excretion (U_K^{+V}), at 19th pregnancy day. C, mothers held on free access to diet; U, mothers held on 50% dietary restriction; CN, mothers held on free access to diet and additionally treated with nimesulide, from the 7th pregnancy day; UN, mothers held on 50% dietary restriction and additionally treated with nimesulide, from the 7th pregnancy day. Results are mean $\pm$ SEM. $P < 0.05$, two-way ANOVA followed by Bonferroni test. Means not sharing the same letters are different.

FIGURE 2**Markers of oxidative stress in maternal liver, placenta and fetal liver**

A, malondialdehyde (MDA) measured as thiobarbituric acid-reactive substance. **B**, reduced glutathione (GSH) assessed by measuring non-protein sulfhydryl groups. One placenta corresponding to a male fetus and one male fetus were obtained per mother. C are dams and fetuses held on free access to diet; U are dams and fetuses held on 50% dietary restriction; CN are dams and fetuses held on free access to diet and additionally treated with nimesulide, from the 7th pregnancy day; UN are dams and fetuses held on 50% dietary restriction and additionally treated with nimesulide, from the 7th pregnancy day. Results are mean $\pm$ SEM. $P < 0.05$, two-way ANOVA followed by Bonferroni test. Means not sharing the same letters are different.

FIGURE 3**Expression of COX-2 protein in placenta**

COX-2 protein expression was assessed in placental labyrinth zone and trophospongium by Western blotting. The inset is a representative image of the immunoblotting. One placenta corresponding to a male fetus was obtained per mother. C, mothers held on free access to diet; U, mothers held on 50% dietary restriction; CN, mothers held on free access to diet and additionally treated with

nimesulide, from the 7th pregnancy day; UN, mothers held on 50% dietary restriction and additionally treated with nimesulide, from the 7th pregnancy day. Results are mean $\pm$ SEM. $P < 0.05$, one sample t test to compare U, CN and UN to C group. Bars not sharing the same letters are different.

FIGURE 4

Expression of COX-2 protein and nephrogenic zone in fetal kidney

A, COX-2 protein expression was assessed by Western blotting. The inset is a representative image of immunoblotting. **B**, Nephrogenic zone is the area under renal capsula presenting developing nephrons. For both experiments one male fetus was obtained per mother. C are fetuses from mothers held on free access to diet; U are fetuses from mothers held on 50% dietary restriction; CN are fetuses from mothers held on free access to diet and additionally treated with nimesulide, from the 7th pregnancy day; UN are fetuses from mothers held on 50% dietary restriction and additionally treated with nimesulide, from the 7th pregnancy day. Results are mean $\pm$ SEM. $P < 0.05$, one sample t test to compare immunoblotting from U, CN and UN against C group. Two-way ANOVA followed by Bonferroni test to analyze nephrogenic zone. Bars not sharing the same letters are different.

FIGURE 5

AngII immunolocalization in tubulointerstitial area and glomeruli

A, representative image of AngII immunolocalization in tubulointerstitial area. **B**, number of positive cells to AngII in tubulointerstitial area. **C**, representative image of AngII immunolocalization in glomeruli. **D**, number of positive cells to AngII in glomeruli. Arrows are pointing to AngII immunolocalization. C are fetuses from mothers held on free access to diet; U are fetuses from mothers held on 50% dietary restriction; CN are fetuses from mothers held on free access to diet and additionally treated with nimesulide, from the 7th pregnancy day; UN are fetuses from mothers held on 50% dietary restriction and additionally treated with nimesulide, from the 7th pregnancy day. Results are mean $\pm$ SEM. $P < 0.05$, two-way ANOVA followed by Bonferroni test to analyze nephrogenic zone. Bars not sharing the same letters are different.

FIGURE 6**Proliferating nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in glomeruli**

A, representative image of PCNA immunolocalization in glomeruli. **B**, number of cells positive to PCNA, a marker of renal fetal development. Arrows are pointing to PCNA immunolocalization. **C** are fetuses from mothers held on free access to diet; **U** are fetuses from mothers held on 50% dietary restriction; **CN** are fetuses from mothers held on free access to diet and additionally treated with nimesulide, from the 7th pregnancy day; **UN** are fetuses from mothers held on 50% dietary restriction and additionally treated with nimesulide, from the 7th pregnancy day. Results are mean $\pm$ SEM. $P < 0.05$, two-way ANOVA followed by Bonferroni test to analyze nephrogenic zone. Bars not sharing the same letters are different.

TABLE 1

Maternal Groups				
Mean of daily dietary intake (g), from:	C	U	CN	UN
1 st to 6 th pregnancy day	21 ± 1 ^a	10 ± 1 ^b	18 ± 1 ^a	9 ± 1 ^b
7 th to 12 th pregnancy day	21 ± 1 ^a	11 ± 1 ^b	24 ± 2 ^a	12 ± 1 ^b
13 th to 18 th pregnancy day	20 ± 1 ^a	10 ± 1 ^b	24 ± 4 ^a	12 ± 2 ^b
19 th pregnancy day	30 ± 1 ^a	15 ± 1 ^b	25 ± 2 ^a	12 ± 1 ^b
Mean of daily water intake (ml), from:				
1 st to 6 th pregnancy day	54 ± 3 ^a	47.6 ± 5 ^a	60.7 ± 7 ^a	53.4 ± 10 ^a
7 th to 12 th pregnancy day	57.0 ± 4 ^a	65.1 ± 17 ^a	73.50 ± 9 ^a	67.5 ± 5 ^a
13 th to 18 th pregnancy day	70.67 ± 4 ^a	53.65 ± 26 ^a	67.6 ± 3 ^a	75.0 ± 5 ^a
19 th pregnancy day	56 ± 2 ^a	58 ± 9 ^a	60 ± 4 ^a	46 ± 2 ^a
Maternal weight gain from 1 st to 20 th pregnancy day (g)	94.33 ± 9 ^a	15.65 ± 7 ^b	87.17 ± 10 ^a	28.0 ± 10 ^b
Placental weight at 20 th day (g)	0.54 ± 1 ^a	0.46 ± 1 ^b	0.57 ± 1 ^a	0.49 ± 1 ^b
Fetal body weight at 20 th day (g)	4.10 ± 1 ^a	3.46 ± 1 ^b	4.29 ± 1 ^a	3.69 ± 1 ^b
Fetal kidney weight at 20 th day (mg)	18.2 ± 1 ^a	15.4 ± 1 ^b	17.9 ± 1 ^a	16.5 ± 1 ^b
Fetal renal weight index (%)	0.9 ± 1 ^a	0,9 ± 1 ^a	0,8 ± 1 ^a	0.9 ± 1 ^a

C are dams and fetuses held on free access to diet; U are dams and fetuses held on 50% dietary restriction; CN are dams and fetuses held on free access to diet and additionally treated with nimesulide, from the 7th pregnancy day; UN are dams and fetuses held on 50% dietary restriction and additionally treated with nimesulide, from the 7th pregnancy day. Results are mean ± SEM. $P < 0.05$, two-way ANOVA followed by Bonferroni test. Means not sharing the same letters are different.

