

UNIVERSIDADE PAULISTA

**AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA, HISTOQUÍMICA E
IMUNO-HISTOQUÍMICA DO CORAÇÃO DE RATAS SHR
PRENHES SUBMETIDAS À SUPLEMENTAÇÃO ORAL
COM L-ARGININA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

PETER MICHAEL NEUFELD

São Paulo

2015

UNIVERSIDADE PAULISTA

**AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA, HISTOQUÍMICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DO CORAÇÃO DE RATAS SHR PRENHES
SUBMETIDAS À SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM L-ARGININA**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Patologia Ambiental e
Experimental da Universidade Paulista – UNIP,
para a obtenção do título de Mestre em
Patologia Ambiental e Experimental

Orientador: Prof. Dr. José Guilherme
Xavier

PETER MICHAEL NEUFELD

São Paulo
2015

UNIVERSIDADE PAULISTA

**AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA, HISTOQUÍMICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DO CORAÇÃO DE RATAS SHR PRENHES
SUBMETIDAS À SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM L-ARGININA**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Patologia Ambiental e
Experimental da Universidade Paulista – UNIP,
para a obtenção do título de Mestre em
Patologia Ambiental e Experimental

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

_____/_____
Prof. Dr. José Guilherme Xavier – UNIP

_____/_____
Prof. Dr. Cássio Marcos Vilicev - UNIP

_____/_____
Prof. Dr. Cristiane Lopes - USP

Dedicatória

Às minhas amadas: esposa Cecília e filha Ana Beatriz, a razão de todo meu esforço

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, e pela oportunidade que me concedeu de estudar aspectos biológicos inerentes a essa mesma vida.

À minha esposa Cecília por todo suporte, incentivo e paciência. Não há métodos de mensuração significantes capazes de quantificar o quanto valorizo sua ajuda.

Ao Prof. Dr. José Guilherme Xavier, meu orientador, que com sua capacidade, experiência e dedicação superaram minhas expectativas.

À minha família e amigos pelas orações.

Ao corpo docente, coordenadores e colaboradores (secretaria) do Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental, por terem aceito essa linha de pesquisa.

Resumo

As doenças cardiovasculares são as principais causas de óbito na população, destacando-se a hipertensão arterial sistêmica (HAS), associada a alterações funcionais e/ou estruturais do coração. A hipertensão pode ocorrer como uma complicação na gestação, evento caracterizado por uma adaptação no sistema cardiovascular materno, determinando, hipertrofia cardíaca transitória, com modificações em cardiomiócitos, fibroblastos e na matriz extracelular. Dentre os possíveis mecanismos fisiopatológicos da HAS está a menor bioatividade do óxido nítrico (NO), um radical livre produzido a partir da L-arginina pela ativação da enzima sintase do óxido nítrico. Neste estudo, buscando uma maior compreensão da resposta adaptativa cardíaca, e da atividade do NO no processo, foi investigado o efeito da suplementação oral de L-ARG durante o período de prenhez, sobre a estrutura cardíaca de 20 ratas espontaneamente hipertensas primíparas, divididas em grupos controle não-prenhe, controle prenhe, e suplementados com L-arginina a 2% e a 4%, realizando-se análises morfométricas, histológicas e imuno-histoquímicas. Identificou-se um aumento do peso úmido cardíaco nos animais tratados com L-arginina 4%, associado à redução do tamanho de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo e ausência de fibrose e de ativação miofibroblástica. Tais achados indicam uma atividade anti-hipertrófica da L-arginina a 4% sobre o coração de ratas SHR prenhes.

Palavras-chave: coração; hipertensão arterial; matriz extracelular; morfologia; óxido nítrico

Sumário

1. Introdução.....	8
2. Material e Método.....	9
3. Resultados.....	11
4. Discussão.....	15
5. Conclusão.....	18
6. Referência bibliográficas.....	19
Anexo – CEUA.....	22

1. Introdução

As doenças cardiovasculares são as principais causas de óbito na população, identificando-se, em paralelo ao aumento da expectativa de vida, um número crescente de pacientes que sobrevivem a quadros hipertensivos e infartos do miocárdio, demandando um amplo conhecimento acerca dos eventos adaptativos e reparativos ativados no sistema. Dentro desse contexto, devido à sua elevada incidência, é a hipertensão essencial, um problema mundial de saúde pública que cursa assintomático até fases evolutivas avançadas¹. Um importante modelo de estudo dessa condição é representado pela linhagem de ratos espontaneamente hipertensos (SHR)². A hipertensão arterial sistêmica (HAS) associa-se a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo, em particular do coração, destacando-se a hipertrofia do ventrículo esquerdo, com modificações em cardiomiócitos, fibroblastos e na matriz extracelular (MEC)³. A MEC atua como um condutor de sinais químicos, físicos e elétricos desde o interstício, estimulando alterações morfológicas, funcionais e fenotípicas nas células⁴. A hipertensão constitui-se em uma importante complicação na prenhez, condição caracterizada por adaptações no sistema cardiovascular materno, cursando com uma sobrecarga volumétrica e um estado hiperdinâmico, determinando, com frequência, hipertrofia cardíaca transitória⁵⁻⁸. Umas das primeiras alterações relacionadas ao desenvolvimento do distúrbio hipertensivo é a transdiferenciação de fibroblastos em miofibroblastos⁹, contribuindo para a modificação da MEC local¹⁰.

