

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

CARLOS ALBERTO SILVA JÚNIOR

**A INIBIÇÃO DA ARGINASE COM L-NORVALINA RESTAURA OS NÍVEIS DE
NÍTRITO NA HIPERTROFIA CARDÍACA MURINA INDUZIDA POR
ISOPROTERENOL**

**MACEIÓ
2013**

CARLOS ALBERTO SILVA JUNIOR

**A INIBIÇÃO DA ARGINASE COM L-NORVALINA RESTAURA OS NÍVEIS DE
NITRITO NA HIPERTROFIA CARDÍACA MURINA INDUZIDA POR
ISOPROTERENOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) da Universidade Federal de Alagoas, como requisito a obtenção do grau de mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Luíza Antas Rabêlo

**MACEIÓ
2013**

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos

S586i Silva Júnior, Carlos Alberto.
A inibição da arginase com L-norvalina restaura os níveis de nitrito na hipertrofia cardíaca murina induzida por isoproterenol / Carlos Alberto Silva Júnior. – 2013.
117 f. : il.

Orientadora: Luíza Antas Rabêlo.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2013.

Bibliografia: f. 83-114.
Anexos: f. 115-117.

1. Hipertrofia cardíaca. 2. Isoproterenol. 3. Arginase. 4. Superóxido dismutase. 5. Enzima catalase. 6. Nitrito. I. Título.

CDU: 615.22



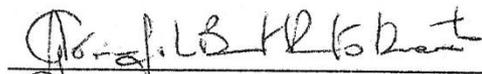
Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL – Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, S/N
Cidade Universitária – Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppgcs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

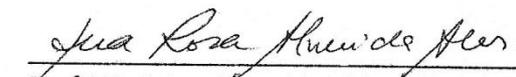
Defesa da Dissertação de Mestrado do mestrando Carlos Alberto Silva Junior, intitulada: “A inibição da arginase com L-Norvalina não reverte a hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol”, orientado pela Prof.^a Dr.^a Luíza Antas Rabêlo, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 04 de março de 2013.

Os membros da Banca Examinadora consideraram o candidato APROVADO.

Banca Examinadora:



Prof.^a Dr.^a Glória Isolina Duarte – (CCBS/UFPE)



Prof.^a Dr.^a Ana Rosa Almeida Alves - (ICBS/UFAL)



Prof.^a Dr.^a Éurica Adélia Nogueira – (Esenfar/UFAL)

AGRADECIMENTOS

A **DEUS** - o Senhor de minha vida e dos dias vindouros por ter me agraciado com a oportunidade de chegar até o presente momento da minha vida pessoal e profissional com tantas realizações e felicidades.

Agradeço aos meus Pais (**Carlos Alberto Silva e Tânia Wanderley de Lima Silva**) que sempre me apoiaram em minhas decisões e que estiveram sempre torcendo por mim em todos os momentos, além de fazer o possível para me dar a condição de estudar e, acima de tudo, muito amor e carinho, principalmente quando as manifestações destes sentimentos tão preciosos assumiram um caráter de repreensão, pois, foi aí que ambos me ensinaram a ser quem sou hoje.

Agradeço a minha esposa maravilhosa (**Linda Bárbara**). À ela devo minha vida, pois é com ela que divido todos os momentos, todas as angústias e felicitações, todos os sonhos... Este é o meu maior tesouro: a minha esposa.

Devo um agradecimento todo especial a **Profa. Luiza Antas Rabelo** por ter aberto as portas do LRC e possibilitado a concretização de um sonho que é chegar nesse momento da minha carreira acadêmica. Além disso, sou extremamente grato a Profa. Luíza pela oportunidade de continuar aspirando uma boa formação acadêmica e por ter a chance de conviver com uma pessoa como ela que respira ciência, e mais ciência, e mais ciência... Este convívio vem me lapidando como pessoa e como aspirante a pesquisador de uma maneira muito gratificante. Então, a ela devo muito por todo investimento feito na minha formação.

Não poderia deixar de agradecer àqueles que fazem parte da família LRC. Nesta grande família posso destacar pessoas que foram e que ainda são do meu convívio e que trazem muita alegria, motivação e ensinamentos. Pessoas como a **Valéria** (Sra. NUNES), esta que além de ser uma irmã que ganhei no LRC, também tem participação primorosa como colaboradora na execução deste trabalho. Não consigo pensar no LRC sem imaginar a figura da minha querida Sra. NUNES, uma pessoa de um coração enorme, sempre disposta a ajudar, a ouvir e a fazer ciência. Agradeço a ela por tudo que fez a favor de mim. Outra pessoa que tem uma grande importância para este momento e que tenho que agradecer é ao **Lucas**. Este me ensina, mesmo sem saber, como devo ser como pessoa e profissional. Nunca ouvi ninguém falar mal do Lucas. Isso me chamou a atenção e percebi que eu precisava seguir o exemplo de humildade e humanidade que compõe o caráter desse grande amigo que conquistei no LRC. Devo um agradecimento especial a **Glaucevane Guedes** (Glauce), pois esta é um exemplo de responsabilidade, organização, frieza e até de controle financeiro (rsrsrsrs...). A Glauce foi uma das pessoas que mais me ajudou, junto com o Lucas e Valéria, na organização de muitos dos meus experimentos. Então devo só agradecimentos a Glauce. Agradeço ao “trio da medicina” **Flávio, Leitão e Alexandre** pela grande contribuição com o traslado de maravalha tão necessária para a manutenção dos animais no laboratório. Além disso, pelos bons momentos de descontração em cada reunião semanal compartilhada semanalmente durante tanto tempo. Agradeço ao casal **Anita e Glauber** por tantos bons momentos também compartilhados em conjunto no LRC e também por tudo que fizeram para ajudar, mesmo que indiretamente, no andamento de muitos experimentos que fazem parte deste trabalho. Devo um agradecimento todo especial às “meninas da medicina” **Luíza Fernandes e Halina** por ter me ajudado durante muito tempo com parte da minha manutenção financeira no LRC. Agradeço ainda aos mais novos membros do LRC, como o **Nelson**, o **Eduardo** e a **Silmara** que são pessoas tão empenhadas em ajudar e fazer parte da família LRC, dividindo bons momentos de discussão científica.

Nessa caminhada acadêmica cruzei com pessoas muito importantes. Uma destas pessoas é a **Professora Ana Rosa**. Esta foi a primeira pessoa a ter me dado uma oportunidade

de adentrar nessa aventura acadêmica. Ela foi a primeira responsável – através de uma aula prática de fisiologia – pela minha investida na ciência até hoje. Lembro muito da pessoa que ela sempre foi: muito simples no seu modo de se relacionar com os outros. Isso me ensina até hoje. A ela devo muito pelas horas investidas no meu “engatinhar” científico. Como tenho boas lembranças da época em que sentávamos naquele laboratório e discutíamos sobre ideias, projetos, ciência... Foi realmente uma época de muito aprendizado e devo muito a **Profa. Ana Rosa** por isso.

Outra pessoa de grande relevância para minha vida pessoal e acadêmica é o **Reidson Beiriz**. Se teve uma pessoa que acreditou em mim e que tem uma grande parcela de contribuição para minha formação científica, essa pessoa é o Reidson. Este acreditou na minha capacidade de uma forma que nem eu mesmo acreditava. Poucos sabem o quanto foi duro acompanhar o ritmo de estudo e discussões que tínhamos, sempre comprometidos em aprender mais sob as motivações do Reidson. Então, à ele devo muito pelas inúmeras vezes que se dispôs a me ajudar com a fisiologia, a bioquímica, a química e a física.

Devo um agradecimento especial aos animais experimentais que foram extremamente importante para a realização deste trabalho.

Ainda agradeço a todos os **professores do programa de pós-graduação** que, de alguma forma, contribuíram para a construção do meu pequeno conhecimento e pela minha formação.

Agradeço aos funcionários/prestadores de serviços do ICBS que foram daqueles que em muitos momentos nos ajudaram a resolver tantos problemas, como falta de água, problemas com aparelhos de ar condicionado, material de limpeza e consumo, como papel, dentre outros.

Estende-se ainda um agradecimento a Universidade Federal de Alagoas, em especial a Faculdade de Educação Física Bacharelado, pela oportunidade de ter cursado a graduação. Também devo agradecimentos aos órgãos de fomento FAPAL e CAPES que tornaram possível a condução e conclusão do curso de mestrado em Ciências da Saúde em caráter de dedicação exclusiva através de concessão de auxílio financeiro, tão necessário para o bom andamento do trabalho executado.

Enfim, agradeço a DEUS por todos estes aqui mencionados, pois, de alguma forma, tiveram um parcela de contribuição para a formação do meu caráter, seja como pessoa ou como acadêmico. Obrigado a todos por terem feito parte da minha história de vida.

RESUMO

Introdução: A hipertrofia cardíaca está entre as principais causas de doenças cardiovasculares, contribuindo para o aumento de mortes no mundo. Aliado a isso, esta condição também pode ser resultado de algum tipo de injúria cardiovascular, promovendo alterações morfofuncionais no coração. Nesse sentido, tem-se mostrado o papel cardioprotetor do óxido nítrico (NO) através da ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). No entanto, o substrato para NOS, L-arginina, também é necessário para a ação da arginase, a enzima central do ciclo da ureia. Assim, sugere-se que a arginase pode modular negativamente as adaptações promovidas pela hipertrofia cardíaca. Dessa forma, objetivou-se avaliar o papel da arginase e o equilíbrio redox em um modelo murino de hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol. **Métodos:** Camundongos C57Bl/6 machos (12-16 semanas) foram distribuídos nos grupos: Controle (CT), Isoproterenol (ISO) Isoproterenol+Inibidor da Arginase (ISO+I). Os grupos ISO e ISO+I receberam administração (s.c.) de isoproterenol (15 mg.Kg⁻¹) durante 7 dias. Concomitantemente, foi ofertado o inibidor da arginase, L-norvalina, na água (1,5%; ~3 mg.Kg⁻¹) para o grupo ISO+I. A razão peso cardíaco/peso corporal (PCard/PCorp) e a razão peso do ventrículo esquerdo/peso corporal (PVE/PCorp) foram utilizados como índices de massa cardíaca. A peroxidação lipídica foi mensurada pelo método de TBARS. Avaliou-se, tanto no plasma quanto no ventrículo esquerdo, a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e arginase, além dos níveis de nitrito. **Resultados:** os grupos ISO e ISO+I (6,1±0,12 mg.g⁻¹ e 5,9±0,11 mg.g⁻¹, respectivamente) apresentaram um aumento na razão PCard/PCorp quando comparado ao grupo CT (4,8±0,05 mg.g⁻¹). Semelhantemente, a razão PVE/PCorp também foi elevada, correspondendo a um aumento de 23 a 26% nos grupos ISO e ISO+I. A atividade da LDH foi significativamente elevada nos grupos ISO e ISO+I (355±20,4 U.L⁻¹ e 358±14,3 U.L⁻¹; respectivamente) quando comparado ao grupo CT (267±17,7 U.L⁻¹). A peroxidação lipídica plasmática foi menor nos grupos ISO e ISO+I (0,006±0,001 [MDA] nM/[Proteína] mg.mL⁻¹ e 0,005±0,001 [MDA] nM/[Proteína] mg.mL⁻¹, respectivamente) comparado ao grupo CT (0,009±0,001 [MDA] nM/[Proteína] mg.mL⁻¹). No entanto, não houve diferença no ventrículo esquerdo. A atividade da SOD no ventrículo esquerdo foi 3,3 vezes mais elevada nos grupos ISO e ISO+I em relação ao tempo inicial, enquanto que no grupo CT esta variação foi de 2,8 vezes. Observou-se que a SOD citosólica foi mais ativa do que a SOD mitocondrial. A atividade da CAT foi reduzida nos grupo ISO e ISO+I (29,4±2,8 [Formaldeído] mM/[Proteína] mg.mL⁻¹ e 36,2±5,3 [Formaldeído] mM/[Proteína] mg.mL⁻¹, respectivamente) em comparação ao grupo CT (57,3±5,2 [Formaldeído] mM/[Proteína] mg.mL⁻¹). A atividade da arginase no plasma foi reduzida nos grupos ISO e ISO+I (2,4±0,2 [Ureia] mM/[Proteína] mg.mL⁻¹ e 1,9±0,2 [Ureia] mM/[Proteína] mg.mL⁻¹, respectivamente) quando comparado ao grupo CT (3,4±0,3 [Ureia] mM/[Proteína] mg.mL⁻¹). Os níveis de nitrito plasmático foi menor no grupo ISO (1,7±0,3 μM.mL⁻¹) quando comparado aos grupos ISO+I e CT (4,0±0,9 μM.mL⁻¹ e 4,2±0,7 μM.mL⁻¹, respectivamente). No ventrículo esquerdo não houve alteração da atividade da arginase, no entanto, os níveis de nitrito foram reduzidos no grupo ISO (53,3±4,0 μM.mL⁻¹) em comparação ao grupo CT (76,6±7,9 μM.mL⁻¹). **Conclusão:** A inibição da arginase com L-norvalina não preveniu a hipertrofia induzida pelo isoproterenol. No entanto, houve restauração dos níveis miocárdicos e plasmáticos de nitrito e uma redução acentuada da atividade miocárdica da enzima catalase.

Palavras-chave: Hipertrofia cardíaca. Isoproterenol. Arginase. Superóxido dismutase. Catalase. Nitrito.

ABSTRACT

Introduction: Cardiac hypertrophy figures among the main causes of cardiovascular diseases, contributing to the increasing number of deaths worldwide. Allied to this, such condition may also result from some type of cardiovascular injury, promoting morphofunctional changes in the heart. In this sense, the cardioprotective role of nitric oxide (NO) by nitric oxide synthase (NOS) activity has been shown. Nevertheless, NOS substrate, L-arginine, is also required for arginase activity, a key enzyme in the urea cycle. Thus, it has been suggested that arginase may negatively modulate changes from cardiac hypertrophy. Based upon this scenario, the present work aimed to evaluate the role of arginase and the redox balance in a murine model of isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. **Methods:** C57Bl/6 male mice (12-16 weeks old) were divided into the following groups: Control (CT), Isoproterenol (ISO) Isoproterenol+Arginase Inhibitor (ISO+I). ISO and ISO+I groups received administration (s.c.) of isoproterenol ($15\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) during 7 days. At the same time, the arginase inhibitor L-norvaline was given in drinking water (1.5%; $\sim 3\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) for the ISO+I group. Heart weight/body weight (HW/BW) ratio and left ventricle weight/body weight (LVW/BW) ratio were used as cardiac mass indices. Lipid peroxidation was measured by the TBARS method. Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and arginase activities were assessed both in plasma and in left ventricle, as well as nitrite levels. **Results:** ISO and ISO+I groups ($6.1\pm 0.12\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ and $5.9\pm 0.11\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, respectively) presented a similar increase in HW/BW ratio when compared to CT group ($4.8\pm 0.05\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$). Similarly, LVW/BW ratio was also elevated, corresponding to an increase of 23 and 26% in ISO and ISO+I groups. LDH activity was significantly increased in ISO and ISO+I groups ($355\pm 20.4\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$ and $358\pm 14.3\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$; respectively) compared to the CT group ($267\pm 17.7\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$). Plasma lipid peroxidation was shown to be lower in ISO and ISO+I groups (0.006 ± 0.001 [MDA] nM/[Protein] $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 0.005 ± 0.001 [MDA] nM/[Protein] $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively) compared to the CT group (0.009 ± 0.001 [MDA] nM/[Protein] $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). However, no difference for the left ventricle was observed. SOD activity in left ventricle was 3.3-fold higher in ISO and ISO+I groups compared to baseline, while in CT group this variation was 2.8-fold. It was also observed that cytosolic SOD was more active than mitochondrial SOD. CAT activity was found reduced in ISO and ISO+I groups (29.4 ± 2.8 [Formaldehyde] mM/[Protein] $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 36.2 ± 5.3 [Formaldehyde] mM/[Protein] $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively) when compared to CT group (57.3 ± 5.2 [Formaldehyde] mM/[Protein] $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Plasma arginase activity was shown to be reduced in ISO and ISO+I groups (2.4 ± 0.2 [Urea] mM/[Protein] $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 1.9 ± 0.2 [Urea] mM/[Protein] $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively) when compared to CT group (3.4 ± 0.3 [Urea] mM/[Protein] $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Plasma nitrite levels were lower in ISO group ($1.7\pm 0.3\text{ }\mu\text{M}\cdot\text{mL}^{-1}$) compared to ISO+I and CT groups ($4.0\pm 0.9\text{ }\mu\text{M}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $4.2\pm 0.7\text{ }\mu\text{M}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively). No significant changes were observed in left ventricle arginase activity. Nevertheless, nitrite levels were reduced in ISO group ($53.3\pm 4.0\text{ }\mu\text{M}\cdot\text{mL}^{-1}$) compared to CT group ($76.6\pm 7.9\text{ }\mu\text{M}\cdot\text{mL}^{-1}$). **Conclusion:** Arginase inhibition using L-norvaline was not capable of reverting isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. Furthermore, plasma lipid peroxidation was reduced, with no changes in left ventricle. SOD activity was not altered while CAT activity was shown to be reduced in left ventricle. Plasma arginase activity was also diminished, without difference in left ventricle. A reduction in plasma and left ventricle nitrite levels was observed, with this result reverted by arginase inhibition.