FIGURE 1

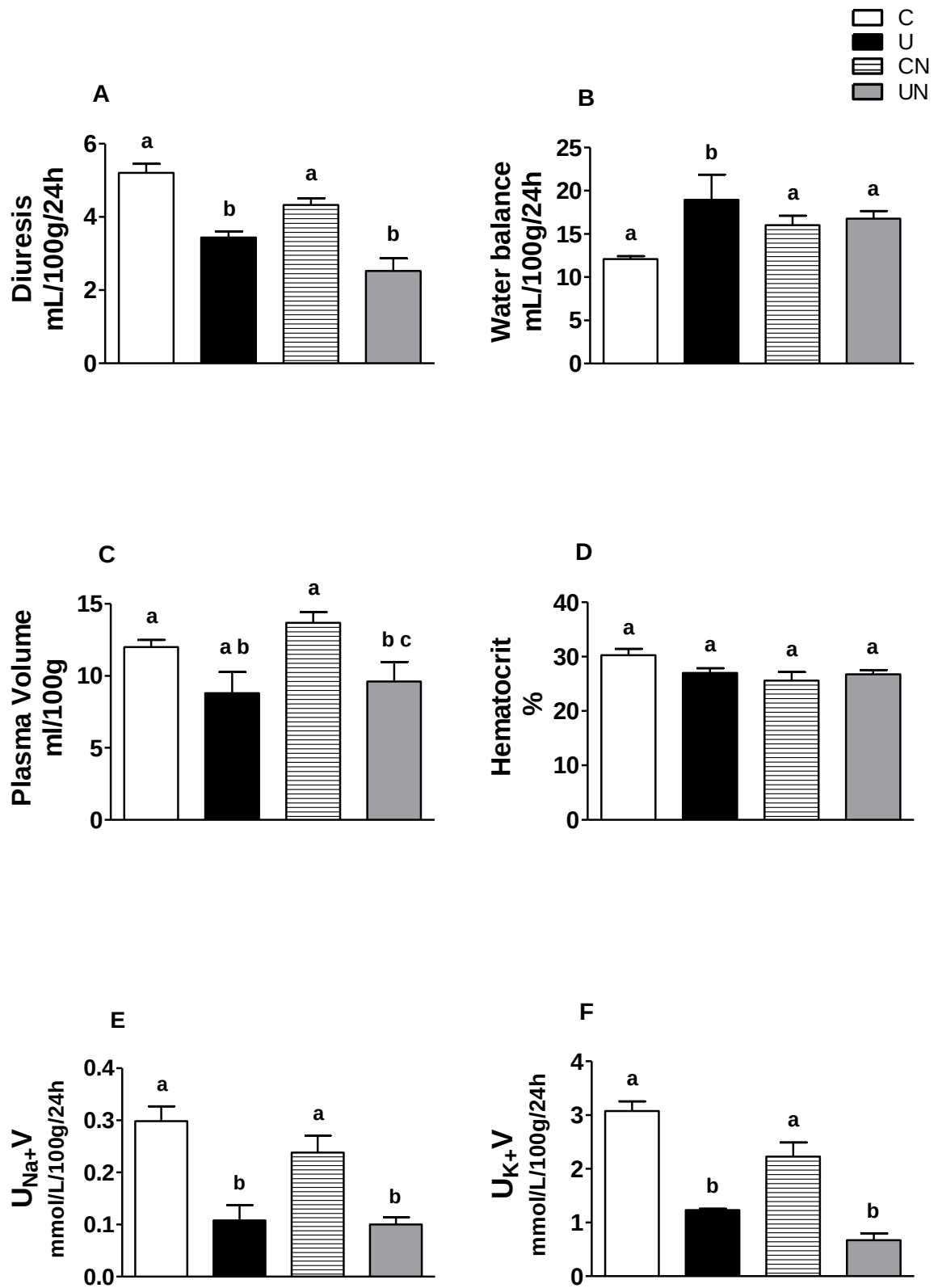


FIGURE 2

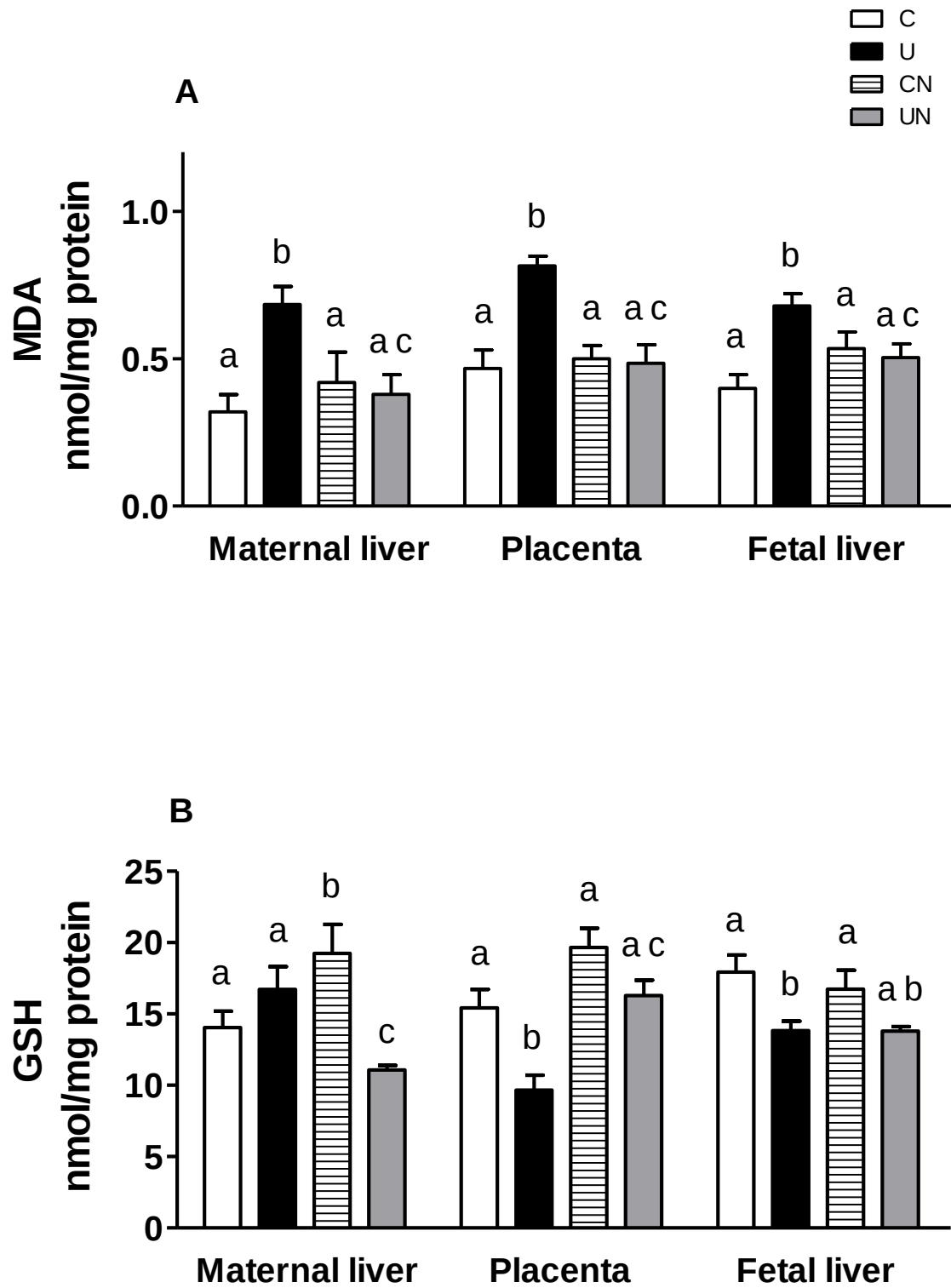


FIGURE 3