Dentre os possíveis mecanismos fisiopatológicos da HAS está a menor bioatividade do óxido nítrico (NO), um radical livre produzido a partir da L-arginina em várias células, incluindo as endoteliais, pela ativação da enzima sintase do óxido nítrico (NOS). Três isoformas da enzima, endotelial, neuronal e induzida foram identificadas em cardiomiócitos¹¹. O NO produzido no coração é apontado como inibidor endógeno da cascata de sinalização que induz à hipertrofia cardíaca¹². As primeiras evidências de que o NO pode apresentar efeitos anti-hipertróficos no coração foram obtidas em ratos SHR sob tratamento crônico com L-arginina (L-ARG)¹³. Esse efeito é variável, existindo condições em que a suplementação não reverte a pressão sanguínea e a hipertrofia cardíaca em ratos hipertensos^{14,15}. Neste estudo, buscando uma

maior compreensão da resposta adaptativa cardíaca, e da atividade do NO no processo, é investigado o efeito da suplementação oral de L-ARG sobre a morfologia cardíaca de ratas SHR primíparas prenhas, com particular interesse em cardiomiócitos, fibroblastos e a matriz extracelular locais, empregando análises morfométricas, histológicas e imuno-histoquímicas.

2. Material e Método

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIP sob o protocolo 180/13 (anexo 1).

Foram utilizados 26 animais, sendo 6 ratos machos SHR e 20 ratas fêmeas SHR, com 90 dias de idade, mantidos em microisoladores (Techniplast®) no Biotério de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa da Universidade Paulista – UNIP (Campus Indianópolis), com controle de temperatura ($22\pm2^{\circ}\text{C}$), umidade (55-65%), trocas de ar (75 ciclos/hora) e ciclos alternados de claro/escuro de 12 horas, recebendo água e ração comercial *ad libitum*. As fêmeas foram acasaladas (1:1) com revezamento dos machos, realizando-se a detecção de prenhez a partir de avaliação de lavado vaginal. A suplementação com L-arginina foi iniciada após a confirmação da gestação, estendendo-se até o nascimento da prole, em 21 dias. As ratas foram divididas em grupos de 5 animais, designados como C: controle não-prenhe, Cp: controle prenhe; 2%: fêmeas prenhas com suplementação de L-ARG (2%); 4%: fêmeas prenhas com suplementação de L-ARG (4%). A suplementação foi oferecida “*ad libitum*” na água de beber. Após o nascimento da prole, as ratas foram eutanasiadas, pesadas e necropsiadas, sendo os corações coletados, pesados (peso úmido) e imersos em solução de formol a 10%. Tais dados permitiram o cálculo das massas úmidas cardíacas, absoluta e relativa (massa cardíaca/massa corpórea). Para a análise macroscópica cardíaca foi feita uma secção transversal no órgão com a utilização de um bisturi (primeira secção a 0,5 cm do ápice cardíaco e a segunda a 0,8 cm do ápice) para a medição da espessura da parede do ventrículo esquerdo (VE), ventrículo direito (VD) e do septo interventricular (S), com a utilização de um paquímetro.

Posteriormente foram realizados cortes do coração, submetidos aos procedimentos rotineiros de processamento histológico, emblocagem em

parafina e microtomia, dispondo-se cortes teciduais com 4 µm de espessura sobre lâminas histológicas, e corados pelos métodos de hematoxilina-eosina (HE), tricrômico de Masson, picrosírius e Verhoeff. Os cortes foram analisados em microscópio óptico, obtendo-se imagens digitalizadas, capturadas pelo sistema NIKON E 200 - Coolpix®, submetidas a avaliação morfométrica com o emprego do software Metamorph®, avaliando-se corações dos diferentes grupos, quantificando-se a área nuclear média. Para a aferição da área nuclear dos cardiomiócitos, a partir das fotomicrografias das lâminas coradas com HE, foi realizado o delineamento manual da carioteca com o auxílio do cursor, lâmina a lâmina, mensurando-se as estruturas de interesse em pixels.