Keywords: Cardiac hypertrophy. Isoproterenol. Arginase. L-norvaline. Superoxide dismutase. Catalase. Nitrite.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Representação da resposta cardíaca aos estímulos hipertróficos	23
Figura 2 Padrão geométrico das adaptações cardíacas	25
Figura 3 Subtipos de receptores adrenérgicos	28
Figura 4 Representação esquemática do sistema renina-angiotensina	31
Figura 5 Cascata de sinalização dos receptores β -adrenérgicos acoplados a proteínas G	34
Figura 6 Representação do mecanismo de dessensibilização e internalização dos receptores β_2 -adrenérgicos	36
Figura 7 Isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e seu mecanismo de ação	40
Figura 8 Representação do relaxamento vascular mediado pela sinalização do Óxido Nítrico	42
Figura 9 Síntese de ureia	44
Figura 10 Esquematização do protocolo experimental	51
Figura 11 Fotomicrografias de secção frontal do ventrículo esquerdo	60
Figura 12 Dosagem da concentração de proteínas totais pelo método de Bradford	61
Figura 13 Atividade da enzima lactato desidrogenase plasmática	62
Figura 14 Análise da peroxidação lipídica pelo método de TBARS	63
Figura 15 Avaliação da atividade enzimática da superóxido dismutase em função do tempo	65
Figura 16 Atividade enzimas superóxido dismutase e catalase no ventrículo esquerdo	66
Figura 17 Atividade enzimática da superóxido dismutase citosólica	68
Figura 18 Atividade enzimática da superóxido dismutase Mitocondrial	68
Figura 19 Atividade da arginase e níveis de nitrito no plasma	71
Figura 20 Atividade da arginase e níveis de nitrito no ventrículo esquerdo	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Peso Cardíaco e Índice de Massa Cardíaca	60
Tabela 2	Peroxidação lipídica pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico	64
Tabela 3	Atividade enzimática da superóxido dismutase e catalase no ventrículo esquerdo	66
Tabela 4	Atividade da superóxido dismutase citosólica e mitocondrial	69
Tabela 5	Atividade da arginase e concentração de nitrito	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NO	Óxido Nítrico
AC	Adenilato Ciclaste
ADP	Difosfato de Adenosina
AI	Arginase I
AII	Arginase II
Akt/PKB	Proteína Kinase B
AMP	Monofosfato de Adenosina
AMPK	Proteína Kinase dependente de AMP
ANG (1-7)	Angiotensina 1-7
ANG (1-9)	Angiotensina 1-9
ANG I	Angiotensina I
ANG II	Angiotensina II
ANG III	Angiotensina III
ANG IV	Angiotensina IV
APA	Aminopeptidase A
APM	Aminopeptidase M
Arg-308	Arginina 308
AT1R	Receptor para Angiotensina 1
AT2R	Receptor para Angiotensina 2
AT4R	Receptor para Angiotensina 4
ATP	Trifosfato de Adenosina
BH4	Tetrahidrobiopterina
BHT	<i>butylated hydroxytoluene</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> (Albumina Sérica Bovina)
CaM	Calmodulina
cAMP	Monofosfato de Adenosina cíclico
CAT	Catalase
cGMP	Monofosfato de Guanosina Cíclica
CH	Cardiomiopatia Hipertrofica
CK	Creatina Kinase
CK-MB	Creatina Kinase Miocárdica B

COL1A1	Colágeno tipo 1A1
COXc	Citocromo Oxidase <i>c</i>
cTnT	Troponina T Cardíaca
CuZnSOD	Superóxido Dismutase Cobre-Zinco
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ECA 2	Enzima Conversora de Angiotensina II
EDRF	<i>Endothelium-Derived Relaxing Factor (Fator Relaxante Derivado do Endotélio)</i>
eNOS^{-/-}	<i>Knockout para eNOS</i>
eNOS/NOS3	Óxido Nítrico Sintase endotelial/3
EROs	Espécies Reativas ao Oxigênio
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
FC	Frequência Cardíaca
FMN	Flavina Mononucleotídeo
Gi	Proteína g inibitória (<i>Inhibitory</i>)
GPx	Glutationa Peroxidase
GRK	Kinases dos Receptores Acoplados a Proteína G
Gs	Proteína G estimulatória (<i>Stimulatory</i>)
GTP	Trifosfato de Guanosina
H₂O	Água
H₂O₂	Peroxido de Hidrogênio
H₂SO₄	Ácido Sulfúrico
H₃PO₄	Ácido Fosfórico
HRV	<i>Heart Rate Variability (Variabilidade da Frequência Cardíaca)</i>
HVE	Hipertrofia Ventricular Esquerda
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
iNOS/NOS2	Óxido Nítrico Sintase induzível/2
K_{ATP}	Canais para Potássio Sensíveis a ATP
K_{Ca}	Canais para Potássio Sensíveis a Ca ²⁺
LDH	Lactato Desidrogenase
MAPK	Proteína Kinase Ativada por Mitogêno
MDA	Malonildialdeído

MnCl₂	Cloreto de Manganês
MnSOD	Superóxido Dismutase Manganês
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
mtNOS	Óxido Nítrico Sintase mitocondrial
NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NaNO₂	Nitrito de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NF-κB	Fator Nuclear Kappa B
nNOS^{-/-}	<i>Knockout</i> para nNOS
nNOS/NOS1	Óxido Nítrico Sintase neuronal/1
NO²⁻	Nitrito
NOHA	N ^o -hidroxi-L-arginina
NOS	Óxido Nítrico Sintase
O₂	Oxigênio
O²⁻	Ânion Superóxido
ODC	Ornitina Descarboxilase
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO⁻	Peroxinitrito
OxLDL	Lipoproteínas de Baixa Densidade Oxidada
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato Salino)</i>
PCard/PCorp	Razão Peso Cardíaco/Peso Corporal
PCr	Fosfocreatina
PI3K	Fosfatidilinositol 3-Kinase
PKA	Proteína Kinase A
PVE/PCorp	Razão Peso Ventrículo Esquerdo/Peso Corporal
REN	Renina
RIPA	<i>Radioimuno Precipitation Assay</i>
rpm	Rotações por Minuto
sGC	Guanilato Ciclase Solúvel
SHR	Rato Espontaneamente Hipertenso
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNS	Sistema Nervoso Simpático

SOD	Superóxido Dismutase
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	<i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico)</i>
Tn	Troponina
TnT-4	Troponina T 4
VD	Ventrículo Direito
VE	Ventrículo Esquerdo
XO	Xantina Oxidase
Zn	Zinco
ZnSO₄	Sulfato de Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Problematização	17
1.2	Justificativa	19
2	OBJETIVOS	20
3	REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1	As doenças cardiovasculares no mundo: o vilão do passado, presente e futuro	21
3.2	A hipertrofia cardíaca como um fator de predisposição para doenças cardiovasculares	22
3.2.1	Hipertrofia cardíaca	22
3.2.2	Fatores indutores da hipertrofia cardíaca	24
3.2.3	Modelos simpatomiméticos de indução da hipertrofia cardíaca	33
3.2.4	O diagnóstico bioquímico da hipertrofia cardíaca	37
3.3	O óxido nítrico e as adaptações cardíacas	38
3.3.1	O óxido nítrico como modulador das funções cardiovasculares	38
3.3.2	O óxido nítrico na hipertrofia cardíaca	42
3.4	A arginase como um modulador endógeno da produção de óxido nítrico	44
3.4.1-	Aspectos gerais da arginase	44
3.4.2-	A arginase nas complicações cardiovasculares	46
3.4.3	O papel da arginase na hipertrofia cardíaca	47
4	MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1	Animais e delineamento experimental	50
4.2	Sacrifício dos animais	52
4.3	Avaliação morfológica do tecido cardíaco	52
4.3.1	Índice de massa cardíaca	52
4.3.2	Processamento histológico do coração	53
4.4	Dosagens bioquímicas	54
4.4.1	Preparação dos homogenatos ventriculares	54
4.4.2	Dosagem de proteínas totais	54
4.4.3	Atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH)	55
4.4.4	Peroxidação lipídica	55

4.4.5	Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)	56
4.4.6	Atividade da enzima catalase (CAT)	56
4.4.7	Atividade da enzima arginase	57
4.4.8	Dosagem de nitrito	58
4.4.9	Análise estatística	58
5	RESULTADOS	59
5.1	Índices de massa cardíaca e histologia cardíaca	59
5.2	Dosagens bioquímicas	61
5.2.1	Níveis de proteínas totais no plasma e ventrículo esquerdo	61
5.2.2	Atividade da enzima lactato desidrogenase	62
5.2.3	Peroxidação lipídica	63
5.2.4	Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT)	64
5.2.5	Atividade da arginase e os níveis de nitrito	69
6	DISCUSSÃO	72
7	CONCLUSÃO	81
8	PERSPECTIVAS	82
	REFERÊNCIAS	83
	ANEXOS	115

1 INTRODUÇÃO

1.1 Problematização

Segundo projeções da Organização Mundial da Saúde (OMS), até o ano de 2030, as doenças cardiovasculares serão as principais causas de mortes no mundo, atingindo índices de, aproximadamente, 35% da população mundial, com 4,3% dos acometidos alocados nas Américas (WHO, 2009). Contribuindo negativamente com este panorama mundial, a mortalidade causada por injúrias cardiovasculares, possivelmente, será resultado de um aumento estimado em torno de 47% para o mesmo período, um número correspondente a 25 milhões de mortes (WHO, 2004, 2012).

Embora os agravos supracitados sejam responsáveis por quase que a metade das mortes na Europa (ALLENDER et al., 2008), observa-se uma redução na taxa de mortalidade de aproximadamente 30% nos últimos 30 anos (BRITISH HEART FOUNDATION, 2012). Em contrapartida, no Brasil, a taxa de mortalidade ascendeu em torno de 25% desde 2008 até os dias atuais (DATASUS, 2012). Este fato evidencia uma relação existente entre o *status* de desenvolvimento do país/região e os indicadores de saúde relacionados aos agravos cardiovasculares, uma vez que países pobres ou em desenvolvimento apresentam índices de mortes associados a fatores de riscos cardiovasculares, aproximadamente, 8 vezes mais elevados do que países ricos (WHO, 2009, 2012).

Em um cenário prospectivo, dentre os principais agravos cardiovasculares, a hipertensão e as isquemias cardíacas e cerebrovasculares apontam como as maiores causadoras de mortes no mundo ocidental (WHO, 2004). Associadas aos acometimentos já citados, a presença de outras complicações, principalmente cardiometabólicas ou a estas associadas, como diabetes *mellitus*, dislipidemia, obesidade, tabagismo, ativação neuro-humoral, predisposição genética, entre outras, tornam-se fatores agravantes para o surgimento de complicações cardiovasculares (FILHO; MARTINEZ, 2002).

A maioria das doenças cardiovasculares é responsável por promover alterações na função e morfologia do coração (SELVETELLA et al., 2004; ROMANO; MACIEL, 2008). Tais modificações caracterizam o remodelamento cardíaco que, por sua vez, resulta em modificações na expressão gênica, moleculares, celulares ou intersticiais (MAASS et al.,

2004; ROHINI et al., 2010). Como consequência de tais eventos, observa-se adaptações no tamanho, forma e função cardíaca ou vascular frente a algum tipo de injúria, sendo a hipertrofia cardíaca uma das principais respostas aos agravos cardiovasculares (SELVETELLA; LEMBO, 2005; MCMULLEN; JENNINGS, 2007).

Neste cenário, a hipertrofia cardíaca corresponde a uma resposta adaptativa do coração a uma sobrecarga sustentada de trabalho, que tem como objetivo manter a função cardíaca em condições favoráveis para manutenção do suprimento sanguíneo, de modo a atender a demanda energética do organismo e proporcionar a remoção dos metabólitos sistêmicos (CARREÑO et al., 2006; MATOS-SOUZA; FRANCHINI; JUNIOR, 2008). Este tipo de adaptação pode ocorrer em condições fisiológicas e/ou patológicas. Neste último caso, tornando-se um indicador muito importante de risco de morbimortalidade cardiovascular, uma vez que a hipertrofia ventricular esquerda (HVE) constitui um fator que precede o surgimento de insuficiência cardíaca congestiva, morte súbita (RIBEIRO et al., 2003), doença isquêmica cardíaca e arritmia ventricular (NOGUEIRA, 1999).

O aumento nas investigações sobre os mecanismos inerentes às adaptações do sistema cardiovascular, mediante condições patológicas, revelam os esforços da comunidade científica no intuito de se elucidar os mecanismos ainda não entendidos que, por sua vez, podem fornecer ferramentas capazes de diagnosticar e/ou tratar pessoas acometidas por algum tipo de doença do sistema circulatório (GOLDSTEIN et al., 1998; BARRY et al., 2008; BERNARDO et al., 2010). Em consonância com o exposto até o momento, será abordado no presente trabalho o papel dos mecanismos responsáveis pelo controle da produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs), em especial, a participação da enzima arginase, nas vias de produção de óxido nítrico (NO), nas adaptações promovidas pela hipertrofia cardíaca (BREDT, 2003; RUIZ-HURTADO; DELGADO, 2010).

1.2 JUSTIFICATIVA

No Brasil, as doenças cardiovasculares despontam como as principais causas de internações de pessoas na faixa etária acima de 50 anos, correspondendo a 27,5% das internações, ocorrendo óbito em, aproximadamente, 39% dos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Estes dados refletem a grande importância que há de se prover subsídios baseados em conhecimentos científicos acerca dos eventos celulares e moleculares desencadeados pelas doenças cardiovasculares, de modo a prover possíveis ferramentas terapêuticas para o tratamento de tais agravos.

Nesse cenário, o desequilíbrio redox destaca-se nos últimos anos como um dos fatores contribuintes para instalação de várias alterações cardiovasculares, como a disfunção endotelial, que pode estar presente em várias condições fisiopatológicas como, por exemplo, na hipertensão arterial (JI; MINAKAWA; FUKUI, 2008) e aterosclerose (LUIKING; ENGELEN; DEUTZ, 2010). Neste contexto, pontua-se a participação das isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS) como um regulador do remodelamento miocárdico, uma vez que já se sabe que sua expressão gênica é diferenciada em um modelo de hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga pressórica (JI; MINAKAWA; FUKUI, 2008). No entanto, pouco se sabe acerca da participação da arginase, que, por sua vez, compete com as isoformas da NOS pelo substrato L-arginina, imprescindível na produção de *NO , em modelo de hipertrofia cardíaca em camundongos.

Somando-se, a avaliação dos produtos das enzimas NOS e arginase como possíveis marcadores bioquímicos pode ser relevante para o prognóstico e/ou diagnóstico de doenças onde o desequilíbrio redox está presente, uma vez que a maioria das injúrias cardiovasculares é silenciosa e não há uma terapêutica pleiotrópica para esses processos. Logo, a busca por novos sinalizadores, como também a validação de métodos avaliativos sensíveis e monetariamente acessíveis, justificam a incessante busca científica por estes. Além dos objetivos citados, o estudo tem a possibilidade de contribuir para o esclarecimento de mecanismos fisiopatológicos envolvidos na hipertrofia cardíaca, uma vez que ainda existe uma grande necessidade de se entender as peculiaridades deste tipo de remodelamento cardíaco. Neste contexto, acredita-se que a caracterização de marcadores oxidativos pode contribuir para o entendimento da patogênese das principais doenças cardiovasculares, além de possibilitar a possível identificação de potenciais alvos terapêuticos.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o papel do eixo NO /arginase e do equilíbrio redox em um modelo murino de hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol.

2.2 Específicos

- ☞ Calcular o índice de hipertrofia cardíaca;
- ☞ Avaliar histologicamente as alterações cardíacas;
- ☞ Medir a atividade plasmática da enzima lactato desidrogenase (LDH) como marcador inespecífico de dano cardíaco;
- ☞ Avaliar a peroxidação lipídica no plasma e ventrículo esquerdo;
- ☞ Analisar o papel do equilíbrio redox no ventrículo esquerdo através da mensuração da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT);
- ☞ Mensurar a atividade da arginase e os níveis de nitrito no plasma e no ventrículo esquerdo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Um breve panorama acerca das doenças cardiovasculares no mundo

As doenças cardiovasculares podem ser definidas como qualquer injúria que comprometa, aguda ou cronicamente, a função do coração e/ou dos vasos sanguíneos (WHO, 2005). Tanto em países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento, tais agravos são as principais causas de mortes e morbidades, sendo as isquemias cardíacas e os acidentes cerebrovasculares, as principais manifestações de tais transtornos (LEE et al., 2011; STEVENS; SCHMIDT; DUNCAN, 2012).

Na Europa, durante o ano de 2008, aproximadamente a metade da mortalidade ocorrida neste continente foi causada por algum tipo de doença cardiovascular, atingindo o impressionante número de 4,3 milhões de mortes (ALLENDER et al., 2008; GO et al., 2013). No mesmo período, de 25 a 33% das mortes ocorridas nos Estados Unidos da América foram atribuídas aos acometimentos cardiovasculares (NATIONAL HEART, 2011; HERON, 2012).

Na América do Sul, o Brasil é o país que apresenta a maior taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares entre pacientes com 30 e 70 anos de idade, atingindo aproximadamente 29% dos homens e 34% das mulheres, tendo a hipertensão como o principal fator de risco cardiovascular (STEVENS; SCHMIDT; DUNCAN, 2012; WHO, 2012). Ainda no nosso país, entre os anos 2000 e 2010, a mortalidade causada por injúrias do aparelho circulatório cresceram mais de 10% em todo o país, sendo a região nordeste a que apresentou o maior crescimento nas taxas, cerca de 64% destas, com os acometimentos isquêmicos cardíacos e cerebrovasculares os que mais aumentaram no período (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Neste mesmo período, Alagoas teve um aumento de 50% na taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares, conferindo ao estado a 4ª posição no nordeste com a menor taxa, ficando atrás apenas de Pernambuco, Bahia e Ceará (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Nos dias atuais, observa-se que as complicações cardiovasculares ganham um destaque negativo no panorama mundial, afetando padrões socioeconômicos e, assim, tornando-se um dos maiores problemas de saúde pública em todo mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). Estimativas atuais, acompanhada do crescimento na hospitalização e das causas de mortes por doenças do aparelho cardiocirculatório, apontam para a

necessidade de se desenvolver políticas públicas que combatam os fatores de riscos relacionados aos acometimentos cardiovasculares (HENKEL et al., 2008; SUBRAMANIAN et al., 2011; TENG et al., 2010).

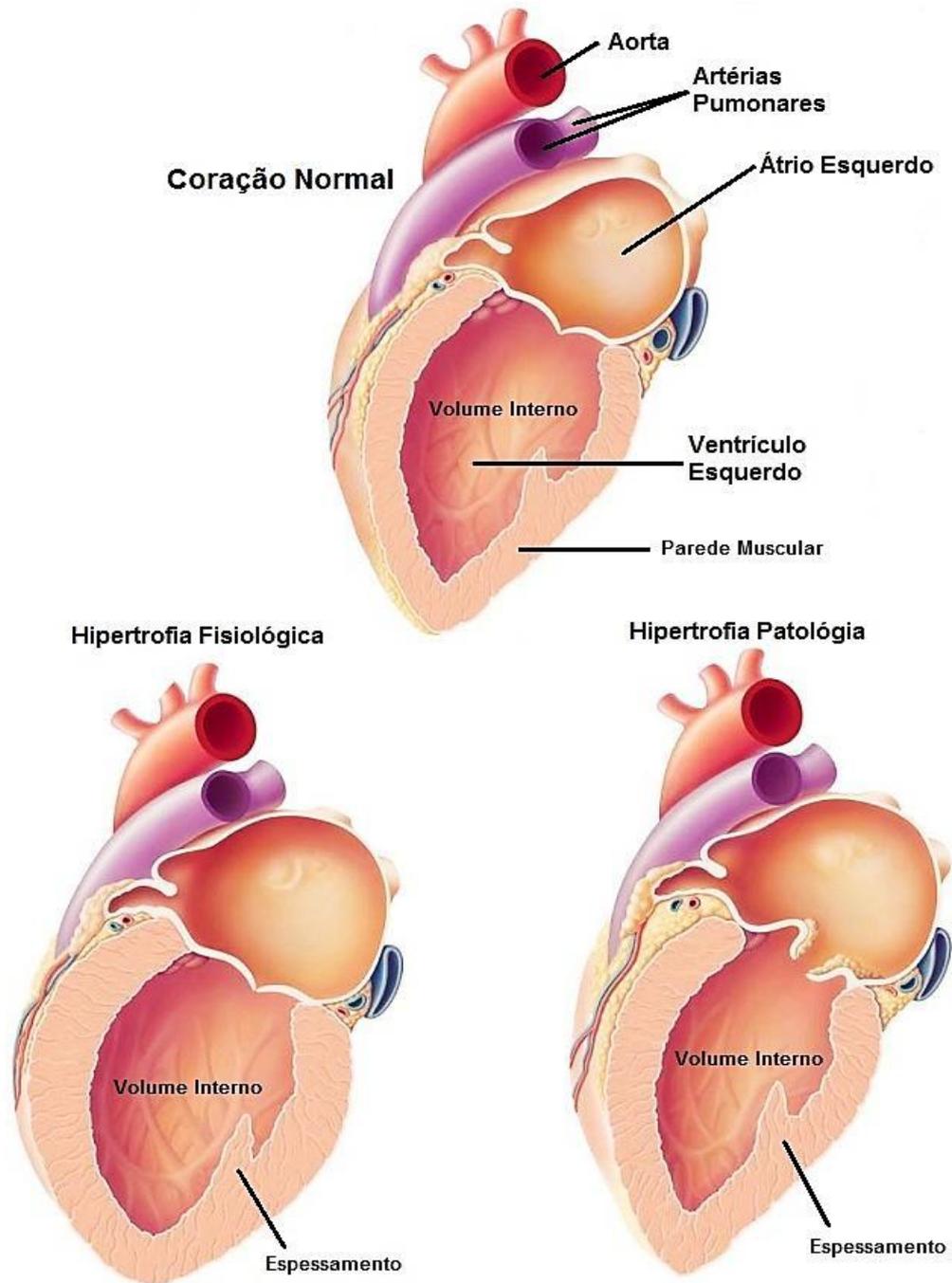
3.2 A hipertrofia cardíaca como um fator de predisposição para doenças cardiovasculares

3.2.1 Hipertrofia cardíaca

A definição mais aceita e difundida para a hipertrofia cardíaca consiste em considerá-la, inicialmente, como uma resposta adaptativa ou compensatória do coração a várias condições fisiológicas e/ou patológicas (SELVETELLA; LEMBO, 2005; ROHINI et al., 2010). Tal resposta é caracterizada, de um modo geral, por uma modificação na morfologia cardíaca, incidindo, principalmente, sob o espessamento da camada muscular do ventrículo esquerdo e, eventualmente, no seu volume interno, atendendo a uma demanda persistente das necessidades sistêmicas e/ou local (Figura 1) (YAMAZAKI; KOMURO; YAZAKI, 1995; MARTIN; HARDER; EPPENBERGER, 1997; SELVETELLA et al., 2004; MATOS-SOUZA; FRANCHINI; JUNIOR, 2008). No entanto, em virtude de uma sustentada sobrecarga de trabalho, os processos responsáveis pelas alterações morfológicas podem levar a um conjunto de respostas mal adaptadas do tecido cardíaco, podendo levar a uma condição patológica (Figura 1) (NORTON et al., 2002; JAMEEL; ZHANG, 2009).