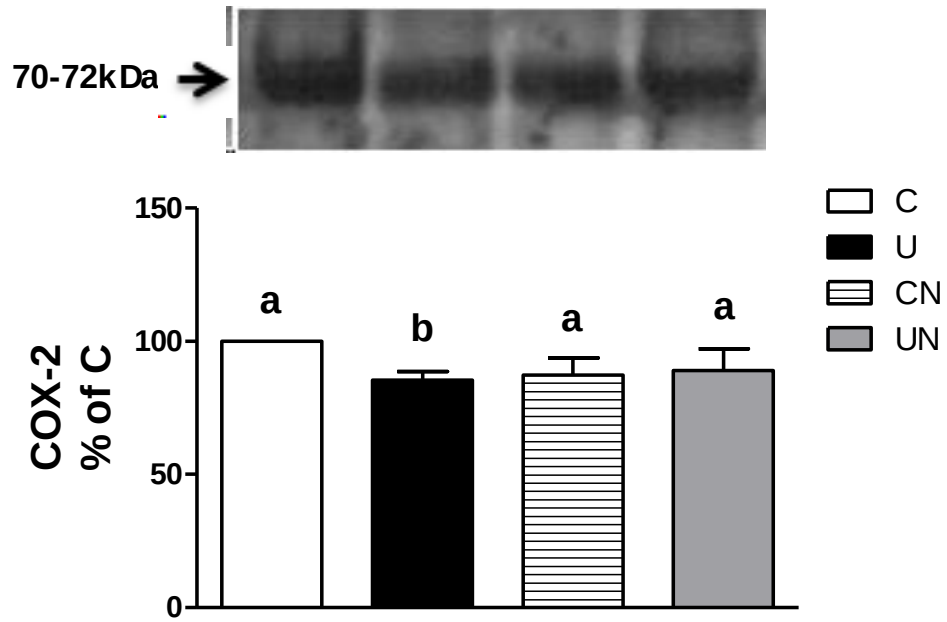


FIGURE 4

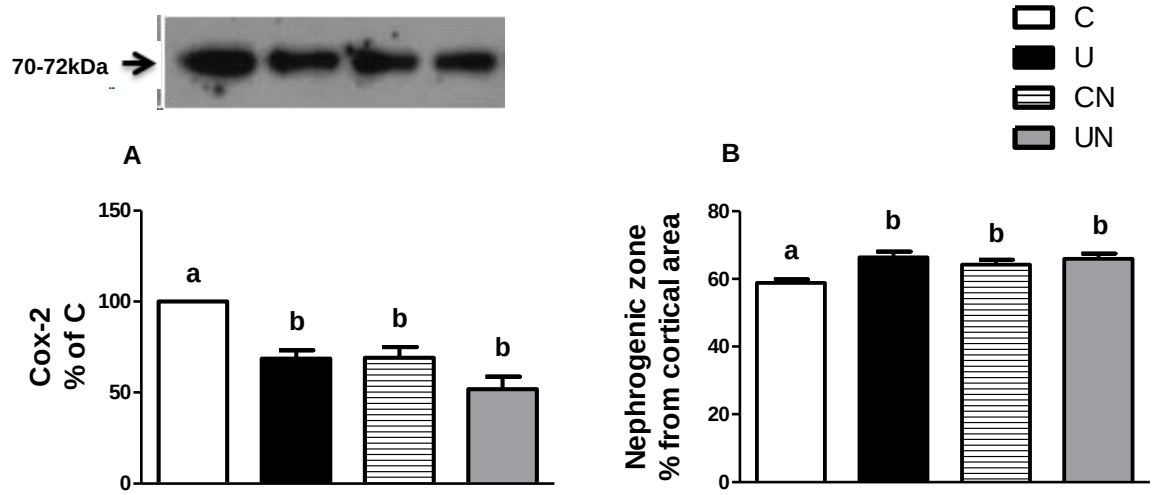