Também, amostras cardíacas foram submetidas a procedimento imuno-histoquímico, empregando-se anticorpo antialfa actina de músculo liso, clone CGA7, Santa Cruz®, na diluição e 1:100. Cortes histológicos de 4 µm foram dispostos em lâminas e submetidos à recuperação antigênica pelo calor em panela de pressão, contendo solução tampão de citrato de sódio a 0,01M, pH 6,5, por 5 minutos em ebulação. Após resfriamento da solução foi realizada lavagem das lâminas em solução salina tamponada (PBS). Em sequência, o material foi submetido a bloqueio da peroxidase endógena através da incubação por 30 minutos em solução contendo 80% de álcool metílico e 20% de peróxido de hidrogênio 30 volumes, seguindo-se lavagem das lâminas por 3 vezes em PBS. A etapa seguinte aplicou-se a incubação com o anticorpo primário, diluído em solução composta por 0,5 ml de azida sódica a 5%, 0,25 ml de albumina bovina fração V (Sigma) a 5% e 12 ml de PBS. As lâminas permaneceram em câmara úmida por 12h a 4°C. Retiradas as lâminas da câmara úmida, foi feita a lavagem com pisseta contendo tampão TRIS-HCl ph 7,6, seguindo-se a incubação com anticorpo secundário e complexo peroxidase (EXPOSE HRP Link, EXPOSE HRP Enzyme, abcam®). Após incubação as lâminas foram lavadas com pisseta contendo tampão TRIS-HCl pH 7,6. Para revelação foi empregada solução contendo 20 µL do cromógeno diaminobenzidina para cada mL de cloridrato de imidazol ph 7,5 sobre a lâmina, seguindo-se a lavagem com tampão TRIS-HCl pH 7,6, contracorando-se pela hematoxilina, lavagem das lâminas em água corrente e um banho rápido em água amoniacial a 0,2%, desidratação, diafanização e montagem em resina sintética e lamínula.

Os dados provenientes das mensurações macroscópica e histomorfométrica foram submetidos a avaliação estatística, empregando-se o software Graph Prisma 5, utilizando-se a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey-Kramer.

3. Resultados:

O procedimento experimental apresentou a duração de 21 dias, seguindo-se a eutanásia dos animais. Em sua maioria, os parâmetros macroscópicos de avaliação cardíaca não indicaram diferença entre os grupos. Assim, formato, superfície externa e de corte, consistência e coloração apresentaram-se semelhantes. No entanto, evidenciou-se diferença significante entre a massa úmida cardíaca, absoluta e relativa, na comparação entre os grupos controle prenhe e 4% (figura 1).

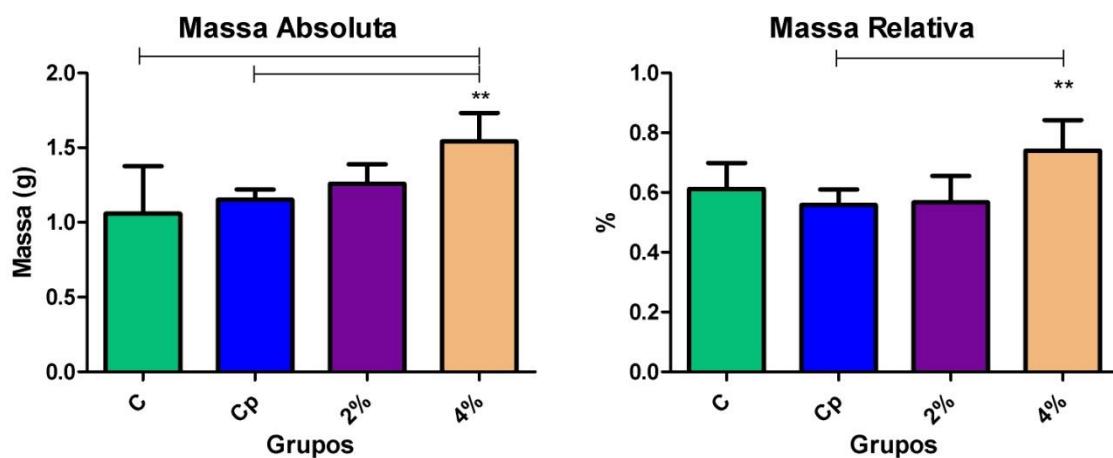


Figura 1. Gráficos exibindo a massa úmida absoluta e relativa do coração, nos grupos controle (C), controle prenhe (Cp), 2% e 4%, evidenciando-se diferença estatisticamente significante referente ao peso absoluto cardíaco entre ambos os grupos controle em relação ao grupo 4%, $p<0,01$ e referente ao peso relativo entre os grupos controle prenhe e 4%, $p<0,01$. ANOVA-Tukey-Kramer.

Houve diferença em relação à espessura de parede de ventrículo esquerdo (VE) e do septo interventricular (S) (tabela 1 e figura 2). Comparativamente, a partir da mensuração das espessuras das paredes

cardíacas com paquímetro, identificou-se uma menor espessura de parede de VE nos animais do grupo 4% em relação aos do grupo controle ($p<0,05$). Quanto ao septo verificou-se uma menor espessura do grupo controle prenhe em relação ao grupo controle ($p<0,05$) e nos grupos 2% e 4% em relação ao grupo controle ($p<0,01$ e $p<0,05$).

	S	VE
C	0,29±0,02	0,35±0,05
Cp	0,22±0,02*	0,29±0,05
2%	0,21±0,02**	0,29±0,02
4%	0,22±0,04*	0,25±0,05*

Tabela 1. Mensuração das espessuras do septo interventricular (S) e ventrículo esquerdo (VE), feitas com paquímetro (cm), com cálculo das médias e desvio padrão. **Cx2% com diferença estatisticamente significante, $p<0,01$ (S), *CxCp, Cx4% (S) e Cx4% (VE) com diferença estatisticamente significante, $p<0,05$.