Além das alterações morfológicas citadas, destacam-se, ainda, as adaptações metabólicas promovidas pelos processos responsáveis pela hipertrofia cardíaca. A principal consequência metabólica da adaptação cardíaca a sobrecarga sustentada de trabalho é a elevação da utilização da glicose como substrato energético em detrimento da utilização de ácidos graxos livres (TAEGTMEYER; OVERTURF, 1988; RECCHIA et al., 1998; NASCIMBEN et al., 2004; SOROKINA et al., 2007). Além disso, observa-se nas alterações hipertróficas uma elevação nos níveis de AMP (monofosfato de adenosina) intracelulares que, por sua vez, ativa uma proteína kinase dependente de AMP (AMPK), um tipo de “sensor” que detecta as baixas concentrações de substratos para produção de energia e acelera ativação da via glicolítica (TIAN et al., 2001; ALLARD et al., 2007; INGWALL, 2009).

Figura 1 - Representação da resposta cardíaca aos estímulos hipertróficos.



Fonte: Modificado de <http://www.medicinanet.com.br/imagens/20120217100937.jpg>, 2013.

Nota - Há dois tipos de hipertrofia cardíaca: 1) a fisiológica, caracterizada por um aumento da massa cardíaca sem diminuição do volume interno do ventrículo esquerdo (VE) e sem comprometimento funcional do coração; e 2) a patológica que é caracterizada por uma elevação da massa cardíaca, principalmente no VE, diminuindo o volume interno da câmara cardíaca e comprometendo a função cardíaca.

3.2.2 Fatores indutores da hipertrofia cardíaca

O processo de remodelamento hipertrófico do tecido cardíaco pode ser influenciado por vários fatores, tais como: a) mecânicos (*sobrecarga hemodinâmica pressórica ou volumétrica*), b) bioquímicos ou neuro-humorais (*angiotensina II, catecolaminas, endotelina 1, IL-1 e IL-6, óxido nítrico, entre outros*) e c) genéticos (*cardiomiopatia hipertrófica*), sendo que, destes, os dois primeiros são os principais fatores responsáveis por este tipo de remodelamento (LI, 2002; RIBEIRO et al., 2003; GARCIA; INCERPI, 2008; HONSHO et al., 2009; NAKAYAMA et al., 2010).

a) Fatores Mecânicos

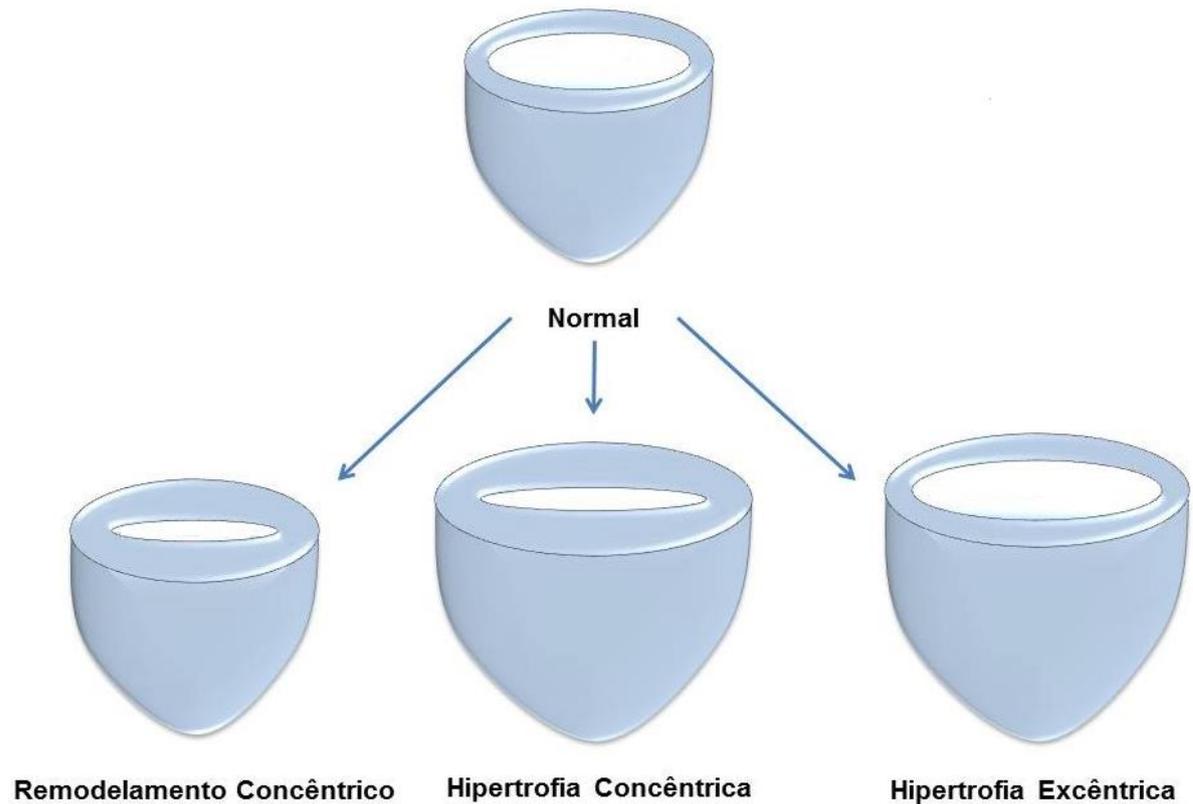
Os fatores ou estímulos de natureza mecânica, que compreendem as sobrecargas hemodinâmicas de pressão e/ou de volume, refletem, no miocárdio, aumento nas tensões sistólicas e diastólicas, promovendo, dessa forma, o incremento do estresse nas estruturas ventriculares (YAMAZAKI; KOMURO; YAZAKI, 1995; LEYCHENKO et al., 2011).

A sobrecarga pressórica quando imposta cronicamente, caracterizada pela elevação dos níveis de pressão arterial (*hipertensão*), é responsável pelo aumento do trabalho cardíaco que pode determinar um aumento da massa ventricular (SEN et al., 1974; CICOGNA et al., 2002). Somando-se a isso, têm-se comprovado a existência de uma relação direta entre pressão arterial elevada e a hipertrofia cardíaca. Nesta direção, a indução de estenose aórtica como promotor de sobrecarga pressórica pode resultar na ocorrência de adaptação hipertrófica com acentuado prejuízo na função contrátil (WEINBERG et al., 1999; RIBEIRO et al., 2003).

As adaptações morfológicas ou geométricas do ventrículo esquerdo, provenientes da sobrecarga pressórica, podem ser divididas em: a) remodelamento concêntrico (*aumento da espessura relativa da parede ventricular sem alteração da massa cardíaca*); b) hipertrofia concêntrica (*aumento da espessura relativa da parede ventricular acompanhada de redução volume ventricular interno com alteração da massa cardíaca*) e c) hipertrofia excêntrica (*aumento da massa ventricular sem incremento relativo da camada muscular do ventrículo, resultando no aumento do volume da câmara cardíaca*) (Figura 2) (JUNIOR; FRANCHINI, 2001; MATOS-SOUZA; FRANCHINI; JUNIOR, 2008). Embora sejam apresentadas formas variadas de hipertrofia ou remodelamento ventricular, existe uma relação muito forte entre a

adaptação hipertrófica concêntrica e maiores índices de morbidade e mortalidade cardiovascular (NOGUEIRA, 1999; ROMANO; MACIEL, 2008).

Figura 2 - Padrão geométrico das adaptações cardíacas.



Fonte: Autor, 2013.

Nota – Remodelamento Concêntrico (aumento da espessura relativa da parede ventricular sem alteração da massa cardíaca); Hipertrofia Concêntrica (aumento da espessura relativa da parede ventricular acompanhada de redução volume ventricular interno com alteração da massa cardíaca) e Hipertrofia Excêntrica (aumento da massa ventricular sem incremento relativo da camada muscular do ventrículo, resultando no aumento do volume da câmara cardíaca).

Um segundo tipo de fator ou estímulo de natureza mecânica, que pode interferir nos parâmetros hemodinâmicos, é a sobrecarga volumétrica. Nesta condição, o trabalho cardíaco pode ser influenciado por alterações do volume plasmático circulante, resultando, de modo geral, numa elevação do estresse nas paredes ventriculares em função do aumento da pressão e volume diastólico final (LIU; HILBELINK; GERDES, 1991; MATSUO; CARABELLO, 1998; HOLMES, 2004). Dessa forma, destaca-se a interferência de fatores extrínsecos, como a ingestão de sal, como um indutor do aumento na volemia que, por sua vez, promove uma elevação da sobrecarga hemodinâmica, contribuindo para uma resposta hipertrófica cardíaca (YU et al., 1998; AHN et al., 2004). Corroborando com isso, sabe-se que a exposição crônica a dietas suplementadas com cloreto de sódio (NaCl) é capaz de promover o incremento da massa ventricular esquerda de ratos normotensos ou hipertensos com participação relevante do sistema renina-angiotensina (SRA) nos mecanismos moduladores nas adaptações hipertróficas do coração (RUZICKA et al., 1993; RUZICKA; YUAN; LEENEN, 1994; LEENEN; YUAN, 1998; ZHAO et al., 2000).

b) Fatores Neuro-Humorais

Os fatores de natureza neuro-humorais, representantes não hemodinâmicos dos estímulos indutores das adaptações cardíacas, apresentam grande relevância no desenvolvimento dos processos inerentes a hipertrofia cardíaca. Dentre os mecanismos envolvidos, destaca-se a ativação do sistema nervoso simpático e do sistema renina-angiotensina como fatores determinantes nas alterações cardíacas (AGABITI-ROSEI; MUIESAN; SALVETTI, 2006).

O Sistema Nervoso Simpático (SNS), uma subdivisão do Sistema Nervoso Autônomo (SNA), quando dotado da sua integridade funcional, participa ativamente no controle do funcionamento cardíaco, além de outros tecidos e sistemas no organismo. Nesse sentido, projeções nervosas do SNS, provenientes de núcleos centrais, incidem em regiões bem definidas do tecido cardíaco para exercer um fino controle sobre os parâmetros funcionais do coração (SCISLO; ICHINOSE; LEARY, 2008; IEDA; FUKUDA, 2009). A ativação do SNS resulta na elevação da frequência dos batimentos cardíacos (FC) e na contratilidade muscular, entre outros efeitos sistêmicos (VINIK; MASER; ZIEGLER, 2011; VINIK, 2012). Em contrapartida, a subdivisão parassimpática do SNA atua no sentido contrário da ação

simpática, de modo que a sua ativação pode atenuar os efeitos da ação simpática sobre o coração (CHOATE et al., 2008).

Além dos efeitos sobre os parâmetros funcionais do coração, o SNA também exerce seu controle sobre outros órgãos e tecidos, tais como as arteríolas, regulando o fluxo sanguíneo periférico, controle sobre os parâmetros respiratórios, metabolismo de repouso, sudorese, controle das pupilas e movimentos peristálticos, além do fluxo salivar (THOMAS, 2011).

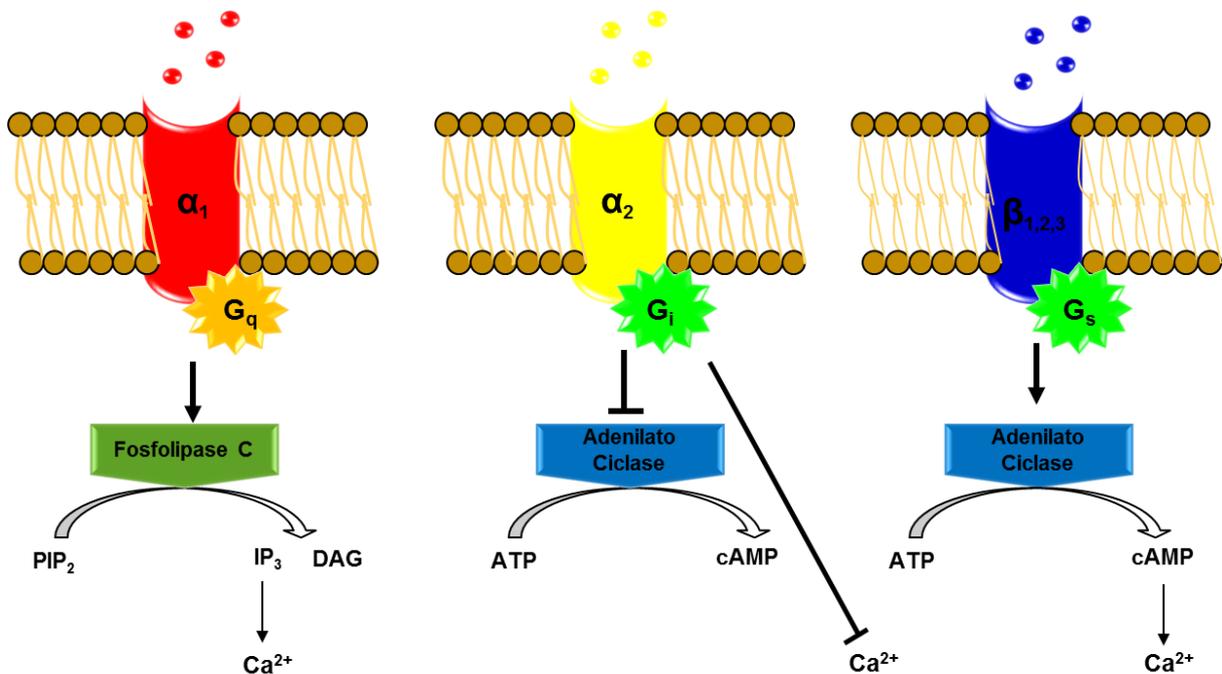
A disfunção autonômica, uma condição onde há desequilíbrio da atividade entre a divisão simpática e a parassimpática do SNA, pode ser considerada tanto um fator de predisposição quanto uma consequência de muitas condições patológicas (LEVICK et al., 2010). Na neuropatia autonômica cardíaca, condição presente em pacientes diabéticos, por exemplo, observa-se um aumento do tônus simpático em detrimento da atividade parassimpática, incidindo de maneira anormal na variabilidade da frequência cardíaca (HRV; *Heart Rate Variability*) (POP-BUSUI; EVANS, 2010; POP-BUSUI, 2010). Neste caso, no entanto, a alteração autonômica observada é uma consequência da condição patológica que é resultado de uma complexa interação entre outras desordens fisiológicas, como o diabetes mellitus e a obesidade (MASSIN; DERKENNE, 1999; KONRAD et al., 2012).

Como fator preditor, a disfunção autonômica tem sido observada em muitas doenças cardiovasculares. Sabe-se que a hiperatividade simpática tem sido observada em pacientes hipertensos e que é mais exacerbada naqueles com disfunção diastólica ventricular, evidenciando que a desregulação simpatovagal, além de influenciar negativamente para hipertensão também pode contribuir para os danos à mecânica cardíaca (CHARKOUDIAN et al., 2005; FISHER; FADEL, 2010; GRASSI; SERAVALLE; QUARTI-TREVANO, 2010). Além do exposto, a disfunção autonômica observada tanto em humanos quanto em modelos animais de hipertensão, está associada a hipertrofia cardíaca de modo que a normalização da atividade simpática, presente em tal condição, é capaz de reverter o aumento da massa cardíaca (BURNS et al., 2007; GRASSI et al., 2009; LEVICK et al., 2010).

As evidências destacadas apontam para importância dos mecanismos responsáveis pela sinalização simpática no tecido cardíaco. No coração, os terminais nervosos procedentes do SNS exercem suas ações sobre os receptores adrenérgicos, expressos na membrana plasmática dos cardiomiócitos sob dois subtipos: α -adrenérgicos (α_1 e α_2) e β -adrenérgicos

(β_1 , β_2 e β_3), sendo os subtipos β_1 e β_2 os mais abundantes e relevantes para a modulação da função cardíaca (Figura 3) (BRODDE; BRUCK; LEINEWEBER, 2006; SPADARI-BRATFISCH; DOS SANTOS, 2008). A estimulação dos receptores pelas catecolaminas (*noradrenalina e adrenalina*), liberadas pelas terminações nervosas do SNS e pelas glândulas adrenais, desencadeia a ativação de uma série de cascatas enzimáticas que geram vários mensageiros intracelulares capazes de alterar o trabalho cardíaco (TARONE; LEMBO, 2003; BRODDE; BRUCK; LEINEWEBER, 2006; WOODCOCK et al., 2008).

Figura 3 - Subtipos de receptores adrenérgicos.



Fonte: Autor, 2013.

Nota -Os receptores adrenérgicos fazem parte de uma família de receptores de membrana que estão acoplados às proteínas tipo G. Há dois tipos de receptores adrenérgicos: alfa (α_1 e α_2) e beta (β_1 , β_2 e β_3). Estes podem apresentar diferentes efeitos quando estimulados devido ao subtipo de proteína G que cada tipo de receptor pode estar acoplado. Quando os receptores α_1 são ativados pelas catecolaminas ou análogos, a proteína G_q ativa uma proteína de membrana chamada Fosfolipase C que hidrolisa o fosfolípido de membrana fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP_2) para formar trifosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O aumento de IP_3 ocasiona a elevação intracelular de cálcio (Ca^{2+}), resultando na contração o músculo liso. A ativação do receptor α_2 estimula uma proteína G inibitória (G_i) que inibe a enzima adenilato ciclase (AC) e diminui a concentração intracelular de Ca^{2+} e promove o relaxamento do músculo liso e a inibição de liberação de neurotransmissor. O acionamento dos receptores β -adrenérgicos ativam a proteína G estimulatória (G_s) que, por sua vez, estimula a AC que utiliza trifosfato de adenosina (ATP) para sintetizar monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), resultando no aumento de Ca^{2+} intracelular, ocasionando aumento da contração do músculo cardíaco, relaxamento do músculo liso e glicogenólise.

Muitos estudos tem utilizado a estimulação crônica dos receptores β -adrenérgicos como modelo de indução de hipertrofia cardíaca, fortalecendo as evidências dos efeitos hipertróficos da hiperativação simpática (ZIMMER; GERLACH, 1974; PATEL et al., 1991). Em conformidade com isso, o uso de fármacos simpatomiméticos – *ação semelhante às catecolaminas* – é capaz de promover hipertrofia cardíaca e fibrose miocárdica, contribuindo para ocorrência de disfunção diastólica em função do prejuízo causado a complacência miocárdica (NAGANO et al., 1992; ZHANG et al., 2007, 2008).