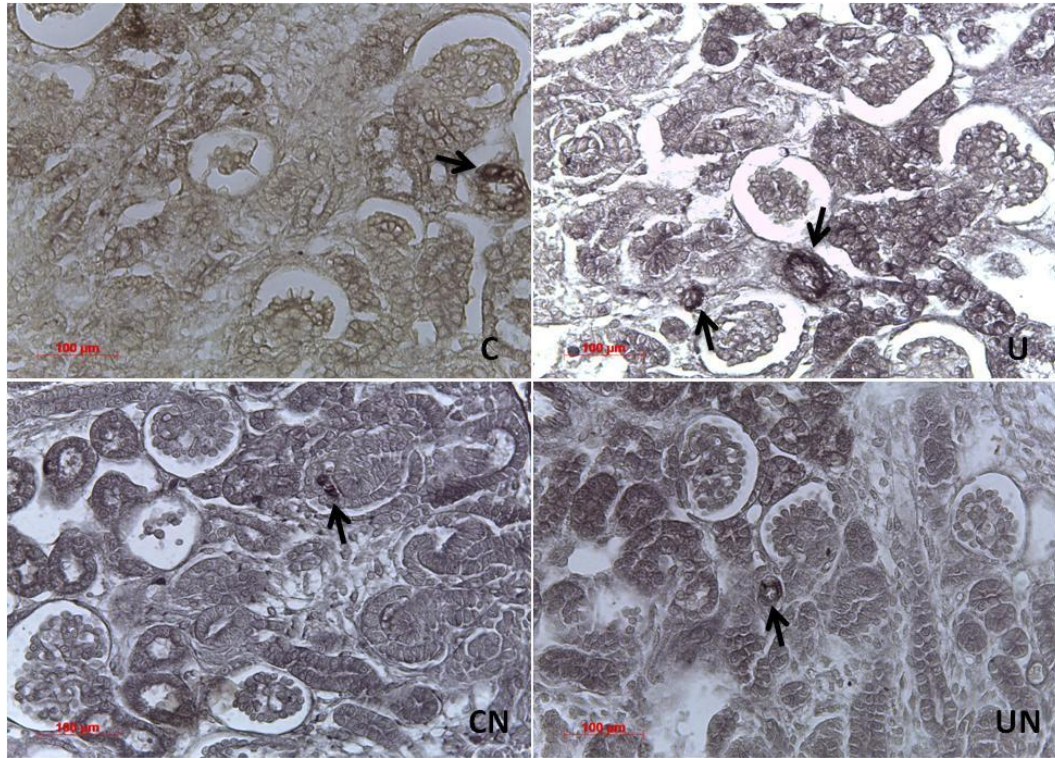
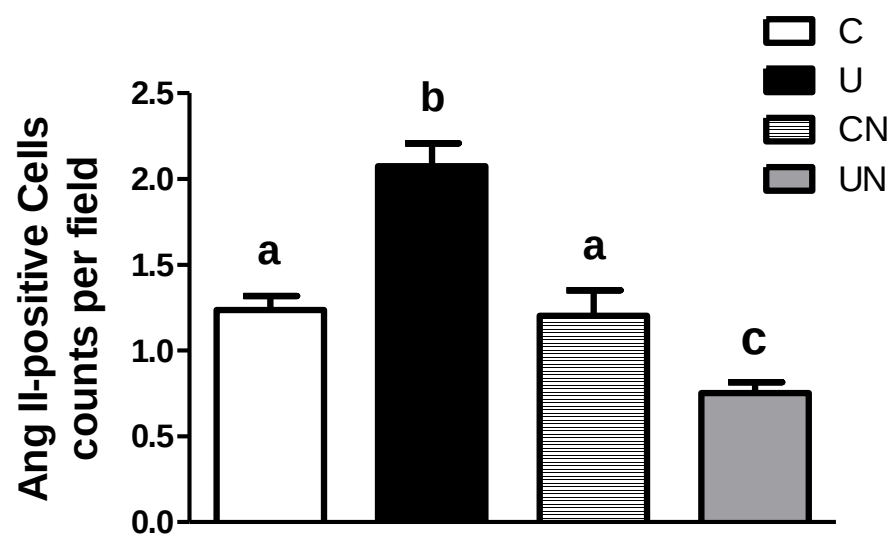
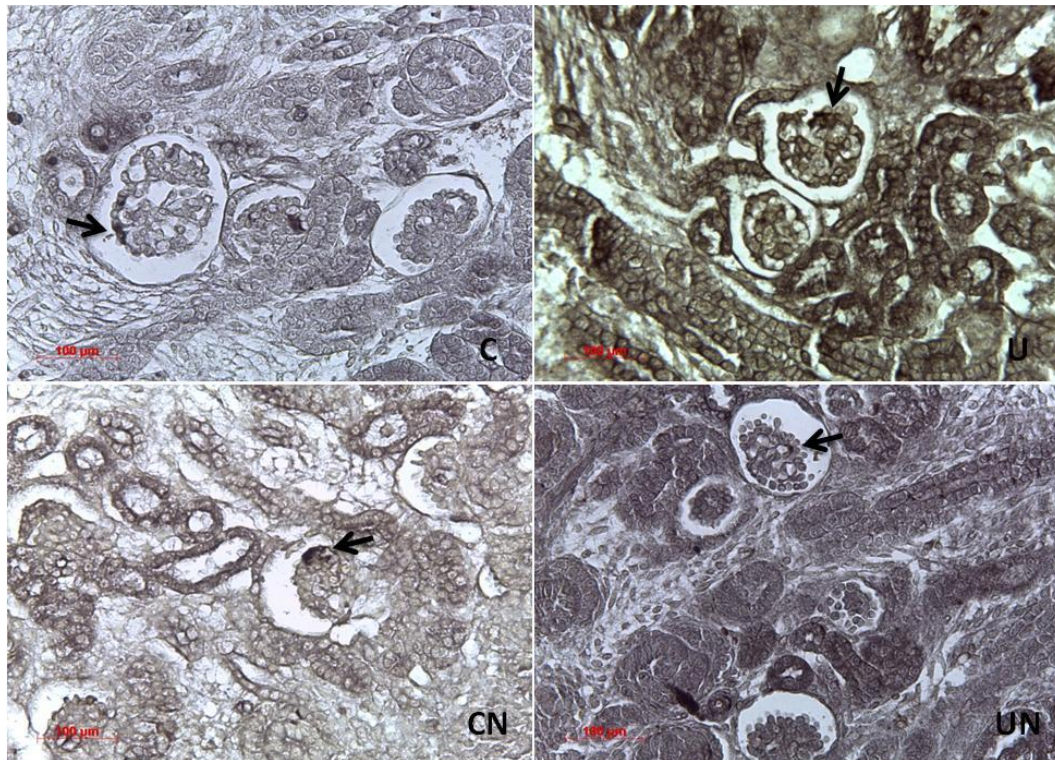