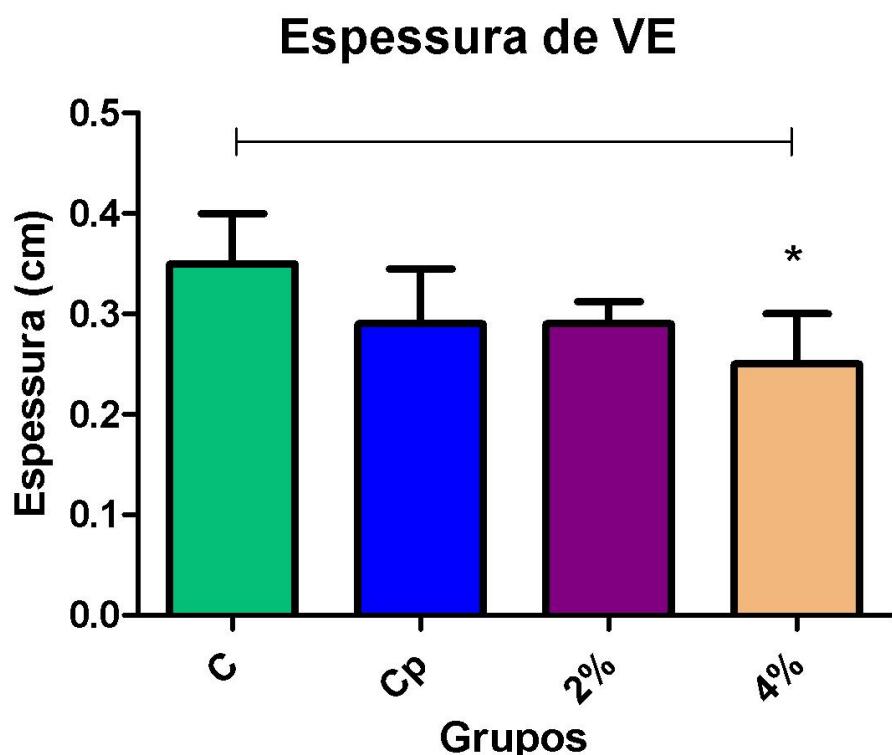


Figura 2. Gráfico exibindo a média da espessura ventricular esquerda nos grupos controle (C), controle prenhe (Cp), 2% e 4%, evidenciando-se diferença estatisticamente significante entre a espessura no grupo controle em relação ao grupo 4%. ANOVA-Tukey-Kramer, $p<0,05$.

Histologicamente, observou-se preservação arquitetural e celular em ventrículos e septos interventriculares em todos os grupos, com a distribuição dos cardiomiócitos em feixes, associados à população fibroblástica e endotelial, suportados por um estroma delicado (figura 3).

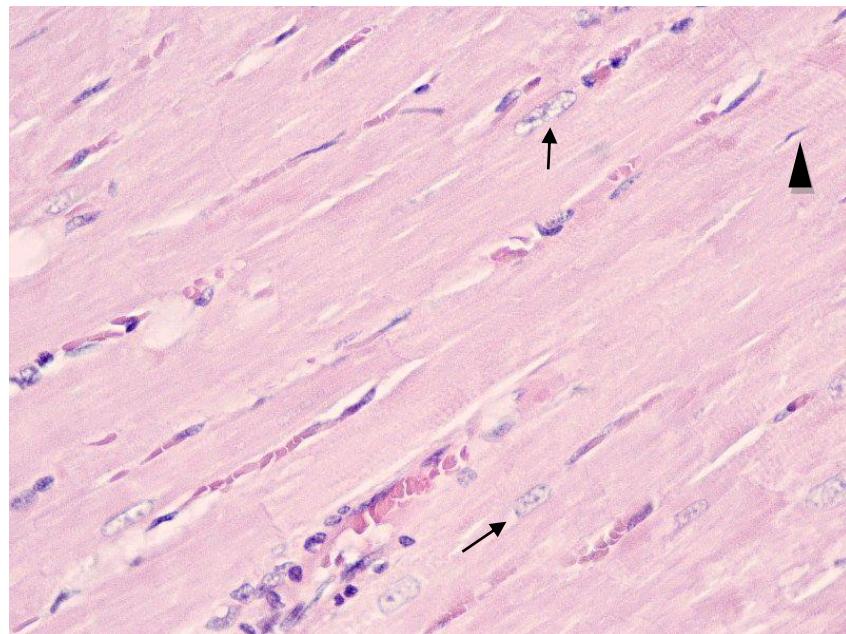


Figura 3. Fotomicrografia de corte histológico de ventrículo esquerdo de coração de rata do grupo controle prenhe, exibindo cardiomiócitos dispostos em feixes (setas), acompanhados por fibroblastos (ponta de seta) e células endoteliais, HE, 10x.

A avaliação morfométrica cardíaca revelou uma redução, estatisticamente significante, na área nuclear média de cardiomiócitos dos animais suplementados com L-arginina 2% e 4% (figura 4).