O outro fator pertencente à classe dos neuro-humorais que podem exercer forte influencia sobre as adaptações hipertróficas é o sistema renina-angiotensina (SRA). O SRA é composto por uma sequência de reações enzimáticas que, a partir da clivagem inicial do angiotensinogênio pela enzima renina (REN), produz o decapeptídeo angiotensina I (ANG-I) que, por sua vez, é clivado pela enzima conversora de angiotensina (ECA) para formar o produto final angiotensina II (ANG-II) (Figura 4) (CAREY; SIRAGY, 2003; LAVOIE; SIGMUND, 2003). A ANG-II exerce seus efeitos sob os receptores AT1 e AT2 em diferentes tecidos, destacando-se o rim e o sistema cardiovascular, participando ativamente na regulação de mecanismos hemodinâmicos, tais como a pressão arterial e a homeostasia dos fluídos corporais (PERSSON, 2003; PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006). No entanto, a ativação dos receptores desencadeiam respostas diferenciadas, de forma que, enquanto o acionamento do receptor AT1 provoca elevação pressórica, reabsorção de sódio e retenção hídrica, a ativação do receptor AT2 resulta num efeito contrário, ou seja, hipotensão, excreção de sódio e água (LAVOIE; SIGMUND, 2003; PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006; FYHRQUIST; SAIJONMAA, 2008).

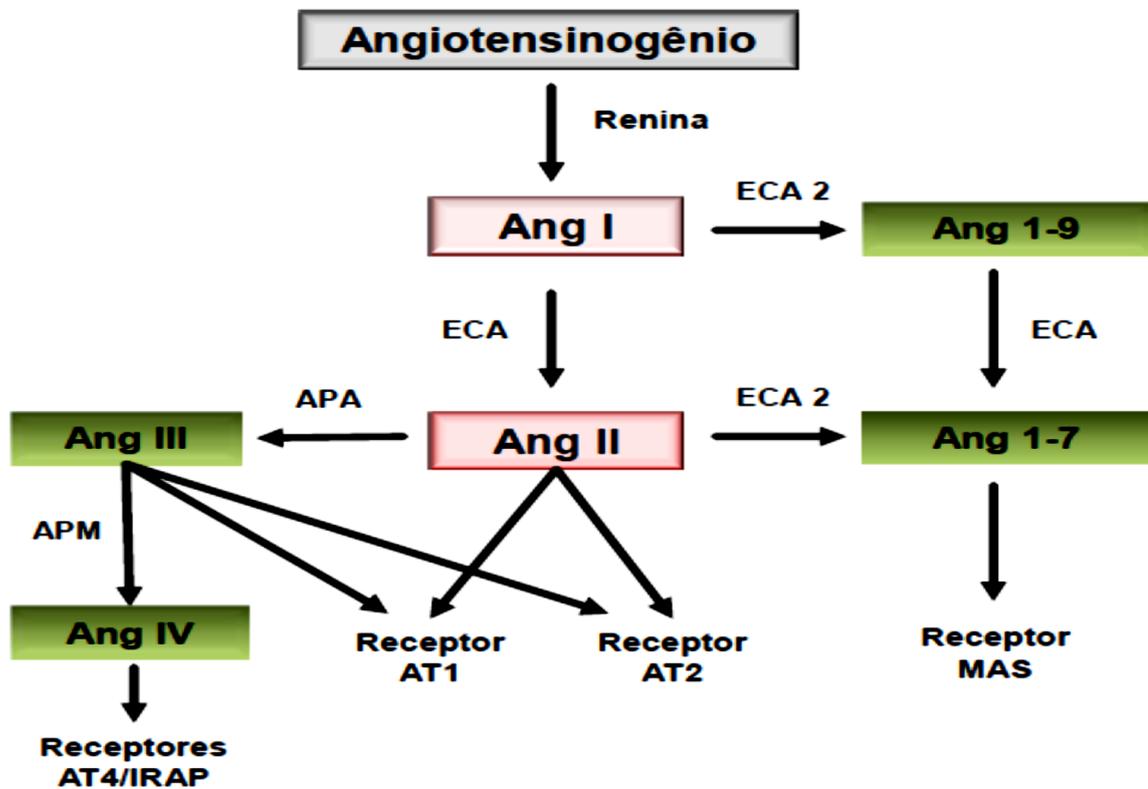
Além dos componentes clássicos citados, outros têm recebido grande atenção devido aos efeitos sistêmicos observados, tais como a ECA-2 (*enzima conversora de angiotensina 2*) que pode utilizar tanto o ANG-I quanto o ANG-II como substrato para sintetizar angiotensina-(1-9) e/ou angiotensina-(1-7) – ANG-(1-9) e ANG-(1-7) – exercendo efeitos diferentes dos observados normalmente pela ação da ANG-II sobre vários órgãos e sistemas, principalmente o cardiovascular (Figura 4) (CAREY; SIRAGY, 2003; KATOVICH et al., 2005; FYHRQUIST; SAIJONMAA, 2008).

Considerando a possibilidade de o SRA apresentar alterações na ação dos seus componentes, pode-se observar a ocorrência de patologias relacionadas, principalmente, ao

sistema cardiovascular, dentre elas a hipertensão arterial e a hipertrofia cardíaca (WANG et al., 1999; AKERS et al., 2000; ZHAO et al., 2000; AVILA; MORGAN; YAN, 2011). Nesse sentido, sabe-se que a hiperativação crônica do SRA é um dos fatores responsáveis pelos distúrbios pressóricos presentes na hipertensão, principalmente pela ação da ANG-II nos receptores AT1 periféricos ou centrais (MCBRYDE et al., 2007; BURKE et al., 2008; PENDERGRASS, 2008). Corroborando com o exposto, foi comprovado em modelos animais de hipertrofia cardíaca que a inibição da ECA resultou na redução da ANG-II circulante e tecidual bem como atenuação da adaptação hipertrófica e a incidência de mortes por insuficiência cardíaca (NAGANO et al., 1992; EDUARDO; BRÁULIO; RUI, 1997; BREGAGNOLLO; OKOSHI, 2005). Associado a isso, a administração de ANG-II cronicamente, comprovadamente, resulta em hipertrofia cardíaca (BYRNE et al., 2003; RUGALE et al., 2003; HU et al., 2004).

Diante do exposto acerca da importância do SRA sobre o controle dos mecanismos responsáveis pelo controle dos níveis pressóricos, observa-se que o desequilíbrio da ativação deste sistema pode ser um fator contribuinte para as adaptações hipertróficas em diferentes modelos de hipertrofia.

Figura 4- Representação Esquemática do sistema renina-angiotensina (SRA).



Fonte: Autor, 2013.

Nota - O angiotensinogênio, originado no fígado, é convertido ao decapeptídeo Angiotensina 1 (Ang I) pela enzima Renina. A Ang I é clivada pela Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) para formar o octapeptídeo Angiotensina 2 (Ang II) que exerce seus efeitos através do acionamento dos receptores para angiotensina 1 (AT1) e/ou receptores para angiotensina 2 (AT2). Alternativamente, a Ang I pode ser convertida ao Angiotensina 1-9 (Ang 1-9) pela ação da Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA 2). A Ang 1-9 sofre a ação da ECA, sendo convertida a Angiotensina 1-7 (Ang 1-7) que aciona o receptor MAS. Em outra via, a Ang II pode ser convertida a Angiotensina 3 (Ang III) pela ação da Aminopeptidase A (APA). Em seguida, a Ang III sofre a ação da Aminopeptidase M (APM) e a Angiotensina 4 (Ang IV) é sintetizada, a qual tem ação sobre os receptores para angiotensina 4 (AT4) ou numa classe de Aminopeptidase regulada pela insulina (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006; FYHRQUIST; SAJONMAA, 2008).

c) Fatores Genéticos

A hipertrofia cardíaca também pode ser resultado de predisposição genética. Nesse caso, a cardiomiopatia hipertrófica (CH) corresponde a uma classe de doenças cardíacas resultante de mutações genéticas, caracterizada, principalmente, por um espessamento assimétrico do septo ventricular que pode prejudicar o fluxo sanguíneo através da aorta, passando a ser chamada como cardiomiopatia hipertrófica obstrutiva (NISHIMURA; OMMEN; TAJIK, 2003).

As alterações observadas na CH não são atribuídas a fatores hemodinâmicas e/ou neuro-humorais, mas sim a alterações em genes envolvidos na síntese de proteínas relacionadas com os mecanismos contráteis, assim como a cadeia pesada da β -miosina cardíaca, por exemplo (CHUNG; TSOUTSMAN; SEMSARIAN, 2003). As principais manifestações clínicas da CH são dispneia, angina, tontura, síncope e morte súbita em indivíduos com menos de 35 anos de idade, incluindo atletas de elite (MOOLMAN-SMOOK et al., 2003; FIFER; VLAHAKES, 2008; ROWLAND, 2009).

Diante do exposto, as adaptações cardíacas, principalmente as relacionadas com o aumento da massa cardíaca, podem ter suas origens em múltiplos fatores (mecânicos, neuro-humorais ou genéticos), refletindo a interação de um conjunto complexo de situações que resultam nas alterações cardiovasculares presentes em muitas doenças do aparelho circulatório.

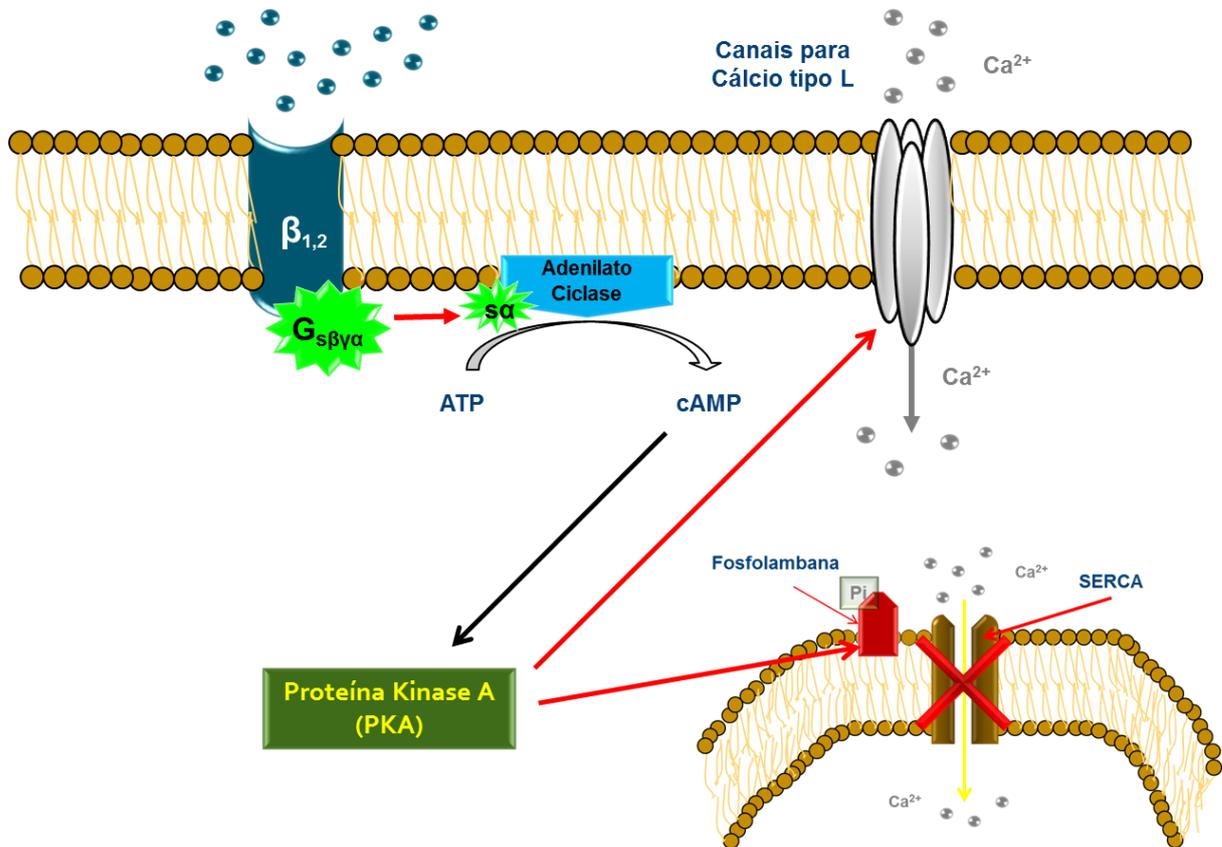
3.2.3 Modelos simpatomiméticos de indução da hipertrofia cardíaca

O desenvolvimento de modelos animais que simulem condições patológicas tem sido de extrema importância para o entendimento dos efeitos fisiológicos da respectiva condição. Aliado a necessidade de entendimento acerca da patofisiologia em questão, a presença em relação ao estudo de novos alvos terapêuticos voltados para o tratamento de doenças tem consolidado a relevância da utilização dos modelos animais como ferramentas indispensáveis para o avanço do conhecimento.

Com base na devida importância que as doenças cardiovasculares vêm adquirindo ao longo dos anos em virtude das conseqüentes más adaptações constatadas na sua grande maioria, os modelos animais são imprescindíveis para o seu entendimento. Nesse sentido, um dos modelos animais mais utilizados para se entender os mecanismos inerentes à hipertrofia cardíaca são os simpatomiméticos (FURNIVAL et al., 1971; GIOTTI; LEDDA; MANNAIONI, 1973; KUDEJ et al., 1997; BADENHORST et al., 2003; BAKER, 2010). Nestes modelos, o simpatomimetismo se refere à reprodução das características da hiperatividade do SNS, ou seja, um aumento sistêmico ou local das catecolaminas (*noradrenalina e adrenalina*) e/ou similares, como o isoproterenol. Diante do mimetismo simpático, tem-se como objetivo promover algum tipo de adaptação, aguda ou crônica. Os efeitos cardiovasculares mais evidentes da ativação simpática são: aumento da frequência cardíaca (*cronotropismo*), contratilidade intensa (*inotropismo*), vasoconstrição das artérias cardíacas e arteríolas periféricas, entre outros (PELAT et al., 2003; OSADCHII et al., 2007; COLLINS; RODRIGO, 2010; WEI et al., 2011).

A regulação da contratilidade e/ou da frequência cardíaca pelo SNS envolve um coordenado sistema de receptores ancorados nas membranas plasmáticas dos cardiomiócitos, destacando-se a família de receptores adrenérgicos, dentre os quais, os mais abundantes e importantes para a fisiologia cardíaca são os β_1 e β_2 -adrenérgicos (MYSLIVECEK; TROJAN, 2003; BRODDE; BRUCK; LEINEWEBER, 2006b). Ambos os receptores estão distribuídos diferentemente no miocárdio, de modo que o subtipo β_1 -adrenérgico é proporcionalmente mais abundante do que o subtipo β_2 -adrenérgico (Figura 3) (BRODDE; MICHEL, 1999; WALLUKAT, 2002).

Figura 5 - Cascata de sinalização dos receptores β -adrenérgicos acoplados a proteínas G.



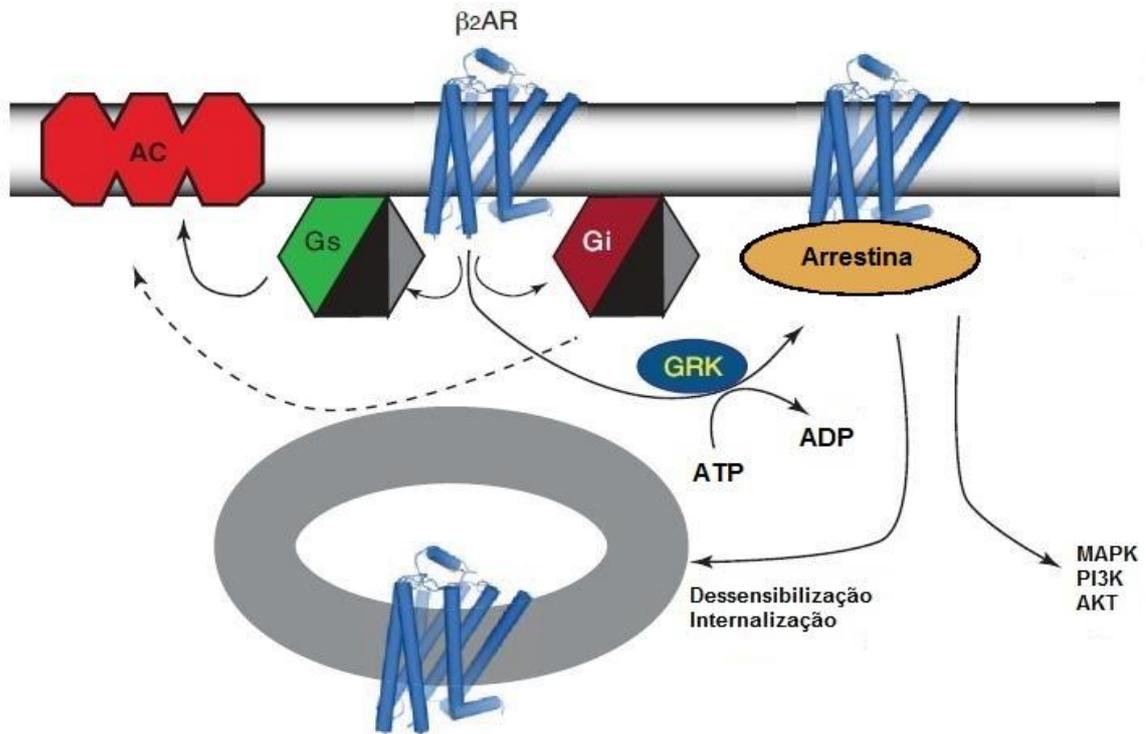
Fonte: Autor, 2013.

Nota - A estimulação dos receptores β_1 e β_2 -adrenérgicos resulta na ativação de proteínas G estimulatória (G_s) e/ou inibitória (G_i), neste último caso, apenas o subtipo β_2 pode estar acoplado. O acionamento dos receptores ligados a G_s promove a ativação da enzima de membrana adenilil ciclase que, por sua vez, ocasionam o aumento dos níveis intracelulares de cAMP (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico). Este induz a ativação da PKA (proteína kinase A), enzima que fosforila várias proteínas intracelulares, principalmente canais iônicos para cálcio tipo L e a proteína moduladora de liberação de cálcio no retículo sarcoplasmático, a fosfolambana.

Tanto o receptor β_1 quanto o β_2 estão acoplados a proteínas G_s (*stimulatory* - estimulatória) e uma vez ativados, acionam a adenilil ciclase e eleva os níveis intracelulares de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) (Figura 5) (WALLUKAT, 2002; STARK et al., 2004). Este último, um tipo de segundo mensageiro intracelular, promove a ativação da proteína kinase A (PKA), enzima que fosforila uma série de proteínas citoplasmáticas, principalmente canais iônicos para cálcio (Ca^{2+}) do tipo L e a fosfolambana, proteína moduladora da liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (Figura 5) (KAMP; HELL, 2000; KAPILOFF et al., 2009; EFENDIEV; DESSAUER, 2011). A fosforilação de canais para Ca^{2+} e da fosfolamban, entre outros, resulta no influxo de Ca^{2+} para o citoplasma e redução da recaptção deste pelo retículo sarcoplasmático, acionando os mecanismos contráteis (XIAO et al., 1999; XIAO, 2001; WALLUKAT, 2002; ZHENG; HAN; XIAO, 2004). Em síntese, a ativação simpática promove o acionamento de receptores β -adrenérgicos que, por sua vez, eleva as concentrações intracelulares de Ca^{2+} e assim, aumenta-se a contração cardíaca (CHARKOUDIAN et al., 2005; IEDA; FUKUDA, 2009; GRASSI; SERAVALLE; QUARTI-TREVANO, 2010; LEVICK et al., 2010).