FIGURE 5**A****B**

C



D

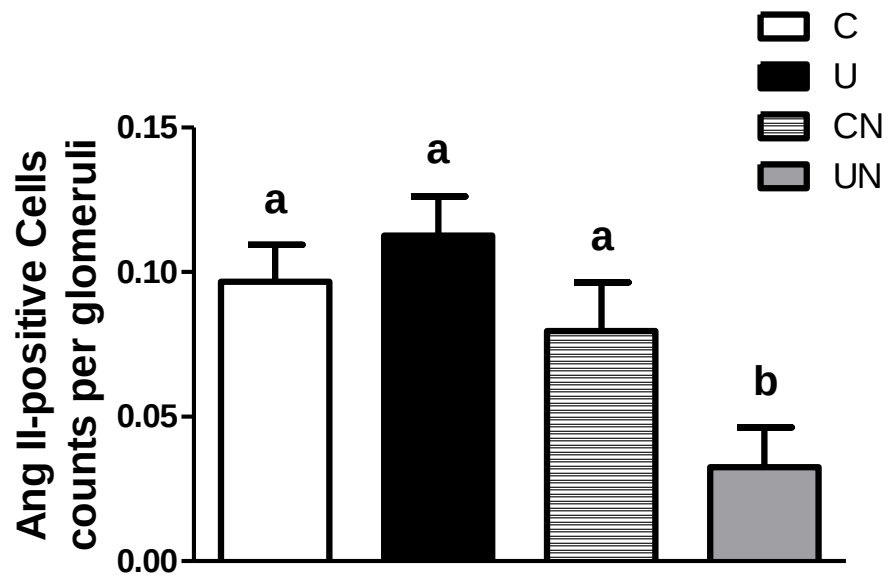
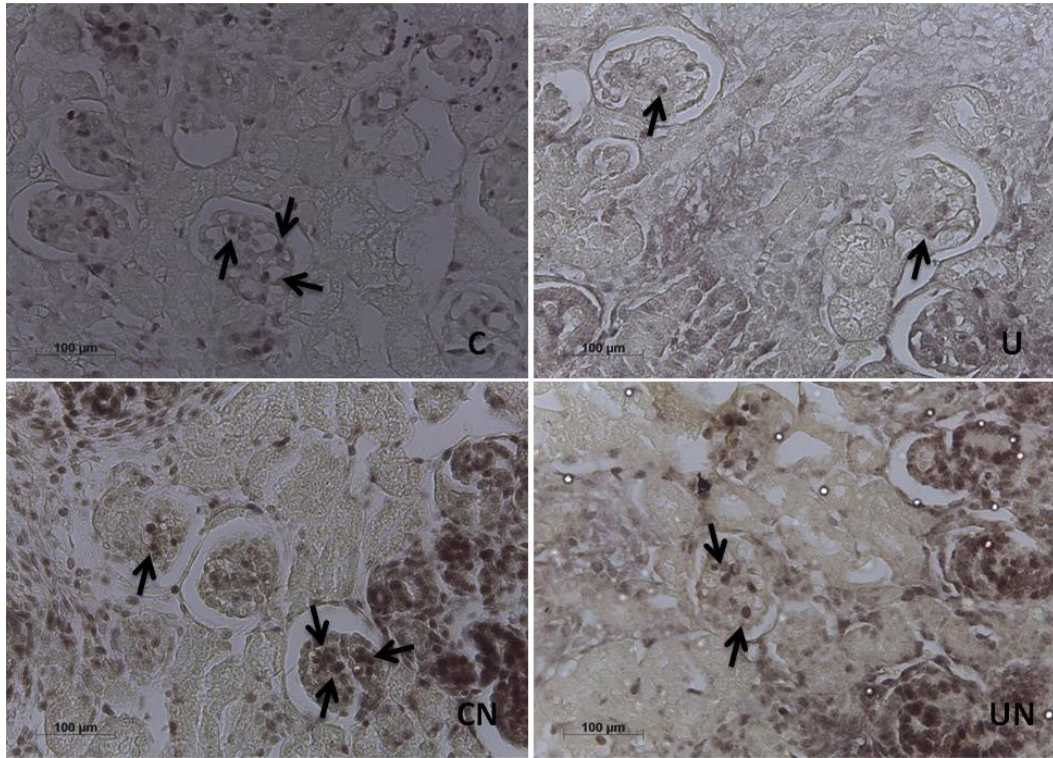
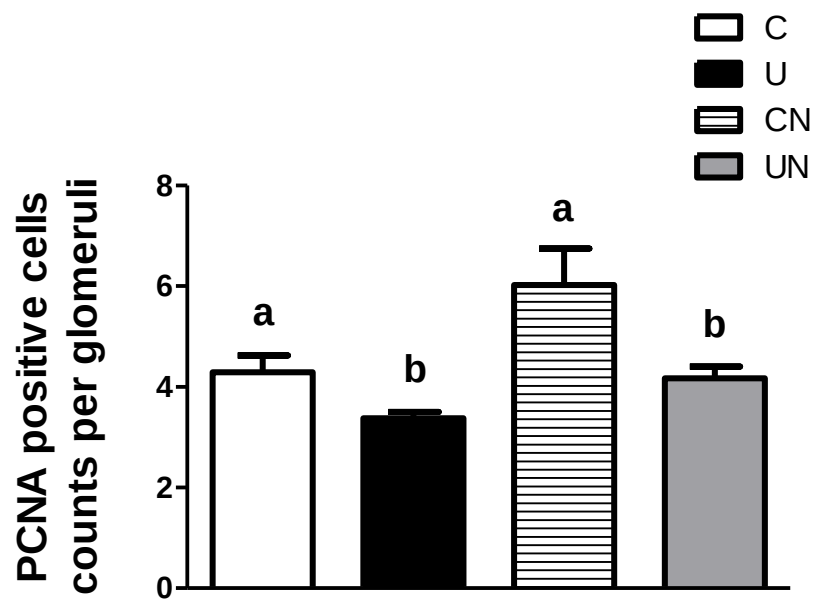