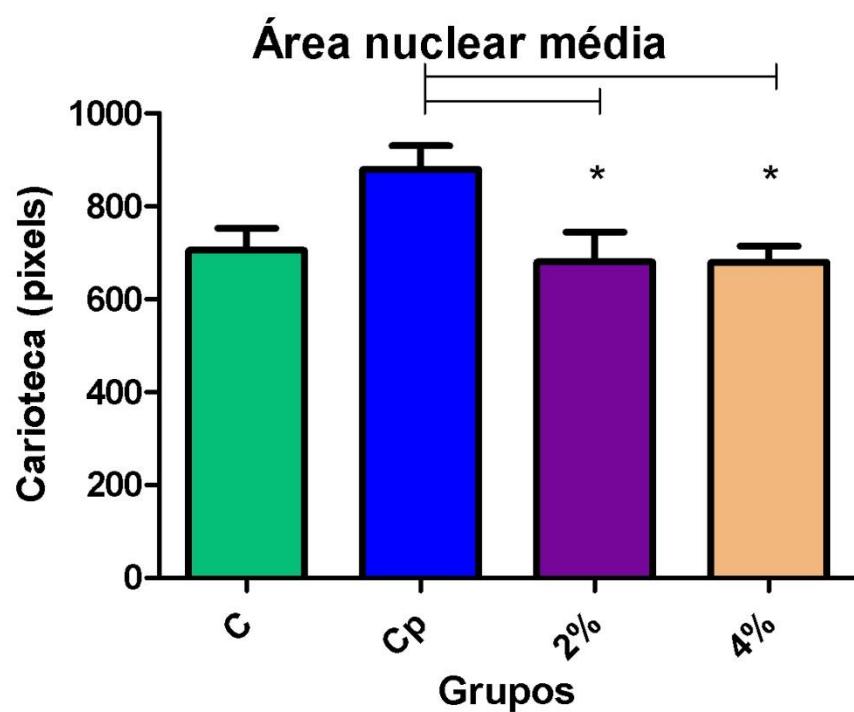
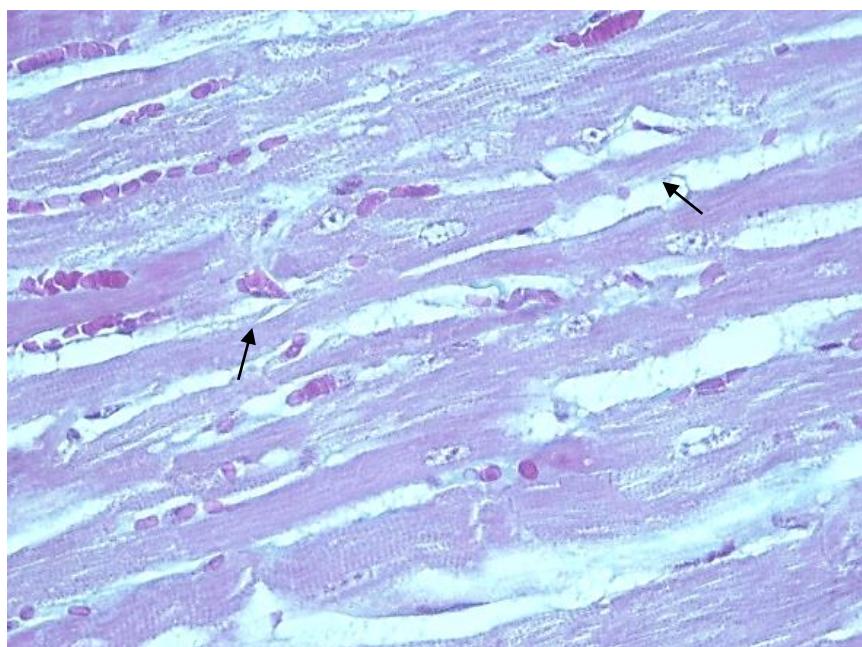


Figura 4. Gráfico exibindo a área nuclear média em cardiomiócitos nos grupos controle (C), controle prenhe (Cp), 2% e 4%, evidenciando-se diferença estatisticamente significante entre a área nuclear média no grupo controle prenhe em relação ao 2% e 4% ($p<0,05$). ANOVA-Tukey-Kramer,

As técnicas histoquímicas revelaram homogeneidade da matriz extracelular cardíaca em todos os grupos, caracterizada pela presença de uma delicada trama de fibras colágenas ao longo do ventrículo (figuras 6).



Figuras 6: Fotomicrografia de corte histológico de ventrículo esquerdo de coração de rata do grupo 4% exibindo discretos depósitos colagênicos (setas) entre feixes de cardiomiócitos, Tricrômico de Masson, 10x.

Apenas em foco subendocárdico isolado foi visualizado uma maior concentração de matriz, com destaque para a presença de fibras elásticas (figura 7). Não foi identificada distorção arquitetural associada ao acúmulo de matriz extracelular nos cortes examinados, afastando-se a hipótese de fibrose cardíaca.