Sendo assim, sabendo que a ativação dos receptores β -adrenérgicos é uma das principais causas das alterações das funções miocárdicas, muitos estudos têm utilizado substâncias análogas às catecolaminas com o objetivo de mimetizar os efeitos simpáticos sobre os parâmetros das funções miocárdicas, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (SHANKS et al., 1967; PATEL et al., 1991). Nesse sentido, alguns modelos fazem uso da estimulação aguda e/ou crônica dos receptores β -adrenérgicos para induzir alterações cardíacas, principalmente hipertrofia (GIOTTI; LEDDA; MANNAIONI, 1973; EVERED; ROBINSON, 1981; ZOU; KOMURO; YAMAZAKI, 1999). Dentre os modelos mais utilizados, destaca-se a administração de isoproterenol (*isoprenalina*), um análogo da adrenalina que influencia positivamente no inotropismo e cronotropismo, podendo instaurar adaptações cardíacas prejudiciais à função cardíaca, tais como hipertrofia cardíaca seguida de disfunção ventricular (FURNIVAL; LINDEN; SNOW, 1971; LAYLAND et al., 2004; OSADCHII et al., 2007; SOLTYSINSKA; OLESEN; OSADCHII, 2011).

Figura 6 - Representação do mecanismo de dessensibilização e internalização dos receptores β_2 -adrenérgicos.



Fonte: Modificado de KOBILKA, 2011.

Nota - Basicamente, a dessensibilização e internalização dos receptores β -adrenérgicos envolve o desacoplamento destes receptores das respectivas proteínas G acopladas às estruturas proteicas em resposta a ativação de proteínas cinases dependentes de segundos-mensageiros intracelulares, tais como a PKA (proteína cinase dependente de cAMP), PKC (proteína cinase dependente de diacilglicerol e Ca^{2+}) e GRK (Kinases dos receptores acoplados a proteína G). A PKA, ativada em resposta ao acionamento da adenilato ciclase (AC) pela proteína G estimulatória (Gs), pode fosforilar resíduos de serina e treonina nos receptores β -adrenérgicos, impossibilitando o acionamento das proteínas G acopladas. À PKC atribui-se a responsabilidade de fosforilar e desativar proteínas G inibitórias (Gi), ocasionando a elevação da cAMP e contribuindo para ativação da PKA e, conseqüentemente, a dessensibilização dos receptores. A GRK é responsável pela dessensibilização e internalização dos receptores β -adrenérgicos em duas etapas: 1) fosforilação de resíduos de aminoácidos (serina e treonina) nos receptores, promovendo o desacoplamento das proteínas G; e 2) endocitose (internalização) dos receptores mediada por proteínas chamadas arrestinas que promovem um acoplamento aos receptores, internalizando o complexo proteico formado.

Embora o modelo de hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol ocasione a elevação da concentração miocárdica de cAMP e do transiente de Ca^{2+} mediado pela ativação dos receptores acoplados a proteínas G_s (ZOU; KOMURO; YAMAZAKI, 1999; KAMP; HELL, 2000; GOAILLARD; VINCENT; FISCHMEISTER, 2001; BERS; DESPA, 2009), há evidências de que a tanto a atividade da adenilil ciclase quanto a concentração do seu mRNA está reduzida, provavelmente, como resultado da dessensibilização dos receptores adrenérgicos provocada pela cronicidade da administração do isoproterenol (Figura 6) (KUDEJ et al., 1997; FERGUSON, 2001).

3.2.4 O diagnóstico bioquímico da hipertrofia cardíaca

Uma das estratégias mais utilizadas para diagnosticar e auxiliar nas decisões de tratamento dos riscos cardiovasculares, como isquemia cardíaca e necrose miocárdica, por exemplo, é a determinação dos níveis plasmáticos de biomarcadores cardíacos específicos (SIM; LIEU; ANDRE, 2008). Os biomarcadores mais utilizados no diagnóstico e prognóstico de lesões pós-isquêmicas e dano cardíaco, por exemplo, são a creatina kinase miocárdica (CK-MB) e a troponina (Tn).

Um estudo conduzido por Ye e Colaboradores (2001) demonstrou que os níveis do mRNA para isoforma CK-B estavam elevados em um modelo animal de hipertrofia ventricular esquerda. Neste estudo, os pesquisadores também observaram que a concentração da proteína CK-B também aumentou nos animais com hipertrofia ventricular. No entanto, a atividade total da CK não foi alterada nos miocárdios hipertrofiados. Corroborando com estes achados, Smith e colaboradores (2006) observaram em pacientes com hipertrofia cardíaca que os níveis de fosfocreatina (PCr) miocárdica diminuíram 35% e que a razão PCr/ATP, utilizada como um índice do estado energético miocárdico, foi reduzida em 30%. Ainda foi constatado neste estudo que a CK não teve alteração funcional.

Embora a CK-B tenha sido muito importante para o diagnóstico e prognóstico de riscos cardiovasculares, a sua não-especificidade cardíaca pode mascarar situações clínicas. Nesse sentido, estudos relatados por Morandi e Colaboradores (2006), em um trabalho de revisão, demonstraram que o tratamento com drogas β -bloqueadoras foi capaz de elevar os níveis de CK tanto em pacientes com hipertensão essencial como em animais.

Em contrapartida, a troponina cardíaca apresenta especificidade e uma associação com os riscos cardiovasculares mais acentuada quando pacientes apresentam níveis de CK-B normais ou reduzidos (SIM; LIEU; ANDRE, 2008). Um estudo realizado por Maass e Colaboradores (2004), em camundongos transgênicos que superexpressavam o subtipo cardíaco de troponina T (cTnT), demonstrou uma hipertrofia elevada após administração crônica de isoproterenol. Somando-se ao exposto, em estudo recente, constatou-se que humanos com insuficiência cardíaca apresentaram uma expressão elevada do subtipo 4 da troponina T (TnT-4) (HUANG et al., 2008). Sendo assim, apesar de se utilizar a CK-B como um biomarcador de riscos cardiovasculares, a avaliação dos níveis de troponina miocárdica é capaz de proporcionar um diagnóstico e um prognóstico mais confiável.

3.3 O óxido nítrico e as adaptações cardíacas

3.3.1 O óxido nítrico como modulador das funções cardiovasculares

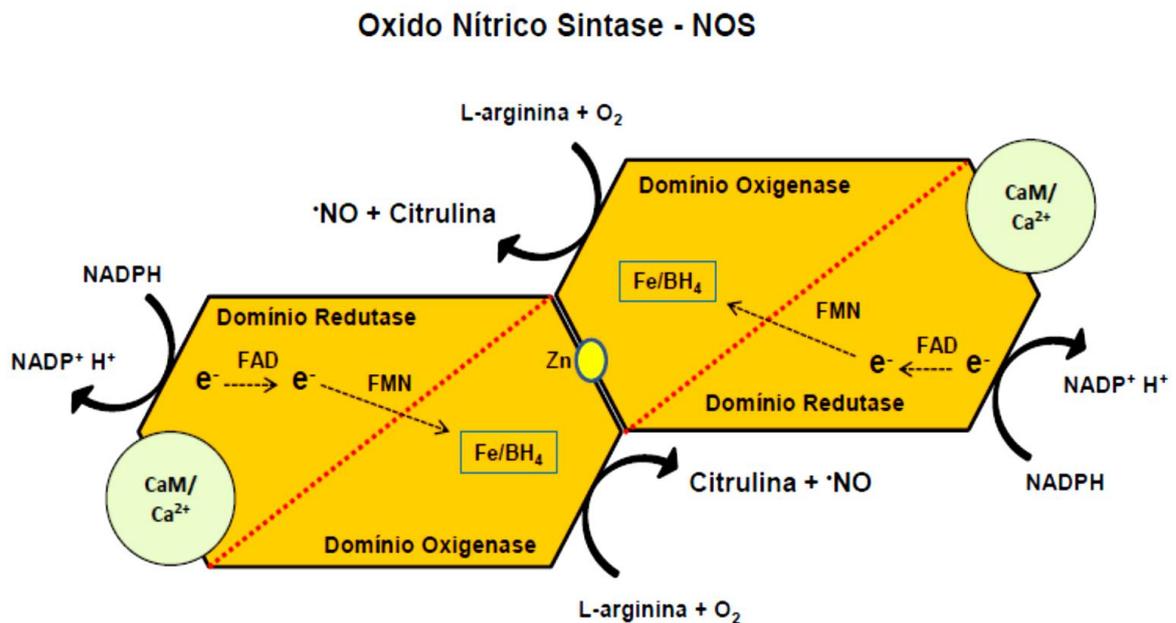
O óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) é uma molécula gasosa, facilmente difusível, altamente reativa em função da presença de um elétron desemparelhado (*radical livre*) que tem um importante papel numa grande variedade de processos (pato)fisiológicos (LOSCALZO; WELCH, 1995; FILHO; ZILLBERSTEIN, 2000). A sua importância como agente sinalizador, tanto intracelular (*autócrino*) quanto extracelular (*parácrino*), é relatada desde quando esta seminal molécula foi identificada, inicialmente, como fator relaxante derivado do endotélio (EDRF – *Endothelium-Derived Relaxing Factor*), onde foi descrita a sua participação nos mecanismos responsáveis pela vasodilatação (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; IGNARRO; BUGA, 1987; FURCHGOTT, 1999).

Quimicamente, a formação enzimática deste radical é catalisada por uma família de enzimas chamadas óxido nítrico sintases (NOS; EC 1.14.13.39) que, por sua vez, utiliza o nitrogênio guanidino terminal do aminoácido L-arginina como substrato para formar L-citrulina e $\cdot\text{NO}$. Para esta reação, faz-se necessário a presença de oxigênio (O_2) e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH), além de zinco e tetrahydrobiopterina (BH_4) (LIU; HUANG, 2008; FLEMING, 2010; TENNYSON; LIPPARD, 2011).

Há três isoformas distintas da NOS: a *neuronal* (*nNOS* ou NOS1), a *induzível* (*iNOS* ou NOS2) e a *endotelial* (*eNOS* ou NOS3) (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001; MANSUY; BOUCHER, 2004). Destas, as isoformas *eNOS* e *nNOS* constituem a classe constitutiva, as quais são controladas, principalmente, pelos níveis intracelulares de Ca^{2+} e pela calmodulina (CaM), enquanto a isoforma *iNOS* pertence a classe induzível e pode ser regulada por transcrição gênica, é independente de Ca^{2+} e, *a priori*, em resposta a mediadores pró-inflamatórios (ANDREW; MAYER, 1999; LUIKING; ENGELEN; DEUTZ, 2010).

Embora as isoformas da NOS apresentem diferenças funcionais, ambas exibem certa homologia estrutural entre si. Cada isoforma é constituída por um dímero proteico, onde cada monômero contém um domínio oxigenase *N*-terminal e um domínio redutase *C*-terminal, que apresentam atividades catalíticas diferentes, mas, que juntos, contribuem para o bom funcionamento da NOS (Figura 7) (ANDREW; MAYER, 1999; ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001). Cada domínio oxigenase, responsável pela conversão de L-arginina a L-citrulina e NO , apresenta sítios de acoplamento para um grupamento *heme* e uma molécula de BH_4 (*Tetrahidrobiopterina*) como cofatores, bem como resíduos de cisteína para o acoplamento de zinco e formar o dímero ativo, enquanto o domínio redutase contém sítios para flavina mononucleotídeo (FMN), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e NADPH como cofatores, além de uma região de interação com a CaM (Figura 7) (AOYAGI et al., 2003; FLEMING, 2010; TENNYSON; LIPPARD, 2011).

Figura 7 - Isoformas da enzima Óxido Nítrico Sintase (NOS) e seu mecanismo de ação.



Fonte: Autor, 2013.

Nota - As isoformas da NOS podem ser classificadas como constitutivas e induzível. Constitutivas: NOS1 ou Neuronal (*n*NOS), NOS3 ou Endotelial (*e*NOS) e Mitocondrial (*mt*NOS); Induzível: NOS2 ou Induzível (*i*NOS). A NOS é formada por dois monômeros, cada um contendo um domínio redutase e outro oxidase. O domínio redutase tem o sítio de acoplamento do complexo Cálcio/Calmodulina (Ca²⁺/CaM) é para redução do NADPH à NADP⁺ e H⁺. O domínio oxigenase apresenta o Tetrahydrobiopterina (BH₄) como cofator e o sítio para o acoplamento do substrato L-arginina e a consequente conversão à citrulina e óxido nítrico NO. (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001).

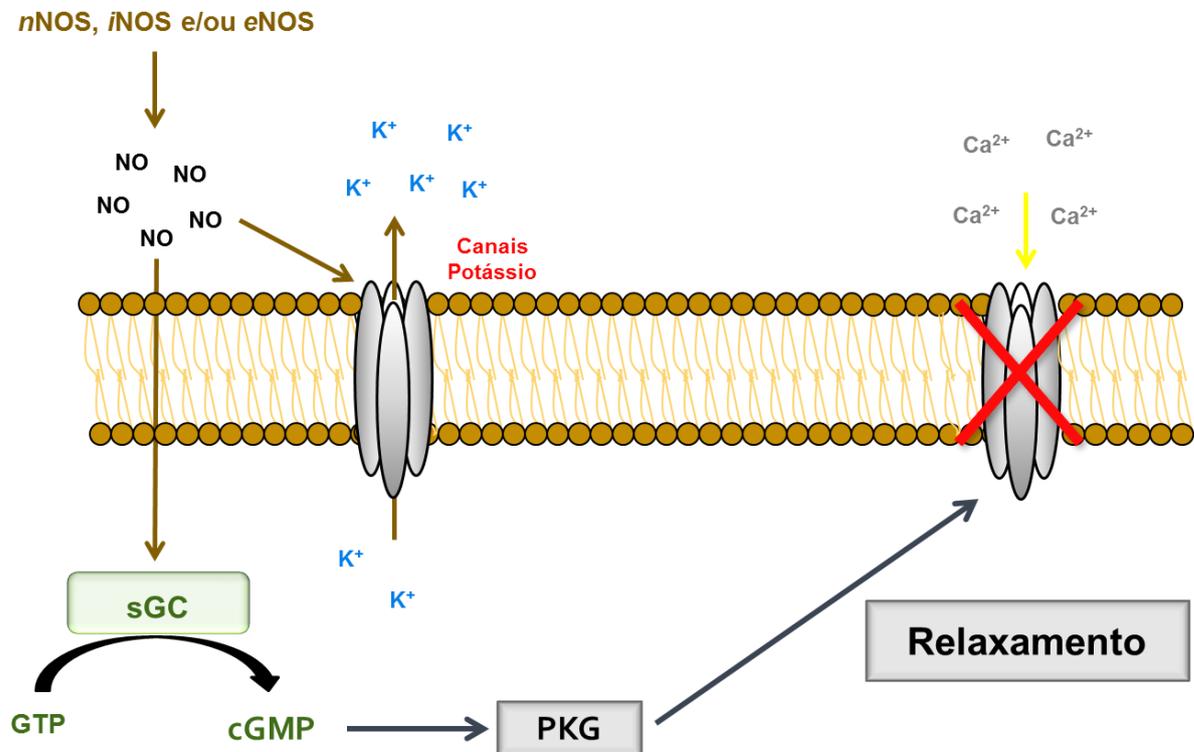
Além das três isoformas da NOS citadas anteriormente, há indícios de outra isoforma constitutiva e sensível ao Ca²⁺, encontrada regularmente na membrana interna da mitocôndria de vários tecidos, referida como óxido nítrico sintase mitocondrial (*mt*NOS) (BATES; LOESCH, 1995; BATES et al., 1996; LACZA et al., 2003). A esta enzima tem sido atribuído um papel imprescindível na fosforilação oxidativa mitocondrial, uma vez que a síntese de NO por meio da *mt*NOS interfere nos mecanismos inerentes a respiração mitocondrial, como a inibição e/ou desacoplamento da citocromo oxidase *c* (COX) da cadeia de transporte de elétrons, podendo ocasionar apoptose e estresse oxidativo (BROWN, 1995; GHAFOURIFAR et al., 1999; BROOKES, 2004; PODEROSO, 2009).

Uma vez sintetizado por uma das isoformas da NOS, em muitas células, o NO ativa a guanilato ciclase solúvel (sGC; *soluble Guanylyl Cyclase*), uma enzima citosólica composta por duas subunidades (α e β) que produz o segundo mensageiro intracelular guanosina-3',5'-

monofosfato cíclico (cGMP; *cyclic Guanosine Monophosphate*) a partir de trifosfato de guanosina (GTP; *Guanosine Triphosphate*) (NÉGRERIE et al., 2001; FRIEBE; KOESLING, 2003; LIU; HUANG, 2008; TSAI et al., 2011). A elevação do cGMP intracelular pode resultar na fosforilação de proteínas kinases dependentes de cGMP, fosfodiesterases e canais iônicos e, assim, exercer seus efeitos celulares, dentre eles, a vasodilatação (controle do tônus muscular liso), inibição da agregação plaquetária e modulação da neurotransmissão (Figura 8) (FEIL et al., 2003; BIRSCHMANN; WALTER, 2004; MULLERSHAUSEN; LANGE; MERGIA, 2006; RIBA et al., 2006).

Embora a sGC seja o alvo primário do NO , este também sinaliza em outras moléculas intracelulares, tais como a citocromo oxidase *c* na mitocôndria, a partir da ativação da mtNOS (GHAFOURIFAR; RICHTER, 1997; GHAFOURIFAR et al., 1999). O NO também é responsável por ativar diretamente canais para potássio sensíveis a cálcio (BK_{Ca} ou Maxi K) e canais para potássio sensíveis a ATP (K_{ATP}), promovendo hiperpolarização quando em altas concentrações e, assim, regulando o tônus vascular diretamente (LANG; WATSON, 1998; MISTRY; GARLAND, 1998; DENNINGER; MARLETTA, 1999; LANG et al., 2000). Também já foi demonstrado uma relação direta entre a redução significativa da atividade do NF- κ B e o aumento da concentração de NO , além da ativação de proteínas G, elevando os níveis de moléculas ligadas ao nucleotídeo GTP (*Trifosfato de Guanosina*) (LANDER; OGIESTE; PEARCE, 1995; MARSHALL; STAMLER, 1999; RAYCHAUDHURI et al., 1999; CAO et al., 2003; HEO; CAMPBELL, 2005). Além dos efeitos citados, o NO está envolvido na regulação das vias apoptóticas, seja atuando como agente anti-apoptótico quando em concentrações fisiológicas ou como efetor pró-apoptótico, quando, cronicamente, produzido em altas concentrações (BILLIAR, 1997; CHOI et al., 2002; KIM; TALANIAN; TANAKA et al., 2003). Diante do exposto, admite-se que o NO tem vários alvos intracelulares capazes de alterar muitas condições funcionais, independente de atuar no seu principal alvo celular que é a guanilato ciclase solúvel e consequente produção de cGMP.

Figura 8 - Representação do relaxamento vascular mediado pela sinalização do Óxido Nítrico (NO).



Fonte: Adaptado de FARACI; SOBEY, 1998.

Nota - O NO gerado pela ação das isoformas da NOS ativa a enzima citosólica guanilato ciclase solúvel (*sGC*), a qual é responsável pela síntese do segundo mensageiro cGMP (monofosfato de guanosina cíclico) a partir da hidrólise GTP (trifosfato de guanosina). O cGMP sintetizado fosforila proteínas específicas que acaba por resultar na resposta vascular ao NO .

3.3.2 O óxido nítrico na hipertrofia cardíaca

Há muito se reporta a existência de uma estreita relação entre o NO e as doenças cardiovasculares. Sabe-se, por exemplo, que na disfunção endotelial há um constante desequilíbrio nas vias de síntese e sinalização do NO (ROMERO et al., 2008; SILVA; PERNOMIAN; BENDHACK, 2012). Esta condição pode ser observada quando há uma diminuição da produção NO através das isoformas constitutivas da NOS (*eNOS* e *nNOS*) e/ou quando há uma superprodução por meio da isoforma induzível (*iNOS*), resultando na produção de outros agentes deletérios, como o peroxinitrito (ONOO^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânion superóxido (O_2^-) (THENGCHAI SRI et al., 2006; LUIKING; ENGELEN; DEUTZ, 2010; CHANDRA et al., 2012).