FIGURE 6

A



B



7 CONCLUSÃO

O estresse oxidativo placentário, observado em mães desnutridas é mediado pela atividade da COX-2. No entanto, a atividade da COX-2 pode ser necessária para manter a homeostase do volume extracelular materno em ratas grávidas desnutridas e também é necessário para manter o desenvolvimento renal fetal.

8 PERSPECTIVAS

1. Avaliar a repercussão da desnutrição, bem como da inibição da ciclooxigenase 2 no desenvolvimento placentário, através da análise histológica e morfométrica;
2. Avaliar marcadores de angiogênese na placenta e no rim, correlacionando estes achados com o desenvolvimento fetal.
3. Investigar se o efeito antioxidante, observado na placenta do grupo tratado com nimesulida, está relacionado à menor atividade da NADPH oxidase e consequentemente menor produção de superóxidos.

REFERÊNCIAS

ANTONUCCI R.; FANOS V. NSAIDs, prostaglandins and the neonatal kidney. **J Matern Fetal Neonatal Med.** v. 22, Suppl 3, p. 23-6, 2009.

AVNER E. D. et al. Sodium-potassium ATPase activity mediates cyst formation in metanephric organ culture. **Kidney Int.** v. 28, n. 3, p. 447-55, 1985.

BARD J. The molecular basis of nephrogenesis and congenital kidney disease. **Arch Dis Child.** v. 67, n. 8, p. 983-4, 1992.

BARKER, D. J.; BAGBY, S. P.; HANSON, M. A. Mechanisms of disease: in utero programming in the pathogenesis of hypertension. **Nature Clinical Practice Nephrology.** v. 2, n. 12, p. 700-7, 2006.

BATLOUNI M. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cardiovascular, cerebrovascular and renal effects. **Arq Bras Cardiol.** v. 94, n. 4, p. 556-63, 2010.

BAVDEKAR, A. et al. Insulin resistance syndrome in 8-year-old Indian children: small at birth, big at 8 years, or both? **Diabetes.** v. 48, n. 12, p. 2422-9, 1999.

BELKACEMI L. et al., Altered placental development in undernourished rats: role of maternal glucocorticoids. **Reprod Biol Endocrinol.** v. 1 p. 9:105, 2011.

BETTERIDGE D. J.. What is oxidative stress? **Metabolism.** v. 49, n. 2, Suppl 1, p. 3-8. 2000.

BIRBEN E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **The World Allergy Organization Journal.** v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.

BLOCK G. et al. Factors associated with oxidative stress in human populations. **American Journal of Epidemiology.** v. 1, n. 3, p. 274–85, Aug, 2002.

BRENNAN K. A. OLSON DM, SYMONDS ME. Maternal nutrient restriction alters renal development and blood pressure regulation of the offspring. **Proc Nutr Soc.** v. 65, n. 1, p. 116-24, 2006.

BRETT K. E. et al. Maternal-fetal nutrient transport in pregnancy pathologies: the role of the placenta. **Int J Mol Sci.** v. 15, n. 9, p. 16153-85, 2014

BUJOK K. et al. Interplay between the prostaglandin transporter OATP2A1 and prostaglandin E2-mediated cellular effects. **Cell Signal.** S0898-6568, n. 14, p. 00381-7, 2014.

BURDAN F.; CHALAS A.; SZUMILO J. Cyclooxygenase and prostanoids-biological implications. **Postepy Hig Med Dosw.** v. 60, p. 129-41, 2006.

BURTON G. J.; FOWDEN A. L. Review: The placenta and developmental programming: balancing fetal nutrient demands with maternal resource allocation. **Placenta.** v. 26, n. 33, p. 23-7, Feb, 2012.

CAMPEAN V. et al. Key enzymes for renal prostaglandin synthesis: site-specific expression in rodent kidney (rat, mouse). **Am. J. Physiol. Renal Physiol.** v. 285, p. 19–32, 2003.

CASTROP H. et al. Role of renocortical cyclooxygenase-2 for renal vascular resistance and macula densa control of renin secretion. **J. Am. Soc. Nephrol.** v. 12, p. 867–74, 2001.

COAN P. M.; FERGUSON-SMITH A. C.; BURTON G. J. Developmental dynamics of the definitive mouse placenta assessed by stereology. **Biol Reprod.** v. 70, p. 1806 1813, 2004.

CROSS J.C. et al. Genes, development and evolution of the placenta. **Placenta.** v. 24, n. 2-3, p. 123-30, 2003.

CONRAD, K. P. Renal hemodynamics during pregnancy in chronically catheterized, conscious rats. **Kidney Int.** v. 26, p. 24-29, 1984.

DALLEGRI F.; OTTONELLO L. Are there any differences among non-steroidal anti-inflammatory drugs? Focus on nimesulide. **Clin Drug Investig.** v. 1, p. 15-22, 2007.

DARMMANN, H. G. Preferential COX-2 inhibition: its clinical relevance for gastrointestinal non-steroidal anti-inflammatory rheumatic drug toxicity. **Gastroenterology.** v. 37, n. 1. p. 45-58, 1999.

EFFMANN E. L.; Ablow R. C.; Siegel N. J. Renal growth. **Radiol Clin North Am.** v. 15, n. 1, p. 3-17, 1977.

FARJANEL J. et al. An accurate method of plasma volume measurement by direct analysis of Evans blue spectra in plasma without dye extraction: origins of albumin-space variations during maximal exercise. **European journal of applied physiology and occupational physiology.** v. 75, n. 1, p. 75–82, 1997.