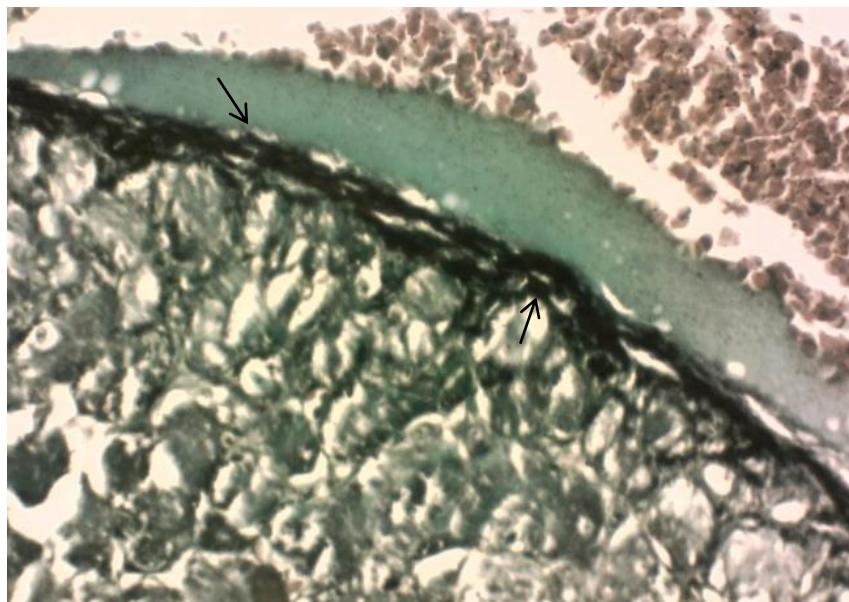


Figura 7. Fotomicrografia de corte histológico de ventrículo esquerdo de coração de ratas do grupo controle prenhe, exibindo deposição subendocárdica de fibras elásticas (setas), Verhoeff, 20x.

Em complemento, investigou-se a presença de população miofibroblástica no coração, com o emprego de imunomarcação para a actina de músculo liso, classicamente expressa por essas células. O anticorpo utilizado para a avaliação imuno-histoquímica mostrou-se adequado para a identificação da alfa-actina, evidenciando musculatura lisa em paredes vasculares, porém não foi verificada imunopositividade em componentes estromais intersticiais, caracterizando a ausência de fenoconversão miofibroblástica nos grupos examinados.

4. Discussão

Optou-se pelo emprego de dois grupos controle, considerando o redimensionamento do sistema circulatório durante a prenhez e sua possível influência sobre a estrutura cardíaca, cursando em geral com uma leve hipertrofia excêntrica, evento descrito como fisiológico no período gestacional¹⁶. Nos ratos SHR, assim como em mulheres com HAS, o aumento da pressão

arterial se dá de forma progressiva e se associa a outros fatores de risco, como a hipertrofia ventricular esquerda, resistência à insulina, hipertrigliceridemia e intolerância à glicose¹⁷. MATSUOKA et al¹³ referem a detecção de hipertrofia cardíaca em ratos SHR a partir de 7 semanas de idade. Neste experimento foram utilizadas ratas jovens, que naturalmente hipertensas, apresentaram o quadro hipertrófico cardíaco inicial, caracterizado por aumento de volume de cardiomiócitos, evidenciado pela análise morfométrica, porém sem eventos complementares usuais nessas condições, como a fibrose e a baixa densidade capilar³. Já a hipertrofia cardíaca na gestação fisiológica é um evento controverso. Quando caracterizado é compreendido como transitório, apresentando magnitudes distintas ao longo do período gestacional. LIBERATORI FILHO et al¹⁸ identificaram, em estudo com ratas, resposta hipertrófica no 14º dia de prenhez, com retorno aos níveis usuais ao final do período gestacional. Já HUNTER & ROBSON¹⁹ relacionam a maior magnitude da resposta hipertrófica ao final da gestação. Neste estudo, mediante a suplementação aguda com arginina, a aferição das dimensões cardíacas foi realizada ao fim da prenhez, possibilitando a identificação de diferença estatisticamente significante entre as massas cardíacas, absoluta e relativa, evidenciando-se ganho em animais do grupo 4%. Considerando-se a espessura da parede ventricular esquerda dentre os grupos, nos animais do grupo 4% houve redução, configurando um aparente paradoxo. Possivelmente o ganho de peso cardíaco nessa condição deve-se, não à atividade biosintética local, mas à vasodilatação associada à maior disponibilidade de NO no microambiente tecidual, consequente à suplementação, favorecendo um aumento no volume sanguíneo nas câmaras cardíacas¹¹.

Em razão das características estruturais do tecido muscular, e, em particular, dos cardiomiócitos, com a formação de sincícios, não foi possível a caracterização direta das dimensões celulares. Embora tenham sido testadas técnicas de coloração sugeridas em literatura²⁰ como úteis na visualização dos limites celulares em cardiomiócitos, os resultados não foram favoráveis. O uso da cariometria apresentou-se como uma alternativa, e contribuiu para a investigação acerca da resposta hipertrófica cardíaca, admitindo-se a existência de uma relação direta entre dimensões nucleares e celulares, em que o tamanho nuclear reflete a intensidade da atividade metabólica celular²¹.