Muitos relatos tem evidenciado o papel do NO nas alterações miocárdicas frente aos estímulos hipertróficos. Nesse sentido, tem-se conhecimento que na insuficiência cardíaca, a produção de NO é elevada em função de um aumento da expressão (*upregulation*) e atividade da *iNOS* em detrimento da redução da síntese da isoforma endotelial da NOS (*eNOS*), podendo ter um papel deletério no miocárdio (DREXLER et al., 1998; GEALEKMAN; ABASSI; RUBINSTEIN, 2002; OZAKI et al., 2002). Este fato é responsável por comprometer a funcionalidade miocárdica, diminuindo a responsividade do tecido cardíaco a sinalização β -adrenérgica, atenuando, assim, o transiente de Ca^{2+} (HARE et al., 1998; ZIOLO et al., 2004).

Em contraste, na hipertrofia cardíaca, condição precedente à insuficiência cardíaca, há evidências de efeitos cardioprotetores das isoformas constitutivas da NOS. Tem-se mostrado em camundongos que a produção de NO está diminuída em função da redução da ativação da *eNOS* (NIU et al., 2012). Aliado a isso, resultados de estudos com modelos animais *Knockout* para *eNOS* (*eNOS*^{-/-}) demonstram o comprometimento funcional e morfológico do miocárdio, uma vez que a função diastólica e sistólica estão prejudicadas, além de um grau exacerbado de remodelamento miocárdico, comprovando que esta enzima tem um papel relevante no controle dos efeitos adversos da hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga de pressão (ICHINOSE et al., 2004; RUETTEN et al., 2005; LIU; HUANG, 2008; UMAR; VAN DER LAARSE, 2010). Sustentando a importância da *eNOS* para a modulação dos efeitos hipertróficos do isoproterenol como agente estimulante, camundongos transgênicos que superexpressam a citada isoforma apresentam um grau de hipertrofia e fibrose cardíaca atenuada (OZAKI et al., 2002).

A isoforma neuronal da NOS também tem um papel imprescindível na modulação da sinalização do NO no miocárdio frente a uma condição patológica. Animais *Knockout* para *nNOS* (*nNOS*^{-/-}) apresentam uma alteração dos mecanismos responsáveis pelo acoplamento excitação-contração, principalmente na sinalização do Ca^{2+} originário dos estoques intracelulares (retículo sarcoplasmático). Isto posto, a deleção de tal enzima é capaz de alterar positivamente o influxo de Ca^{2+} para o citosol, sugerindo que o NO , produzido pela *nNOS*, pode atuar como um sinalizador atenuando moderadamente a corrente de Ca^{2+} e assim modular o mecanismo contrátil do miocárdio (SEARS et al., 2003; HEATON et al., 2006). Somando-se ao exposto, animais *nNOS*^{-/-} submetidos a procedimentos de infarto do miocárdio têm mortalidade elevada, além do comprometimento da função cardíaca e resposta ao

agonista β -adrenérgico comprometida, corroborando com a ideia de que a síntese de NO pela *n*NOS tem uma grande relevância para modulação da contratilidade cardíaca (BENDALL et al., 2004; DAWSON et al., 2005; SARAIVA et al., 2005).

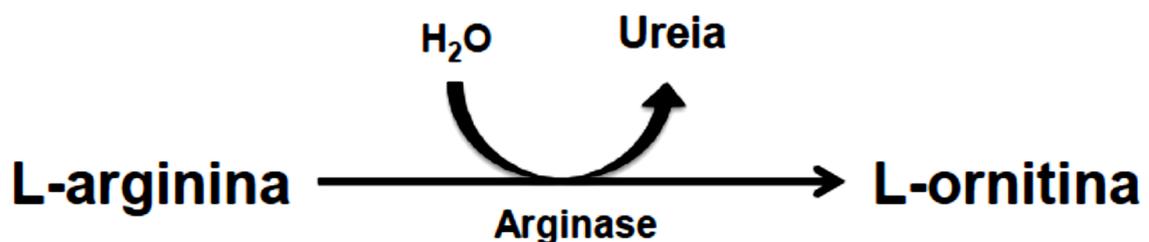
As evidências citadas demonstram a importância da origem do NO em relação às isoformas das enzimas responsáveis pela sua síntese, sendo as constitutivas (*e*NOS e *n*NOS) as mais importantes para os efeitos benéficos do NO , enquanto que a isoforma induzível (*i*NOS) parece exercer um efeito prejudicial para a funcionalidade miocárdica.

3.4 A arginase como um modulador endógeno da produção de óxido nítrico

3.4.1 Aspectos gerais da arginase

A arginase (EC 3.5.3.1) é a enzima central em um conjunto de reações que resulta na síntese de uréia e L-ornitina a partir da hidrólise de L-arginina (Figura 9). A ação enzimática da arginase sobre o seu substrato é totalmente dependente do acoplamento de dois cátions divalentes, que, em condições fisiológicas, corresponde ao manganês (Mn^{2+}), ao centro binuclear presente em cada subunidade da estrutura trimérica desta enzima (ASH, 2004; SCHENK; MITIĆ • ; GAHAN, 2012). Tem-se conhecimento que o centro binuclear formado pelos pares de íons Mn^{2+} é responsável por exercer o ataque ao carbono guanidino do substrato L-arginina e estabilizar o intermediário formado na reação através da ação nucleofílica do íon hidróxido do metal de transição formado na ligação Mn^{2+} - Mn^{2+} do centro ativo da enzima (BAGGIO et al., 1997; COSTANZO et al., 2005; DOWLING; COSTANZO, 2009).

Figura 9 – Síntese de ureia.



Fonte: Autor, 2013.

Nota - O aminoácido L-arginina é hidrolisado pela enzima trimérica arginase formando L-ornitina e ureia. Autor, 2013.

Há duas isoformas distintas da arginase que estão distribuídas e compartimentalizadas diferenciadamente nos tecidos e células. Estas são designadas como arginase I (AI) e arginase II (AII) (CABELLO; PRAJOUX; PLAZA, 1965; BASCUR et al., 1966). Enquanto a AI é encontrada predominantemente no citosol de células hepáticas, regulando o ciclo da uréia, a AII é relevantemente distribuída em tecidos extra-hepáticos. Esta isoforma está localizada, principalmente, nas mitocôndrias de células renais, tendo como uma das suas funções a regulação do metabolismo da L-arginina, provendo L-ornitina como precursor para biossíntese de glutamato, poliaminas, creatina e prolina (HERZFELD; RAPER, 1976; SPECTOR et al., 1994; MORRIS; BHAMIDIPATI; KEPKA-LENHART, 1997).

Além da distribuição tecidual e compartimentalização celular, as isoformas da arginase também diferem em suas propriedades imunológicas e bioquímicas. Ambos os subtipos de arginase apresentam diferenças nas distribuições de cargas elétricas ao longo da cadeia polipeptídica, sendo a AI, predominantemente catiônica, enquanto a AII apresenta uma característica aniônica (SKRZYPEK-OSIECKA; ROBIN; POREMBSKA, 1983; POREMBSKA; ZAMECKA, 1984; PEROZICH; HEMPEL; JR, 1998). Em humanos, até o momento, foram identificados dois subtipos de AII, os quais são diferenciados pelo resíduo inicial da sequência de aminoácidos que compõe a proteína, onde mais de 90% das enzimas são iniciadas pelo aminoácido valina-23 (COLLELUORI; MORRIS; ASH, 2001). Nesse sentido, comprovou-se a importância da disposição do resíduo aminoácido arginina 308 (Arg-308) na cadeia peptídica na manutenção da estrutura quaternária do subtipo 1 da arginase, bem como na sua estabilidade e propriedades cinéticas (LAVULO et al., 2001).

A ação da arginase está envolvida em vários processos endógenos, desde a regulação metabólica do seu substrato, a L-arginina, e outras moléculas, como o aminoácido L-ornitina, até o comprometimento da função sexual em homens e mulheres, uma vez que tem-se mostrado uma forte relação da atividade enzimática da arginase com a disfunção erétil masculina e hipoatividade sexual feminina, influenciando, principalmente, nos mecanismos responsáveis pelo tônus muscular liso na genitália do homem e da mulher (GRODY et al., 1989; CAMA; COLLELUORI; EMIG; SHIN, 2003; CHRISTIANSON, 2005; CROMBEZ; CEDERBAUM, 2005; JAIN-GHAI; NAGAMANI, 2011). Somando-se, a arginase tem um papel relevante na resposta imune celular e processos inflamatórios, modulando a utilização de L-arginina como substrato e a produção de ornitina, aminoácido imprescindível na mediação às respostas inflamatórias sistêmicas (BANSAL; OCHOA, 2003).

Sabe-se que a L-arginina, além de ser o único substrato fisiológico para arginase, também o é para a família de enzimas responsáveis pela síntese de NO , as isoformas da NOS. Dessa forma, a competição pelo mesmo substrato por parte das isoformas da arginase e da NOS torna-se um dos principais mecanismos moduladores dos efeitos exercidos pelos produtos da atividade de ambas as enzimas (BOUCHER; MOALI; TENU, 1999). Além disso, existem outros mecanismos pelos quais a arginase e a NOS interferem na ação uma da outra. Sabe-se, por exemplo, que o N^{ω} -hidroxi-L-arginina, um intermediário endógeno formado na síntese de NO , é um potente inibidor da arginase (BAGGIO; EMIG; CHRISTIANSON, 1999; DOWLING; COSTANZO, 2009; COSTANZO et al., 2010). Por sua vez, as poliaminas, formadas a partir de um produto da ação da arginase, podem atuar como reguladores fisiológicos da produção de NO (CONESKI; SCHOENFISCH, 2009; CHATURVEDI et al., 2010; CODOÑER-FRANCH et al., 2011; CHOI; PARK, 2012).

3.4.2 A arginase nas complicações cardiovasculares

O equilíbrio entre a produção de NO , através das enzimas NOS e o acionamento da arginase em vários tecidos, constitui uma ferramenta de grande relevância para vários processos fisiológicos mediados pela síntese de NO , principalmente no sistema cardiovascular (DURANTE; JOHNSON; JOHNSON, 2007).

O músculo liso vascular é altamente reativo a sinalização do NO originado nas células endoteliais vasculares, de forma que a ação parácrina do NO constitui um mecanismo de regulação do tônus muscular liso no vaso, contribuindo para a manutenção dos níveis pressóricos em condições favoráveis (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; DELPY; COSTE; GOUVILLE, 1996; FURCHGOTT, 1999; GUNNETT et al., 2001). No entanto, em muitas condições patológicas, como na hipertensão arterial, aterosclerose e diabetes, os processos responsáveis pela ação do NO na função vascular tem sido alvo de muitas investigações devido a um desequilíbrio da ação desta espécie molecular reativa (CHENG et al., 2012; BENDHACK, 2012; SILVA; PERNOMIAN; SON, 2012; VAISMAN et al., 2012).

Nesse sentido, atribui-se à arginase a responsabilidade de está interferindo nos efeitos exercidos pelo NO no sistema cardiovascular. Corroborando com esta ideia, trabalhos evidenciam o papel da arginase na aterosclerose, onde se observa o acionamento de um

mecanismo mediado pela sua ativação e/ou aumento na síntese através da elevação de lipoproteínas de baixa densidade oxidada (OxLDL; *Oxidized Low-Densite Lipoprotein*) e a consequente inativação da eNOS, diminuindo a biodisponibilidade de óxido nítrico (RYOO et al., 2006, 2008, 2011). Nesse mesmo sentido, evidências indicam que a disfunção endotelial observada em vasos em processo de envelhecimento e também na diabetes tem sido conferido a hiperativação da arginase em detrimento da diminuição funcional da eNOS (BERKOWITZ et al., 2003; GRÖNROS et al., 2011; SHIN; BERKOWITZ; RYOO, 2012; ROMERO et al., 2012).

Na hipertensão arterial, um dos multifatores responsáveis pelos prejuízos encontrados nesta condição é a disfunção endotelial que contribui para elevação da resistência periférica (BERG, 2005). Sendo assim, a comprovada relação existente entre os mecanismos responsáveis pela disfunção endotelial e a síntese de NO tem levado a investigação do papel da arginase na condição hipertensiva. Estudos mostram que o tratamento crônico de ratos espontaneamente hipertensos (SHR; *Spontaneously Hypertensive Rat*) com os inibidores da arginase DFMO (α -difluoromethylornithin) e nor-NOHA (N^{ω} -hydroxy-nor-L-arginine) melhora a função vascular e atenua os níveis pressóricos (DEMOUGEOT et al., 2005; BAGNOST et al., 2008, 2010). No referido modelo de hipertensão, caracterizou-se que os efeitos deletérios da arginase depende do tempo, de modo que um aumento na sua síntese (*upregulation*) precede os estágios elevados da pressão arterial e, após, uma alteração funcional da enzima é observada (DEMOUGEOT et al., 2007). Em conformidade com o exposto, a biodisponibilidade aumentada de L-arginina, substrato tanto para arginase quanto para NOS, restaura a produção de NO , melhorando a regulação central dos parâmetros cardiovasculares na hipertensão (LEE et al., 2009; OU; WEI; HUANG, 2010). Diante das evidências expostas, vê-se que o eixo NO /arginase tem ganhado grande atenção como possíveis alvos terapêuticos para o tratamento de várias condições patológicas, principalmente, para as doenças cardiovasculares.

3.4.3 O papel da arginase na hipertrofia cardíaca

A ocorrência da arginase no tecido cardíaco tem gerado uma grande variedade de evidências que leva a considerar a sua influencia não apenas no leito vascular, mas também no coração (HERZFELD; RAPER, 1976).

As primeiras evidências da interferência da arginase no miocárdio foram levantadas a partir de investigações que mostraram o papel de outra enzima, a ornitina descarboxilase (ODC), na hipertrofia cardíaca (SCHLÜTER et al., 2000; SHANTZ; FEITH; PEGG, 2001). Esta enzima é responsável pela síntese de poliaminas a partir da utilização de ornitina como substrato que, por sua vez, é o produto da ação enzimática da arginase sobre o aminoácido L-arginina (COLLELUORI; MORRIS; ASH, 2001; YU et al., 2003; PEGG, 2006). A possível relação da ODC com a arginase nas adaptações cardíacas aos estímulos hipertróficos é reforçada por trabalhos que comprovam uma elevada concentração de poliaminas e uma baixa produção de NO , associada a uma redução da síntese de *e*NOS (LIN et al., 2008, 2010). Nesse sentido, reforçando o papel da arginase no miócito cardíaco, utilizando-se camundongos transgênicos que superexpressam a ODC, observou-se que estes apresentaram uma resposta hipertrófica mais acentuada ao isoproterenol, sugerindo que o aumento na atividade da arginase reduz a produção de NO , contribuindo, assim, para disfunção cardíaca (GIORDANO et al., 2012).

Sustentando as evidências citadas anteriormente, uma relação positiva entre a expressão e atividade da arginase em algumas condições patológicas, tais como a doença de chagas, tem mostrado ser um fator contribuinte para a sobrevivência do parasita causador da doença (AOKI et al., 2004; CUERVO et al., 2008). Somando-se, a inibição da arginase atenua os efeitos prejudiciais do infarto do miocárdio e da insuficiência cardíaca, demonstrando que a “*upregulation*” da arginase tem um papel relevante em condições patológicas (HEUSCH et al., 2010; JUNG et al., 2010).

Na hipertrofia cardíaca, sabe-se que há um sério comprometimento dos efeitos cardioprotetores do NO , observando-se uma significativa redução da concentração deste radical na condição hipertrófica do coração, enquanto que na progressão para o estado de insuficiência cardíaca, há uma produção elevada e sustentada de NO , tanto em modelos animais quanto em humanos (WOLLERT; DREXLER, 2002; UMAR; VAN DER LAARSE, 2010; LIU; FENG, 2012). No coração normal de ratos, a ativação da arginase miocárdica (AII) regula a função cardíaca, reduzindo a contratilidade através da inibição da *n*NOS e, assim, modulando a biodisponibilidade NO (STEPPAN et al., 2006). Em contrapartida, a principal isoforma da arginase encontrada em miócitos cardíaco de felino é o subtipo I (AI) que, quando ativado, é o responsável por controlar positivamente o inotropismo cardíaco no miocárdio normal (JUNG et al., 2006). Embora se observe uma diferença funcional de ambos

os subtipos da arginase em cardiomiócitos de diferentes espécies de mamíferos, a ativação desta enzima induz uma atenuação da via de sinalização regulada pelo NO/cGMP (BARTUNEK et al., 1998; POST; PIESKE, 2006; HAMMOND; BALLIGAND, 2012). Diante da condição hipertrófica promovida pela hipertensão, mesmo que a inativação da arginase promova um efeito vaso-protetor via NO , tal resposta não é capaz de reverter o remodelamento miocárdico ou vascular fomentado pelos altos níveis pressóricos (DEMOUGEOT et al., 2005; BAGNOST et al., 2008, 2010).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais e delineamento experimental

Neste estudo, utilizou-se camundongos machos da linhagem C57Bl/6 com idades entre 12 e 16 semanas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Estes foram mantidos, sob condições padrões de experimentação animal, no Laboratório Experimental (LabExp) do Laboratório de Reatividade Cardiovascular (LRC) do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) da UFAL. Neste ambiente, proveu-se condições controladas de temperatura ($22\pm 1^\circ\text{C}$), ciclo claro-escuro de 12 horas com livre acesso a água e alimentação. Os animais foram alocados em gaiolas contendo, no máximo, 4 por gaiola. Deixa-se claro e por expresse que todos os procedimentos foram conduzidos com rigor ético e de acordo com os princípios postulados pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), sendo anteriormente submetidos para análise como Projeto de Pesquisa e, posteriormente, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFAL (número de protocolo 021462/2010-91, ANEXO).

O delineamento experimental consistiu em distribuir os animais em três grupos: Controle (CT), Isoproterenol (ISO) e Isoproterenol+Inibidor da Arginase (ISO+I). O número de animais utilizado para cada grupo foi adequado a demanda de cada experimento, de forma que a quantidade de animais por grupo variou de 5-8 em diferentes procedimentos experimentais. A hipertrofia cardíaca foi induzida farmacologicamente através da administração diária, subcutânea (s.c.), de isoproterenol (15 mg.Kg^{-1}), um fármaco simpatomimético, nos grupos ISO e ISO+I durante sete dias. O grupo CT recebeu apenas óleo vegetal *in natura* como veículo. O inibidor da arginase (L-norvalina) foi ofertado na água (1,5%; $\sim 3,0 \text{ mg.Kg}^{-1}$) para o grupo ISO+I a partir do dia anterior ao início da administração do isoproterenol (Figura 10).

Figura 10 – Esquematização representativa do protocolo experimental utilizado.



Fonte: Autor, 2013

Nota - No dia zero (0), deu-se início ao protocolo com a oferta de L-norvalina na água (1,5%; $\sim 3,0 \text{ mg.Kg}^{-1}$) para o grupo ISO+I. A partir do dia seguinte até o 7º dia, procedeu-se a administração de isoproterenol para os grupos ISO e ISO+I na dosagem de 15 mg.Kg^{-1} . O grupo controle recebeu apenas a administração do veículo. Autor, 2013.

4.2 Sacrifício dos animais

Após o período de indução farmacológica da hipertrofia cardíaca, no oitavo dia, seguido de um período de jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados com Ketamina/Xilazina (110/10 mg.Kg⁻¹; i.p.) e sacrificados por punção cardíaca. O sangue coletado durante este procedimento foi transferido para tubos “*eppendorfs*” contendo heparina (500 UI.mL⁻¹) e/ou EDTA (0,2 M), de acordo com o protocolo bioquímico, e colocados em banho de gelo por, no mínimo, 20 minutos. Em seguida, o sangue foi centrifugado 4.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente para obtenção de plasma e eritrócitos. Uma vez obtida, as amostras plasmáticas e eritrocitárias foram armazenadas em freezer -80°C para análises posteriores.