FOWDEN A. L.; GIUSSANI D. A.; FORHEAD A. J. Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. **Physiology (Bethesda).** v. 21, p. 29-37, 2006.

FRANCISCO L. L., OSBORN J. L., DIBONA G.F. Prostaglandin in renin release during sodium deprivation. **Am J Physiol.** v. 243, n. 6, p. F537-42, 1982.

FURUKAWA S. et al. Toxicological pathology in the rat placenta. **J Toxicol Pathol.** v. 24, n. 2, p. 95-111, 2011.

GEORGIADES P.; FERGUSON-SMITH A. C.; BURTON G. J. Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. **Placenta.** v. 23, n. 3, p. 19, 2002.

GUAN Y. et al. Cloning, expression, and regulation of rabbit cyclooxygenase-2 in renal medullary interstitial cells. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.** v. 273, p. F18–26, 1997.

HABEK, D. et al. Fetal biophysical profile and cerebro-umbilical ratio in assessment of brain damage in growth restricted fetuses. **European Journal of Obstetrics, Gynecology, and reproductive Biology.** v. 114, n. 1, p. 29–34, 2004.

HALLAN, S. et al. Effect of intrauterine growth restriction on kidney function at young adult age: the Nord Trøndelag Health (HUNT 2). **American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation.** v. 51, n. 1, p. 10- 20, 2008.

HAO C. M. et al. Selective targeting of cyclooxygenase-2 reveals its role in renal medullary interstitial cell survival. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.** v. 277, p. F352–59, 1999.

HARRIS R. C. et al. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. **J. Clin. Invest.** v. 94, p. 2504–10, 1994.

HARRIS R. C. Physiologic and pathophysiologic roles of cyclooxygenase-2 in the kidney. **Trans Am Clin Climatol Assoc.** v. 124, p. 139-51, 2013.

HAUSERMANN L.; ST-LOUIS J. Thromboxane and isoprostane share the same prostanoid receptors to increase human placental tone. **Placenta.** v. 32, n. 12, p. 941-8, 2011.

HOET, J. J.; HANSON, M. A. Intrauterine nutrition: its importance during critical periods for cardiovascular and endocrine development. **Journal of Physiology.** v. 514, n. 3, p. 617-27, 1998.

HIDA T. et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor induces apoptosis and enhances cytotoxicity of various anticancer agents in non-small cell lung cancer cell lines. **Clin Cancer Res.** v. 6, n. 5, p. 2006-11, 2000.

IRMESI R. et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in the management of patent ductus arteriosus (PDA) in preterm infants and variations in attitude in clinical practice: a flight around the world. **Curr Med Chem.** v. 21, n. 27, p. 3132-52, 2014.

JI L. et al. Placental trophoblast cell differentiation: physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia. **Molecular Aspects of Medicine.** v. 28, n. 12, p. 142-2, 2012.

KAY H.H., GRINDLE K. M., MAGNESS R. R. Ethanol exposure induces oxidative stress and impairs nitric oxide availability in the human placental villi: a possible mechanism of toxicity. **Am J Obstet Gynecol.** v. 182, n. 3, p. 682-8, 2000.

KÖMHOFF M. Cyclooxygenase-2 expression is associated with the renal macula densa of patients with Bartter-like syndrome. **Kidney Int.** v. 58, n. 6, p. 2420-4, 2000.

KOPFF M. et al. The effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on oxidative/antioxidative balance. **Polski merkuriusz lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego.** v. 23, n. 135, p. 184-7, 2007.

KUMMER C. L.; COELHO T. C. R. B. Cyclooxygenase-2 Inhibitors Nonsteroid Anti-Inflammatory Drugs: Current Issues. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v. 52, n. 4, p. 498–512, 2002.

LANGLEY-EVANS, S.C. Developmental programming of health and disease. **Proc. Nutr. Soc.** v. 65, p. 97–105, 2006.

LECHNER M. S., DRESSLER G. R. The molecular basis of embryonic kidney development. **Mechanisms of development**. v. 62, n. 2, p. 105-20, 1997.

LOPES L. M.; FRANCISCO R. P. V.; ZUGAIB M. Anti-inflammatory agents and cardiac abnormalities. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** v. 32, n. 1, 2010.

LÓPEZ-VILLODRES J. A. et al. Cytoprotective effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in rat brain slices subjected to reoxygenation after oxygen-glucose deprivation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 45, n. 5, p. 624-31, 2012.

LOWRY O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 193, n. 1, p. 265–75, 1951.

LOUDON J. A.; GROOM K. M.; BENNETT P. R. Prostaglandin inhibitors in preterm labour. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**. v. 17, n. 5, p. 731-44, 2003.

LUCAS, A. In: Programing by nutrition in man. Conning D, ed. Early diet, later consequences. London: British Nutrition Federation, p. 24, 1992.

LV P. P. et al. COX-2 inhibitor nimesulide protects rat heart against oxidative stress by improving endothelial function and enhancing NO production. **Acta Physiologica Sinica**. v. 59, n. 5, p. 674-80, 2007.

MAGEE T. R. et al. Maternal undernourished fetal kidneys exhibit differential regulation of nephrogenic genes including downregulation of the Notch signaling pathway. **Reprod Sci**. v. 18, n. 6, p. 563-76, 2011.

MAJED B. H.; KHALIL R. A. Molecular mechanisms regulating the vascular prostacyclin pathways and their adaptation during pregnancy and in the newborn. **Pharmacological Reviews**. v. 64, n. 3, p. 540-82, 2012.

MARTÍNEZ-REVELLES S. et al. Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. **Antioxid Redox Signal**. v. 1, n. 1, p. 51-65, 2012.

MATSUBARA S.; SATO I. Enzyme histochemically detectable NAD(P)H oxidase in human placental trophoblasts: normal, preeclamptic, and fetal growth restriction-complicated pregnancy. **Histochemistry and Cell Biology**. v. 116, n. 1, p. 1-7, 2001.

MATSUOKA T.; NARUMIYA S. Prostaglandin receptor signaling in disease. **Scientific World Journal**. v. 1, n. 7, p. 1329-47, 2007.

MAZZUCA M. Q. et al. Uteroplacental insufficiency programs regional vascular dysfunction and alters arterial stiffness in female offspring. **The Journal Physiological**. v. 588, n. 11, p. 1997-2010, 2010.