Nesse sentido, evidenciou-se redução, estatisticamente significante, da área nuclear média em cardiomiócitos, nos animais suplementados, sugerindo a efetividade no uso da arginina na antagonização da resposta hipertrófica^{13,22,12,23}, mesmo que por um curto período. Essa reversibilidade, no entanto, nem sempre é obtida^{24,22}.

Para a compreensão da resposta adaptativa cardíaca ao aumento da pressão, não basta investigar o cardiomiócito, mas também elementos estromais centrais, como os fibroblastos. Em termos populacionais, ambos correspondem a aproximadamente 95% da celularidade cardíaca. Em ratos, estima-se que o coração seja composto por 30% de miócitos e 70% de não-miócitos, tendo como tipo celular predominante os fibroblastos²⁵. Enquanto, no contexto hipertrófico os cardiomiócitos exibem uma adição de sarcômeros, a resposta dos fibroblastos é menos compreendida²⁶. Potencialmente, atuam com a deposição de fibras colágenas e elásticas no interstício, acarretando dificuldade de relaxamento e aumento da pressão diastólica final²⁷. Sabe-se que se conectam, por meio de junções tipo gap, entre si e com cardiomiócitos, sugerindo-se a partir dessa íntima relação, uma importante participação dessas células nas respostas cardíacas à injúria, estando ainda diretamente relacionados à síntese e deposição de MEC²⁸. A produção de MEC altera as condições mecânicas teciduais, influenciando o destino de seus constituintes celulares. Frente à injúria em tecidos adultos, a alteração nesse “nicho mecânico”, contribui para uma relativa plasticidade celular, influenciando na conversão de células mesenquimais em miofibroblastos²⁹. Por meio de técnicas histoquímicas aplicadas ao tecido cardíaco, avaliou-se essa possibilidade, não sendo identificada diferença significativa na distribuição da MEC entre os grupos experimentais. Investigou-se, com o auxílio de imunomarcação, a fenoconversão dos fibroblastos em miofibroblastos, não tendo sido caracterizado, em nenhum dos grupos tal fenômeno. Algumas hipóteses podem ser postuladas para abordar esse achado, visto que a imunomarcação mostrou-se efetiva, dada a positividade em controles internos teciduais, como em paredes vasculares. A intensidade do estresse celular, representado pelo recondicionamento circulatório frente à prenhez, envolvendo sua restrita duração, talvez tenha sido insuficiente para determinar a completa transdiferenciação celular³⁰. Também a natureza gradual da sobrecarga

circulatória durante a prenhez, acompanhando o desenvolvimento da progênie, poderia favorecer uma adaptação do sistema. Um fator adicional a ser ponderado é a possibilidade do desenvolvimento de uma etapa intermediária nesse processo adaptativo, representada pela presença de proto-miofibroblastos, caracterizados pela formação de fibras de estresse, porém ainda sem a produção de alfa-actina de músculo liso, inviabilizando sua detecção pelo método empregado neste estudo. Nessa situação, o uso da microscopia eletrônica de transmissão poderia contribuir para uma melhor caracterização da condição³¹. Em consonância com a ausência de fenoconversão fibroblástica, não foi evidenciada, nos diferentes grupos experimentais, expressiva modulação da matriz extracelular, fortalecendo a compreensão da hipertrofia cardíaca do processo gestacional, também nas ratas SHR, como um evento fisiológico.

5. Conclusão

A partir das avaliações histomorfométricas, histoquímicas e imuno-histoquímicas em corações de ratas SHR prenhes suplementadas com L-arginina pode-se caracterizar a preservação da integridade microarquitetural cardíaca ao longo do processo, com ausência de atividade miofibroblástica e preservação da matriz extracelular local em paralelo à antagonização do quadro hipertrófico associado à suplementação com L-arginina a 4%.

6. Referências

1. CHOBANIAN AV, BAKRIS GL, BLACK HR et al. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. **Hypertension** 42: 1206-1252, 2003.
2. OKAMOTO K, AOKI K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jpn Circ J** 27: 282-293, 1963.
3. COHUET G, STRUIJKER-BOUDIER H. Mechanisms of target organ damage caused by hypertension: Therapeutic potential. **Pharmac Therap** 111: 81-98, 2006.
4. MACLEAN J, PASUMARTNI KBS. Signaling mechanisms regulating fibroblast activation, phenoconversion and fibrosis in the heart. **Indian J Biochem Biophys** 51: 476-482, 2014.
5. SIMMONS LA, GILLIN AG, JEREMY RW. Structural and functional changes in left ventricle during normotensive and preeclamptic pregnancy. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 283: H1627-1633, 2002.2002.
6. EGHBALI MB, DEVA R, ALIOUA A et al. Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. **Circ Res** 96: 1208-1216, 2005.
7. ALJABRI MB, SONGSTAD NT, LUND T et al. Pregnancy protects against antiangiogenic and fibrogenic effects of angiotensin II in rat hearts. **Acta Physiol (Oxf)** 201: 445-456, 2011.
8. SAVU O, JURCUT R, GIUSCĂ S. et al. Morphological and functional adaptation of the maternal heart during pregnancy. **Circ Cardiovasc Imaging** 5: 289-297, 2012
9. BERK BC, FUJIWARA K, LEHOUX S. ECM remodeling in hypertensive heart disease. **J. Clin Invest** 117, 568-75.
10. RYSA J, LESKINEN H, ILVES M et al. Distinct upregulation of extracellular matrix genes in transition from hypertrophy to hyperplasia heart failure. **Hypertension** 45: 927-933, 2005.