4.3 Avaliação morfológica do tecido cardíaco

4.3.1 Índice de massa cardíaca

A hipertrofia cardíaca foi indicada através do cálculo do índice de massa cardíaca obtido pela medida da razão entre o peso cardíaco e o peso corporal (PCard/PCorp) e também pela razão entre peso do ventrículo esquerdo e o peso corporal (PVE/PCorp) (SEN et al., 1974; PATEL et al., 1991; DESK; WILLIAMS; HEALTH, 1992). Para isso, após a coleta de sangue, o coração foi removido e devidamente pesado em balança semi-analítica (0,001g; SHIMADZU®). Em seguida, procedeu-se uma cuidadosa separação das câmaras cardíacas - átrios, ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE) - e a pesagem destas. Na sequência, as amostras foram armazenadas em biofreezer -80°C para análises posteriores ou alocadas separadamente para processamento histológico.

4.3.2 Processamento histológico do ventrículo esquerdo

A análise histológica do coração foi realizada com o objetivo de se comprovar a ocorrência de hipertrofia cardíaca. Sendo assim, após a pesagem, (1) os ventrículos esquerdos foram fixados em formalina 10% por um período de 16 à 20 horas. Em seguida, (2) os tecidos passaram por um processo de desidratação através de uma sequência de banhos em etanol a 70, 90 e 100% em tempos determinados de imersão. (3) Após a desidratação, os ventrículos foram submetidos a um processo de diafanização (*clareamento*) que consistiu numa sequência de dois banhos de 30 minutos em solvente orgânico (*Xilol PA*, *QEEL*[®]). Este procedimento objetivou preparar o tecido para a etapa seguinte do processamento que, por sua vez, permitiu uma melhor impregnação e inclusão tecidual em parafina. (4) Na sequência, o processo de impregnação consistiu em imergir as amostras em três banhos de parafina em tempos de 30, 60 e 90 minutos a uma temperatura de 60°C. (5) Após o último banho de 90 minutos, as amostras foram retiradas da estufa para conclusão do processo de impregnação em parafina e posteriormente seccionadas a uma espessura de 5 micrômetros (μm) em micrótomo (*MAASS et al.*, 2004).

Na sequência, utilizou-se a coloração de Hematoxilina e Eosina para se analisar morfológicamente e visualmente os efeitos hipertróficos do isoproterenol. Para isso, (1) as amostras, previamente cortadas e montadas em lâminas histológicas, foram submetidas, inicialmente, a uma sequência de três banhos em xilol durante 5 minutos. Em seguida, (2) os cortes histológicos passaram por três banhos sucessivos de etanol nas concentrações 100, 90 e 70% durante 5 minutos em cada concentração. (3) Logo após, as lâminas foram imersas por 5 minutos em água destilada. (4) A seguir, procedeu-se a primeira etapa de coloração com Hematoxilina de Herris durante 3 minutos, seguido de um período de 5 minutos de lavagem com água corrente. (5) Posteriormente, a segunda etapa referente à coloração consistiu em banho com solução alcoólica de eosina amarelada durante 4,5 minutos. (6) Seguidamente, as amostras foram submetidas a dois banhos em etanol às concentrações de 90 e 100%, durante 5 minutos para cada imersão. (7) Finalizando, as laminas passaram por dois banhos em xilol por 5 minutos.

Após o processo de coloração, as amostras foram fotografadas em microscópio ótico Olympus[®] BX51 com objetiva para aumento de 100x acoplado ao sistema de aquisição de imagens DP2-BSW[®] para análise posterior.

4.4 Dosagens bioquímicas

4.4.1 Preparações dos homogenatos ventriculares

Foram preparados homogenatos do ventrículo esquerdo. Uma vez que os tecidos estavam armazenados em freezer -80° , os mesmos foram colocados e mantidos num recipiente contendo gelo comum para descongelamento à baixa temperatura. Em seguida, com as amostras acondicionadas em tubos apropriados, foi adicionada uma solução lise-tampão RIPA (*RadioImmuno Precipitation Assay*) contendo um coquetel de inibidores de proteases (Roche[®]) obedecendo a uma relação de peso/volume (P/V) de 1:10 (100 mg de amostra/900 μ L de RIPA). Após a adição da solução de lise, cada amostra foi cuidadosamente homogeneizada com a utilização de aparelho homogeneizador a uma rotação de 4000 a 5000 rpm. Ao final do processo de homogeneização, cada amostra foi submetida a 10 segundos no sonicador (ondas ultrassônicas; 40W). Na sequência, as amostras foram centrifugadas a uma rotação de 12.000 rpm, por 20 minutos, à temperatura de 4° C. Finalizado este processo, o sobrenadante de cada amostra foi transferido para um tubo “*ependorf*” e armazenado em freezer -80° C para análises posteriores.

4.4.2 Dosagem de proteínas totais

A dosagem de proteínas totais foi realizada com o objetivo de se normalizar as demais dosagens bioquímicas, tanto plasmáticas quanto teciduais, pelas concentrações proteicas. Para tanto, utilizou-se o método descrito por Bradford (BRADFORD, 1976). Inicialmente, uma curva padrão foi preparada a partir de uma solução padrão de albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumine*, BSA, 5 mg.mL^{-1}) diluída em solução PBS (*Phosphate Buffered Saline*, 0,01M) em diferentes concentrações com o objetivo de se compor os pontos da curva ($0,0625 - 1,25 \text{ } \mu\text{g.}\mu\text{L}^{-1}$). Em seguida, tanto as amostras de plasma quanto as de ventrículo esquerdo foram diluídas em solução PBS nas seguintes proporções: ventrículo (1:10) e plasma (1:250). Na sequência do ensaio, 5 μ L de cada amostra, previamente diluída, foi plaqueada em duplicata e adicionado 250 μ L do reagente Bradford (Sigma[®]) em cada poço da microplaca. Seguidamente, após as microplacas serem protegidas da luz com papel alumínio por 5 minutos, mediu-se as absorbâncias de cada amostra num comprimento de onda de 595 nm (*Multiskan GO*, Thermo Scientific[®]). A concentração de proteínas (mg.mL^{-1}) em cada

amostra foi determinada a partir da utilização da equação da reta obtida com a curva padrão de BSA analisada no programa Excel[®].

4.4.3 Atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH)

A determinação da atividade plasmática da enzima lactato desidrogenase (LDH) foi realizada através de *kit* comercial (Labtest[®]) baseado em sistema colorimétrico com método cinético de tempo fixo e medição de ponto final. Salienta-se que o referido método foi adaptado para dosagem em microplacas (NUNC[®], Dinamarca) por nosso grupo (Dados não publicados).

Brevemente, 4 μL de amostra plasmática foi plaqueada e, logo após, 80 μL de substrato foram adicionados em cada amostra. Na sequência, seguiu-se a incubação à 37°C durante 2 minutos. Em seguida, 16 μL de um reagente de cor foram acrescentados às amostras e seguiu-se a mais uma incubação à 37°C durante 5 minutos. Após a incubação, 160 μL de solução estabilizadora foram adicionados por 5 minutos à temperatura ambiente sob proteção luminosa. Seguiu-se a leitura a um comprimento de onda de 500 nm (*Multiskan GO*, Thermo Scientific[®]), sendo os resultados expressos como U.L^{-1} .

4.4.4 Peroxidação lipídica

Um dos métodos mais utilizados para se detectar e quantificar a peroxidação lipídica como indicador de injúria oxidativa tecidual ou sistêmica é a mensuração de malonildialdeído (MDA), formado a partir da quebra de hidroperóxidos de origem lipídica (NIKI et al., 2005; LYKKESFELDT, 2007). Nesse sentido, com adaptações realizadas por Rabelo (2004) e descrito inicialmente por Ohkawa e colaboradores (1979), utilizou-se o método que detecta espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS; *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) para mensurar o MDA, o principal produto formado, indicador da peroxidação lipídica (JANERO, 1990). Suscintamente, utilizou-se 100 μL de amostra (plasma e/ou ventrículo esquerdo), ao qual se adicionou 10 μL do antioxidante BHT 5 mM (*butylated hydroxytoluene*) e 1250 μL de uma solução do ácido tiobarbitúrico (TBA) a 1,3 % (Sigma[®], USA). Em seguida, com o objetivo de garantir o correto processamento da reação, cada amostra foi

incubada a 95°C durante 60 minutos. Na sequência, a reação foi interrompida com uma rápida imersão das amostras em banho de gelo por 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 8 minutos à 4°C (Herolab GmbH Laborgeraete[®], Wiesloch, Alemanha). Neste método, há a formação de um cromóforo roseado devido à reação do MDA com o TBA (ARMUTCU et al., 2008; DEMIRCAN; GUREL; ARMUTCU, 2008). A leitura da absorbância foi realizada em um leitor para microplacas (*Multiskan GO*, Thermo Scientific[®]), em comprimento de onda de 532 nm e 600 nm. Os valores foram expressos como equivalentes de MDA em $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ e normalizado pela concentração de proteínas totais no plasma e/ou tecidos.

4.4.5 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi mensurada nos tecidos ventriculares esquerdos a partir de leitura em microplacas (NUNC[®], Dinamarca) com a utilização de um *kit* comercial (FLUKA[®]). Resumidamente, o método é baseado na utilização de um sal solúvel em água, o WST-1 [2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H tetrazolium, sal monossódico], que é reduzido pelo ânion superóxido (O_2^-). O produto desta reação é o cromógeno *formazan* que é detectável a um comprimento de onda de 450 nm (*Multiskan GO*, Thermo Scientific[®]). A taxa de redução é linearmente relacionada à atividade da enzima xantina oxidase (XO) que, por sua vez, é inibida pela SOD. A atividade da SOD foi, então, determinada como porcentagem de inibição da XO pela SOD. Os resultados foram normalizados pela concentração proteica tecidual (BRADFORD, 1976) e apresentados como UI/[Proteína] mg.dL^{-1} .

4.4.6 Atividade da enzima catalase (CAT)

A mensuração da atividade de catalase (CAT) foi realizada em microplaca (NUNC[®], Dinamarca) nas amostras de tecido ventricular esquerdo através de um método padronizado no Laboratório de Reatividade Cardiovascular (LRC) e no Max Delbrück Center for Molecular Medicine (MDC).

Inicialmente, 100 μL de cada amostra foram adicionadas a placa. Para o início da reação, foi adicionado 20 μL de H_2O_2 (1 mM). Em seguida, foi acrescentada uma substância cromógena e o produto da reação foi mensurado em leitora para microplaca a um comprimento de onda de 550 nm (*Multiskan GO*, Thermo Scientific[®]). Uma curva padrão foi preparada com o objetivo de se quantificar a atividade enzimática da CAT, de forma que os resultados foram normalizados pela concentração de proteínas totais (BRADFORD, 1976) e expressos como $\text{UI}/[\text{Proteína}] \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$. Salienta-se, ainda, que esta metodologia encontra-se em fase final de escrita do documento que envolve proteção técnico-científico. Assim, maiores detalhes relacionados à metodologia não estão aqui expostos.

4.4.7 Atividade da enzima arginase

Para se mensurar a atividade enzimática da arginase em amostras plasmáticas e teciduais cardíacas foi utilizado um método descrito anteriormente (SCHIMKE; DOYLE, 1970; SCHIMKE, 1970) e adaptado para leitura em microplacas pelo nosso grupo. Abreviadamente, 50 μL de amostra foram incubadas com 75 μL de Tris-HCl suplementado com cloreto de manganês (MnCl_2) a uma temperatura de 55 à 60°C por 10 minutos. Na etapa seguinte, a reação foi iniciada com a adição de 50 μL de solução de L-arginina e incubada a 37°C por 60 minutos. Ao término deste período, a reação foi interrompida com a adição de 400 μL de mistura ácida ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_3\text{PO}_4:\text{H}_2\text{O}$). Em seguida, 25 μL do cromógeno α -isonitrosopropiofenona foi adicionado à mistura. Após 45 minutos a 100°C, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente e protegida da luz por 10 minutos e, em seguida, a absorbância foi mensurada a 540 nm em leitor para microplacas (*Multiskan GO*, Thermo Scientific[®]). Os dados foram normalizados pela concentração de proteínas totais (BRADFORD, 1976) e a atividade enzimática, expressa em $[\text{Ureia}] \text{ mmol}\cdot\text{min}^{-1}/[\text{Proteína}]\cdot\text{mL}\cdot\text{mg}^{-1}$.

4.4.8 Dosagem de nitrito

A dosagem de nitrito (NO_2^-) é muito utilizada como um indicador indireto da produção de $\cdot\text{NO}$ (GIRALDEZ; ZWEIER, 1998). Nesse sentido, utilizamos um método descrito por Fox (FOX, 1979) e adaptado pelo nosso grupo para estimar a produção de $\cdot\text{NO}$ em amostras plasmáticas e ventriculares esquerdas através da determinação colorimétrica de NO_2^- . Para tanto, o ensaio iniciou com um processo de precipitação de proteínas, onde 50 μL de amostras foram misturadas a um *mix* ácido e levemente homogeneizadas. Seguidamente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm a 4°C durante 20 minutos para auxiliar no processo de precipitação. Na sequência, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e, em seguida, 50 μL de cada amostra foi plaqueada (NUNC[®], Dinamarca). A etapa seguinte consistiu na adição de 50 μL da solução **A** acompanhado de um período de incubação de 10 minutos a temperatura ambiente e protegida da luz. Após esse período, 50 μL da solução **B** foram acrescentadas e após mais um período de 10 minutos de incubação, protegido da luz. Realizou-se a mensuração do nitrito a um comprimento de onda de 540 nm. Os níveis de NO_2^- formado na reação foram mensurados a partir da utilização de uma função obtida com uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO_2) que foi preparada com concentrações variando de 1,56 μM à 100 μM .

4.4.9 Análise estatística

Para análise estatística, seguiu-se, inicialmente, a utilização do teste de normalidade de *Shapiro-Wilk* para se avaliar a distribuição dos dados. Quando se observou distribuição simétrica, utilizou-se o teste de Análise de Variância de uma e duas vias (ANOVA *One-Way* e ANOVA *Two-Way*) seguido do pós-teste de *Bonferroni* para múltiplas comparações. Para os dados que não apresentaram distribuição simétrica, fez-se uso do teste de *Kruskal-Wallis*, seguido do pós-teste de *Dunn* para múltiplas comparações.

Foram utilizados, respectivamente, os softwares Excel[®] e GraphPad Prism[®] Versão 5.0 para tabulação e análise estatística dos dados, os quais são apresentados como MÉDIA±EPM. Considerou-se os resultados significativos quando $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Índices de massa cardíaca e histologia cardíaca

A confirmação da ocorrência de hipertrofia cardíaca induzida pela administração diária de isoproterenol foi obtida pelo índice de massa cardíaca. Este é determinado pela razão entre peso cardíaco e peso corporal (PCard/PCorp; mg.g^{-1}) e razão entre peso do ventrículo esquerdo e peso corporal (PVE/PCorp; mg.g^{-1}).

De acordo com a tabela 1, o tratamento diário tanto com o isoproterenol (ISO: $149,7 \pm 4,0$ mg; $P < 0,0001$) como com o Isoproterenol+Inibidor da Arginase (ISO+I: $138,8 \pm 2,9$ mg; $P < 0,001$) resultou em significativo aumento do peso cardíaco total quando comparados ao grupo controle (CT: $119,7 \pm 2,1$ mg), representando um aumento de $24,7 \pm 3,3\%$ e $15,7 \pm 2,4\%$, respectivamente. A normalização do peso cardíaco pelo peso corporal (razão PCard/PCorp) confirmou a ocorrência de hipertrofia cardíaca, onde os grupos ISO e ISO+I ($6,1 \pm 0,12$ mg.g^{-1} e $5,9 \pm 0,11$ mg.g^{-1} ; $P < 0,0001$, respectivamente) apresentaram uma razão aumentada em relação ao grupo CT ($4,8 \pm 0,05$ mg.g^{-1}), representando uma elevação de $25,8 \pm 2,6\%$ e $23,1 \pm 2,2\%$ no índice de massa cardíaca dos grupos ISO e ISO+I, respectivamente.

A análise de peso do ventrículo esquerdo (Tabela 1) seguiu os resultados apresentados anteriormente, onde os grupos ISO e ISO+I ($104,7 \pm 2,6$ mg e $101,2 \pm 2,0$ mg; $P < 0,0001$, respectivamente) apresentaram aumento significativo na massa do ventrículo esquerdo em relação ao grupo CT ($85,1 \pm 1,6$ mg), correspondendo a um incremento de $16,3 \pm 2,9\%$ e $12,4 \pm 2,2\%$ na massa ventricular esquerda, respectivamente. A razão PVE/PCorp confirmou que o tratamento com isoproterenol ($4,2 \pm 0,07$ mg.g^{-1} ; $P < 0,0001$) e com Isoproterenol+Inibidor da Arginase ($4,30 \pm 0,08$ mg.g^{-1} ; $P < 0,0001$) promoveu um aumento significativo na massa do ventrículo esquerdo em relação ao grupo controle ($3,4 \pm 0,04$ mg.g^{-1}), significando uma elevação da razão PVE/PCorp de $23,8 \pm 2,1\%$ e $26,4 \pm 2,9\%$ nos grupos ISO e ISO+I, respectivamente (tabela 1).

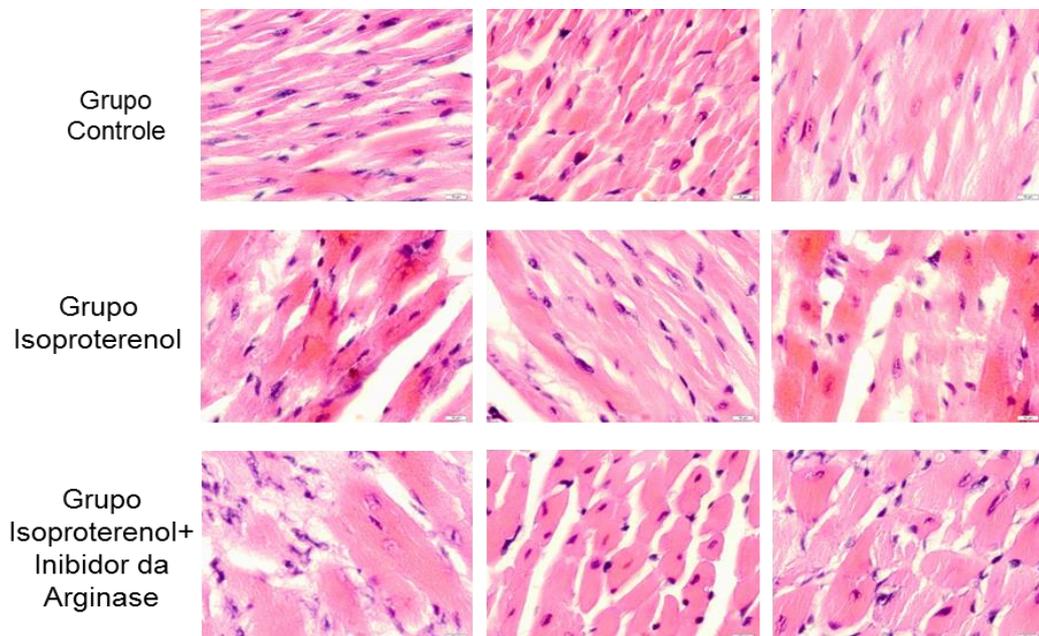
A coloração histológica com hematoxilina e eosina (Figura 11), mostrou que a inibição da arginase com L-norvalina não foi capaz de prevenir ou atenuar o efeito hipertrófico do isoproterenol, de modo que se observou um aumento no volume celular tanto no grupo ISO quanto no grupo ISO+I.