MORITZ K. M. et al. Factors influencing mammalian kidney development: implications for health in adult life. **Adv Anat Embryol Cell Biol**. v. 196, p. 1-78, 2008.

MYATT L, C. X. Oxidative stress in the placenta. **Histochem Cell Biol**. v. 122, n. 4, p. 369-82, 2004.

MUTLU-TÜRKÖGLÜ U. et al. Imbalance between lipid peroxidation and antioxidant status in preeclampsia. **Gynecologic and obstetric investigation**. v. 46, n. 1, p. 37-40, 1998.

MURPHY V. E. et al. Endocrine Regulation of Human Fetal Growth: The Role of the Mother, Placenta, and Fetus. **Endocrine Reviews**. v. 27, n. 2, p. 141–69, 2006.

NARUMIYA S. Physiology and pathophysiology of prostanoid receptors. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci**. v. 83, n. 9-10, p. 296-319, 2007.

NEWAZ M.; YOUSEFIPOUR Z. PPAR γ and NAD(P)H oxidase system interaction in glycerol-induced acute renal failure: role of gp91phox subunit of NAD(P)H oxidase. **Ren Fail**. v. 36, n. 4, p. 567-74, 2014.

O'BANNION, M. K. Crit. Rev. **Neurobiol.**, v.13, p.45-82. 1999.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**. v. 95, n. 2, p. 351–8, 1979.

PERRONE S. et al. Oxidative kidney damage in preterm newborns during perinatal period. **Clinical Biochemistry**. v. 40, n. 9/10, p. 656-60, 2007.

PRÉVOT A. et al. Nimesulide, a Cyclooxygenase-2 Preferential Inhibitor, Impairs Renal Function in the Newborn Rabbit. **Pediatric Research** v. 55, p. 254–260, 2004.

REIK, W. et al. Regulation of supply and demand for maternal nutrients in mammals by imprinted genes. **The Journal of Physiology**. v. 15, n. 547, p. 35-44, 2003.

REVERTE V. et al. Renal effects of prolonged high protein intake and COX2 inhibition on hypertensive rats with altered renal development. **American Journal of Physiology – Renal Physiology**. v. 301, n. 2, p. F327-33, 2011.

ROY-CLAVEL E. et al. Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats. **American journal of obstetrics and gynecology**. v. 180, n. 3, p. 608–613, 1999.

SAWDY R. et al. Use of a cyclo-oxygenase type-2-selective non-steroidal anti-inflammatory agent to prevent preterm delivery. **Lancet**. v. 350, n. 9073, p. 265–266, 1997.

SAIFUDEEN Z. et al. Spatial repression of PCNA by p53 during kidney development. **Am J Physiol Renal Physiol** v. 283, p. F727–F733, 2002.

SAEZ, F. et al. Hypertension and Sex Differences in the Age-Related Renal Changes When Cyclooxygenase-2 Activity Is Reduced During Nephrogenesis. **Hypertension**. v. 53, n. 2, p. 331-7, 2009.

SEDLAK J.; LINDSAY R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**. v. 25, n. 1, p. 192–205, 1968.

SILVA B. R.; PERNOMIAN L.; BENDHACK L. M. Contribution of oxidative stress to endothelial dysfunction in hypertension. **Frontiers in Physiology**. v. 3, n. 441, 2012.

SILVA L. A. et al. Prenatal undernutrition changes renovascular responses of nimesulide in rat kidneys. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. v. 108, n. 2, p. 115-21, 2010.

SIMÕES M. R. et al. MAPK pathway activation by chronic lead-exposure increases vascular reactivity through oxidative stress/cyclooxygenase-2-dependent pathways. **Toxicol Appl Pharmacol**. v. 283, n. 2, p. 127-138, 2015.

SIMON A. R. et al. Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species. **Am J Physiol**. v. 275, p. C1640-C1652, 1998.

SHEWCHUK B. M. Prostaglandins and n-3 polyunsaturated fatty acids in the regulation of the hypothalamic-pituitary axis. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**. v. 91, n. 6, p. 277-87, 2014.

TIAN Y. F. et al. The importance of cyclooxygenase 2-mediated oxidative stress in obesity-induced muscular insulin resistance in high-fat-fed rats. **Life Sciences**. v. 89, n. 3/4, p. 107-14, 2011.

THIEX N. W.; CHAMES M. C.; LOCH-CARUSO R. K. Tissue-specific induction of COX-2 and prostaglandins in lipopolysaccharide-stimulated extraplacental human gestational membranes in a 2-chamber transwell culture system. **Reprod Sci**. v. 17, n. 12, p. 1120-9, 2010.

TUFRO-MCREDDIE A. et al. Ontogeny of type 1 angiotensin II receptor gene expression in the rat. **J Clin Invest**. v. 91, n. 2, p. 530-7, 1993.

UTTARA B, SINGH AV, ZAMBONI P, MAHAJAN RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Curr Neuropharmacol**. v. 7, n. 1, p. 65-74, 2009.

WALSH, S.W. Eicosanoids in preeclampsia. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**. v. 70, n. 4, p. 223-232, 2004.

WILLOUGHBY D. A.; MOORE A. R.; COLVILLE-NASH P. R. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. **Lancet**. v. 355, n. 9204, p. 646-8, 2000.

WU, G.; IMHOFF-KUNSCH B.; GIRARDC A. W. Biological Mechanisms for Nutritional Regulation of Maternal Health and Fetal Development. **Paediatric and Perinatal Epidemiology**. v. 26, p. 4–26, 2012.

YANG T. et al. Regulation of cyclooxygenase expression in the kidney by dietary salt intake. **Am. J. Physiol. Renal Physiol**. v. 274, p. 481–89, 1998.

ZANDI-NEJAD K.; LUYCKX V. A.; BRENNER B. M. Adult hypertension and kidney disease: the role of fetal programming. **Hypertension**. v. 47, n. 3, p. 502-8, 2006.

ZOHDI V1, LIM K2, PEARSON JT3, BLACK MJ4. Developmental Programming of Cardiovascular Disease Following Intrauterine Growth Restriction: Findings Utilising A Rat Model of Maternal Protein Restriction. **Nutrients**. v. 7, n. 1, p. 119-152, 2014