11. RASTALDO R, PAGLIARO P, CAPPELLO S et al. Nitric oxide and cardiac function. **Life Sciences** 81: 779-793, 2007.
12. CHANG HR, WU CY, HSU YH et al. Reduction of ventricular hypertrophy and fibrosis in spontaneously hypertensive rats by L-arginine. **Chin J Physiol** 48: 15-22, 2005.
13. MATSUOKA H, NAKATA M, KOHNO K et al. Chronic L-arginine administration attenuates cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension** 27: 14-18, 1996.
14. STIER CT, SIM GJ, LEVINE S. Dietary arginine fails to protect against cerebrovascular damage in stroke-prone hypertensive rats. **Brain Res** 549: 354-356, 1991.
15. KRISTEK F. Long-term administration of L-arginine did not influence blood pressure, heart rate, cardiac hypertrophy or arterial wall thickness of spontaneously hypertensive rats. **Exp Physiol** 83: 595-603, 1998.
16. CHUNG E; LEINWAND LA. Pregnancy as a cardiac stress model, **Cardiovasc Res** 101: 561-570, 2014.
17. PRAVENEC M, ZIDEK V, LANDA V et al. Genetic analysis of "metabolic syndrome" in the spontaneously hypertensive rat. **Physiol Res** 53: S15-S22, 2004.
18. LIBERATORI FILHO AW, LOPES RD, MORA OA et al. Estudo histomorfométrico dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo das ratas albinas durante a prenhez, **Rev Ass Med Brasil** 45: 242-246, 1999.
19. HUNTER S, ROBSON SC. Adaptation of the maternal heart in pregnancy. **Br Heart J** 68, 540-543, 1992.
20. SONGSTAD NT, JOHANSEN D, HOW OJ et al. Effect of transverse aortic constrict on cardiac structure, function and gene expression. In pregnant rats. **PLOSone** 9: e89559.

21. GERDES AM, LIU Z, ZIMMER HG, Changes in nuclear size of cardiac myocytes during the development and progression of hypertrophy in rats. **Cardioscience** 5: 203-208, 1994.
22. CHENG JW, BALDWIN SN, BALWIN SN. L-arginine in the management of cardiovascular diseases. **Ann Pharmacother** 35: 755-764, 2001.
23. RAJAPAKSE NW, JOHNSTON T, KIRIAZIS H et al. Augmented endothelial L-arginine transport ameliorates pressure-overload-induced cardiac hypertrophy, **Exp Physiol** 100: 796-804, 2015.
24. BROOKS WW, CONRAD CH, ROBINSON KG et al. L-arginine fails to prevent ventricular remodeling and heart failure in the spontaneously hypertensive heart. **Am J Hypertens** 22: 228-234, 2009.
25. BANERJEE I, FUSELER JW, PRICE RL el al. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. **Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol** 293: H1883-H1891, 2007.
26. CAMELLITI P, BORG TK, KOHL P. Structural and functional characterization of cardiac fibroblasts. **Cardiovasc Res** 65: 40-51, 2005.
27. PORTER KE, TURNER NA. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. **Pharmacol Ther** 123: 255-278, 2009.
28. ZHANG Y, KANTER EM, YAMADA KA. Remodeling of cardiac fibroblasts following myocardial infarction results in increased gap junction intercellular communication. **Cardiovasc Pathol**, 19: e233–e240, 2010
29. HINZ B, The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell. **J. Biomech** 43, 146-55, 2010.
30. TOMASEK et al. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodeling. **Nat Rev Mol Cell Biol** 3, 349-63,2002
31. SCHURCH W, SEEMAYER TA, HINZ B et al. Myofibroblast, In: MILLS SE. Histology for Pathologists, 3rd ed. Lippincott, Philadelphia, 2007, 1272p.



Vice-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 180/13 CEP/ICS/UNIP, sobre o projeto de pesquisa intitulado "Análise da atividade física e a inferência da L-arginina no coração de ratas SHR gestantes e no desenvolvimento fetal, Espécie utilizada: "Rato Isogênico" Número de animais utilizados: Trinta e Seis" sob a responsabilidade de "CASSIO MARCOS VILICEV e MARCELLE DE FREITAS SPINELLI", está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme a Lei Estadual nº 11.977/05 que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

Universidade Paulista, em São Paulo-SP, aos 18 dias do mês de setembro de 2013.

Hailey Barros F. Gonçalves

Hailey Barros F. Gonçalves
Secretária do Comitê de Ética
em Pesquisa da UNIP

Campus: INDIANÓPOLIS
Rua: Doutor Bacelar, 1212 – Vila Clementino – São Paulo – SP – CEP: 04026-000
Fone: (11) 5586-4091 – Fax: (11) 5586-4073
E-mail: cep@unip.br – <http://www.unip.br>