Tabela 1 - Peso Cardíaco e Índice de Massa Cardíaca

Parâmetros	CT	ISO	ISO+I
Peso Corporal (g)	24,7±0,4	24,6±0,4	23,4±0,7
Peso Cardíaco (mg)	119,7±2,1	149,7±4,0 ^a	138,8±2,9 ^b
Aumento Relativo do Peso Cardíaco (%)	-	24,7±3,3 ^a	15,7±2,4 ^b
Razão PCard/PCorp (mg·g ⁻¹)	4,8±0,05	6,1±0,12 ^a	5,9±0,11 ^a
Aumento Relativo da Razão Pcard/PCorp (%)	-	25,8±2,6 ^a	23,1±2,2 ^a
Peso Ventrículo Esquerdo (mg)	85,1±1,6	104,7±2,6 ^a	101,2±2,0 ^a
Aumento Relativo do Peso Ventrículo Esquerdo (%)	-	16,3±2,9 ^a	12,4±2,2 ^a
Razão PVE/PCorp (mg·g ⁻¹)	3,4±0,04	4,2±0,07 ^a	4,3±0,08 ^a
Aumento Relativo da Razão PVE/PCorp (%)	-	23,8±2,1 ^a	26,4±2,9 ^a

Fonte: Autor, 2013.

Nota - Os dados são apresentados como Média±EPM. PCard/PCorp e PVE/PCorp, sendo correspondentes a razão entre peso cardíaco e peso corporal e a razão do peso ventrículo esquerdo e peso corporal, respectivamente. Grupo controle (CT, n=13), grupo Isoproterenol (ISO, n=13) e grupo Isoproterenol+Inibidor da Arginase (ISO+I, n=15). ANOVA *One-Way* seguido do pós-teste de *Bonferroni* e teste de *Kruskal-Wallis* seguido do pós-teste de *Dunn* para múltiplas comparações (^aP<0,0001 vs CT e ^bP<0,001 vs CT).

Figura 11 – Fotomicrografias de secção frontal do ventrículo esquerdo

Fonte: Autor, 2013.

Nota - Grupo Controle (n=3), grupo Isoproterenol (n=3) e grupo Isoproterenol+Inibidor da Arginase (n=3). Após 3 minutos em hematoxilina seguidos de 4,5 minutos em eosina, observa-se um aumento no volume celular dos cardiomiócitos ventriculares dos grupos ISO e ISO+I. Aumento de 100x para todos os grupos.

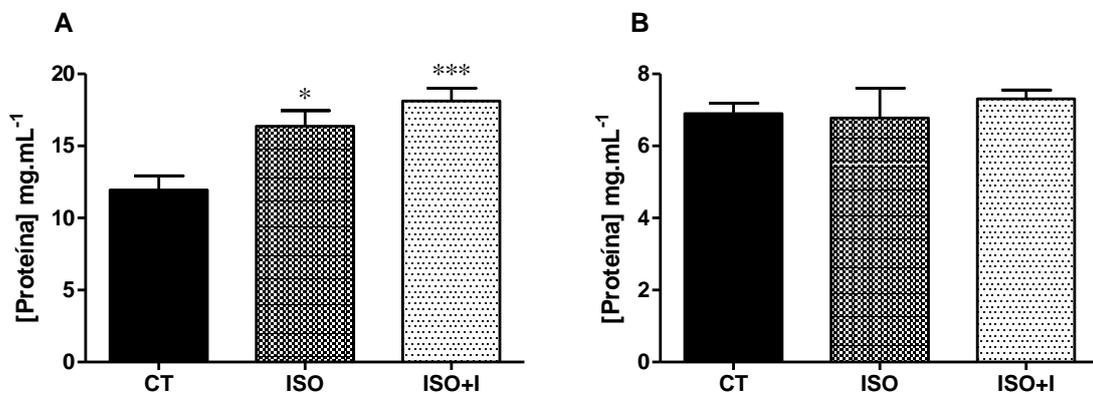
5.2 Dosagens bioquímicas

5.2.1 Níveis de proteínas totais no plasma e ventrículo esquerdo

As concentrações de proteínas totais plasmáticas e ventriculares foram determinadas através do método de Bradford (BRADFORD, 1976) adaptado para leitura em microplacas.

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que os níveis plasmáticos de proteínas totais estão significativamente elevados nos grupos ISO ($16,4 \pm 1,1 \text{ mg.mL}^{-1}$; $P < 0,05$) e ISO+I ($18,2 \pm 0,9 \text{ mg.mL}^{-1}$; $P < 0,0001$) quando comparado ao grupo CT ($11,9 \pm 1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) (Figura 12A). Em contrapartida, não foi observado diferença significativa nos níveis de proteínas totais do ventrículo esquerdo entre os grupos CT, ISO e ISO+I ($6,9 \pm 0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$; $6,8 \pm 0,8 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $7,3 \pm 0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$, respectivamente) (Figura 12B).

Figura 12 – Dosagem da concentração de proteínas totais pelo método de Bradford.



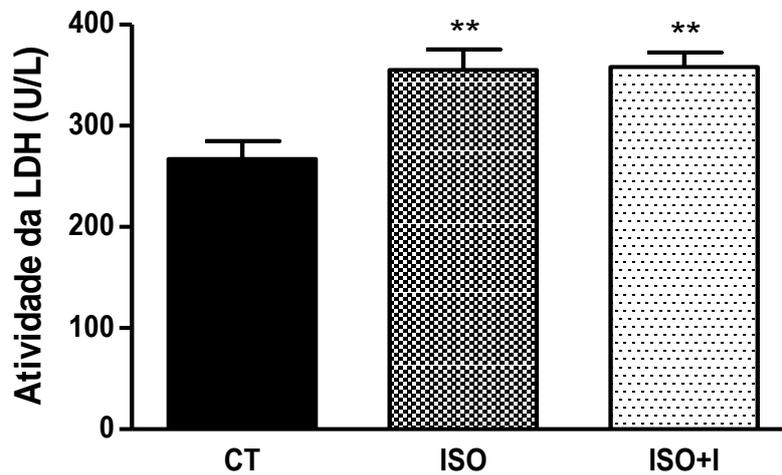
Fonte: Autor, 2013.

Nota - (A) Proteínas totais no plasma: Grupo Controle (CT, n=12), grupo Isoproterenol (ISO, n=12) e grupo Isoproterenol+Inibidor da Arginase (ISO+I, n=14). (B) Proteínas totais no ventrículo esquerdo: Grupo Controle (CT, n=7), grupo Isoproterenol (ISO, n=8) e grupo Isoproterenol+Inibidor da Arginase (ISO+I, n=10). Os dados são apresentados como Média±EPM. Para análise dos níveis de proteínas totais, tanto no plasma (12A) quanto no ventrículo esquerdo (12B), utilizou-se o teste ANOVA *One-Way* seguido do pós-teste de *Bonferroni* para múltiplas comparações (* $P < 0,05$ vs CT e *** $P < 0,0001$ vs CT).

5.2.2 Atividade da lactato desidrogenase (LDH)

O ensaio colorimétrico para dosagem da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) demonstrou que os grupos ISO e ISO+I ($355 \pm 20,4 \text{ U.L}^{-1}$ e $358 \pm 14,3 \text{ U.L}^{-1}$; $P < 0,001$ respectivamente) apresentaram um aumento significativo na atividade da LDH quando comparado ao grupo CT ($267 \pm 17,7 \text{ U.L}^{-1}$), representando, aproximadamente, uma elevação de 34% (Figura 13).

Figura 13 – Atividade da enzima lactato desidrogenase plasmática.



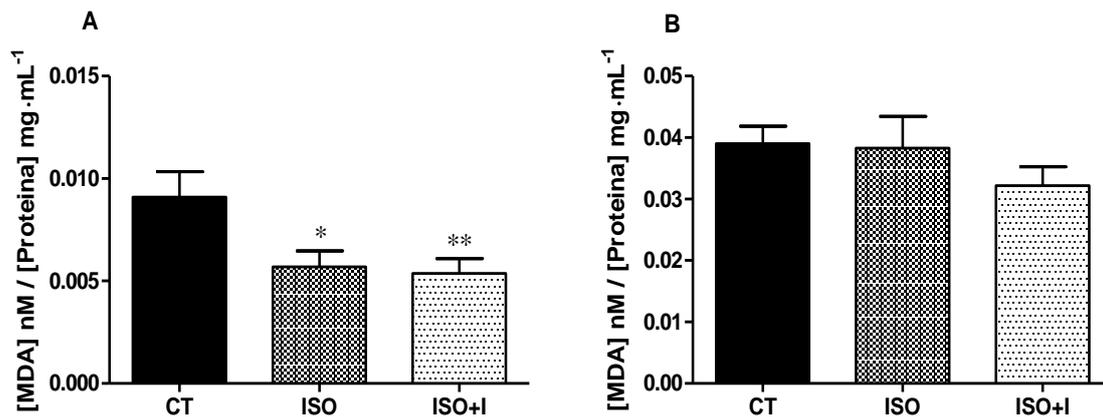
Fonte: Autor, 2013.

Nota - Grupo Controle (CT, n=12), grupo Isoproterenol (ISO, n=12) e grupo Isoproterenol+Inibidor da Arginase (ISO+I, n=14). Os dados são apresentados como Média±EPM. ANOVA *One-Way* seguido do pós-teste de *Bonferroni* para múltiplas comparações (** $P < 0,05$ vs CT).

5.2.3 Peroxidação lipídica

Os resultados obtidos revelaram uma redução significativa da peroxidação lipídica plasmática dos grupos ISO ($0,006 \pm 0,001$ [MDA] nM/[Proteína] mg.mL⁻¹; $P < 0,05$) e ISO+I ($0,005 \pm 0,001$ [MDA] nM/[Proteína] mg.mL⁻¹; $P < 0,001$) em relação ao grupo CT ($0,009 \pm 0,001$ [MDA] nM/[Proteína] mg.mL⁻¹) (Figura 14A). A variação da peroxidação lipídica plasmática observada nos grupos ISO e ISO+I em relação ao grupo CT foi de 37,4 e 41,0%, respectivamente (Tabela 2). No entanto, no ventrículo esquerdo, não se observou diferença significativa nos níveis de lipídeos peroxidados nos grupos CT, ISO e ISO+I ($0,039 \pm 0,003$ [MDA] nM/[Proteína] mg.mL⁻¹; $0,038 \pm 0,005$ [MDA] nM/[Proteína] mg.mL⁻¹ e $0,032 \pm 0,003$ [MDA] nM/[Proteína] mg.mL⁻¹, respectivamente) (Figura 14B). Embora não se tenha observado diferença significativa nos níveis de peróxidos lipídicos no ventrículo esquerdo entre os grupos, observou-se uma redução de aproximadamente 17% e 16% na peroxidação lipídica do grupo ISO+I em relação aos grupos CT e ISO, respectivamente (Tabela 2).

Figura 14 - Análise da Peroxidação Lipídica pelo método de TBARS.



Fonte: Autor, 2013.

Nota - (A) Peroxidação Lipídica no plasma: Controle (CT, n=12), Isoproterenol (ISO, n=12) e Isoproterenol+Inibidor da Arginase (ISO+I, n=14); (B) Ventrículo Esquerdo: Controle (CT, n=7), Isoproterenol (ISO, n=8) e Isoproterenol + Inibidor (ISO+I, n=10). Os dados são apresentados como Média±EPM. Teste de *Kruskal-Wallis* seguido do pós-teste de comparações múltiplas de *Dunn* (* $P < 0,05$ vs CT e ** $P < 0,001$ vs CT).

Tabela 2 - Peroxidação lipídica pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Tecidos	CT	ISO	Δ%	ISO+I	Δ%	Δ% (vs ISO)
Plasma	0,009±0,001	0,006±0,001*	-37,4	0,005±0,001**	-41	-5,9
Ventrículo Esquerdo	0,039±0,003	0,038±0,005	-1,8	0,032±0,003	-17,5	-16,0

Fonte: Autor, 2013.

Nota - Os dados são apresentados como Média±EPM. Grupo Controle (CT, n=6-12), grupo Isoproterenol (ISO, n=8-12) e grupo Isoproterenol+Inibidor da Arginase (ISO+I, n=9-14). Δ% corresponde à variação dos níveis de peroxidação lipídica em cada grupo em relação ao grupo CT. Δ% (vs ISO) representa a variação dos níveis de peroxidação lipídica do grupo ISO+I em relação ao grupo ISO. Para o ventrículo esquerdo (VE) utilizou-se ANOVA *One-Way* seguido do pós-teste de *Bonferroni* para múltiplas comparações e para o plasma utilizou-se o teste de *Kruskal-Wallis* seguido do pós-teste de *Dunn* para múltiplas comparações (*P<0,05 vs CT; **P<0,001 vs CT).

5.2.4 Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT)

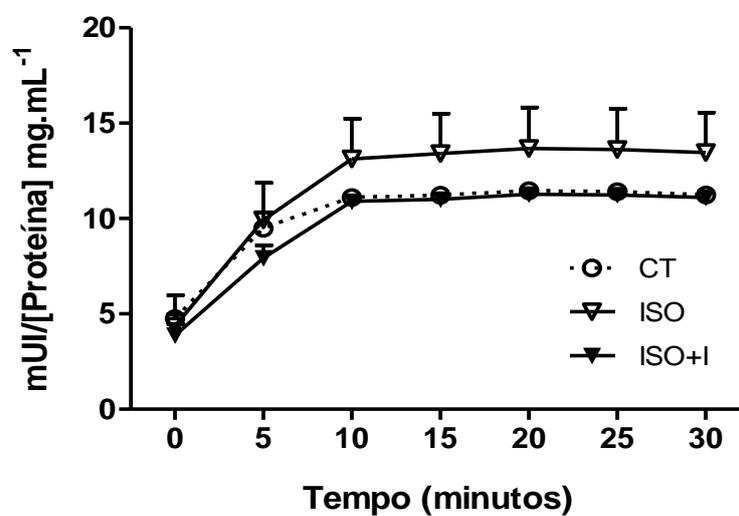
O equilíbrio redox foi avaliado pela mensuração da atividade das enzimas Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT) em homogenatos de ventrículo esquerdo.

A avaliação da atividade da SOD em função do tempo (Figura 15) mostrou que a hipertrofia cardíaca, independentemente da inibição da arginase, foi capaz de elevar a atividade, aproximadamente, 3,3 vezes, enquanto que o grupo CT apresentou um aumento de 2,8 vezes (Tabela 3) em relação ao tempo inicial de cada grupo. O aumento da atividade da SOD, em relação ao tempo inicial, nos grupos CT, ISO e ISO+I observado, corresponde a 184%, 230% e 225%, respectivamente (Tabela 3). No entanto, segundo os resultados obtidos no tempo final da cinética enzimática (30 minutos), a atividade da SOD no ventrículo esquerdo (Figura 16A) não diferiu significativamente entres os grupos CT, ISO e ISO+I (11,2±0,2 mUI/[Proteína] mg.mL⁻¹; 13,5±2,1 mUI/[Proteína] mg.mL⁻¹ e 11,1±0,3 mUI/[Proteína] mg.mL⁻¹; P>0.05, respectivamente). Embora não se observe diferença entre os grupos no tempo corresponde a 30 minutos após o início da cinética, a atividade da SOD no ventrículo esquerdo dos grupos ISO foi elevada em, aproximadamente, 1,2 vezes em relação a atividade do grupo CT (Tabela 3).

Diferentemente, os resultados da atividade da CAT mostraram que os grupos ISO (29,4±2,8 [Formaldeído] mM/[Proteína] mg.mL⁻¹; **P<0,01) e ISO+I (36,2±5,3

[Formaldeído] mM/[Proteína] mg.mL⁻¹; *P<0,05) apresentaram uma redução significativa em relação ao grupo CT (57,3±5,2 [Formaldeído] mM/[Proteína] mg.mL⁻¹) (Figura 16B, Tabela 3). A redução na atividade da CAT observada no ventrículo esquerdo dos animais dos grupos ISO e ISO+I representou uma variação de 52,5% (0,5 vezes) e 23,7% (0,7 vezes) em relação à atividade da CAT no grupo CT (Tabela 3).

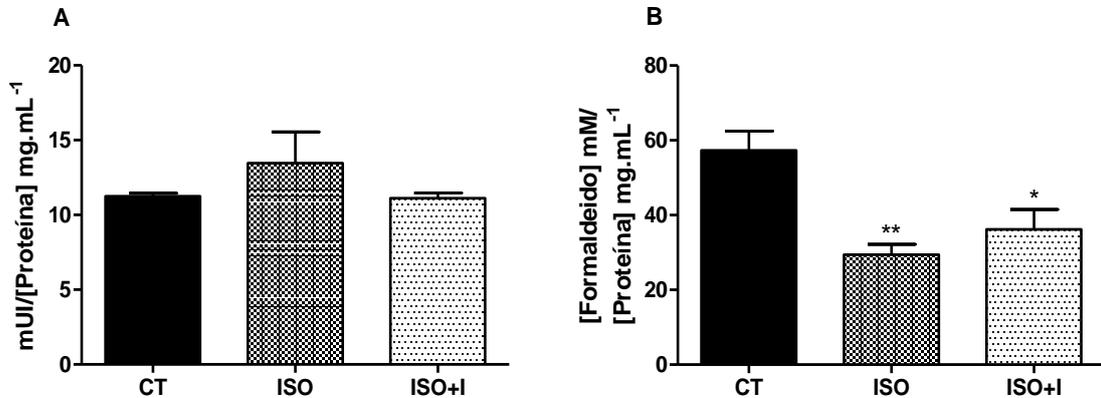
Figura 15 - Avaliação da atividade enzimática da Superóxido Dismutase em função do tempo no ventrículo esquerdo.



Fonte: Autor, 2013.

Nota - Grupo Controle (CT, n=6), grupo Isoproterenol (ISO, n=8) e grupo Isoproterenol+Inibidor da Arginase (ISO+I, n=10). Os dados são apresentados como Média±EPM. ANOVA *Two-Way* seguido do pós-teste de *Bonferroni* para múltiplas comparações (P>0,05).

Figura 16 - Atividade das enzimas Superóxido Dismutase (A) e Catalase (B) do ventrículo esquerdo.



Fonte: Autor, 2013.

Nota - Grupos Controle (CT, n=6), Isoproterenol (ISO, n=5-8) e Isoproterenol+Inibidor da Arginase (ISO+I, n=8-10). Os dados são apresentados como Média±EPM. Foi utilizado para superóxido dismutase (16A) e catalase (16B) os testes *Kruskal-Wallis* seguido do pós-teste de *Dunn* para múltiplas comparações ($P>0,05$) e ANOVA *One-Way* seguido do pós-teste de *Bonferroni* para múltiplas comparações ($^*P<0,05$ vs CT e $^{**}P<0,001$ vs CT), respectivamente.

Tabela 3 - Atividade Enzimática da Superóxido Dismutase Total (SOD) e da Catalase (CAT) no ventrículo esquerdo

Parâmetros Bioquímicos	CT	ISO	ISO+I
SOD (mUI/[Proteína] mg.mL ⁻¹)	11,2±0,2	13,5±2,1	11,1±0,3
Aumento da atividade em relação ao tempo de 30' do grupo CT	-	1,2x	0,98x
Varição Total da Atividade (%)	184,3±38,7	231,9±38,2	226,4±30,8
Aumento da atividade total em relação ao tempo zero (x)	2,8x	3,3x	3,2x
CAT ([Formaldeído] mM/[Proteína] mg.mL ⁻¹)	57,3±5,2	29,4±2,8 ^b	36,2±5,3 ^a
Varição da atividade em relação ao grupo CT (%)	-	52,5±10,1	23,7±16,3
Redução da atividade em relação ao grupo CT (x)	-	0,5x	0,7x

Fonte: Autor, 2013.

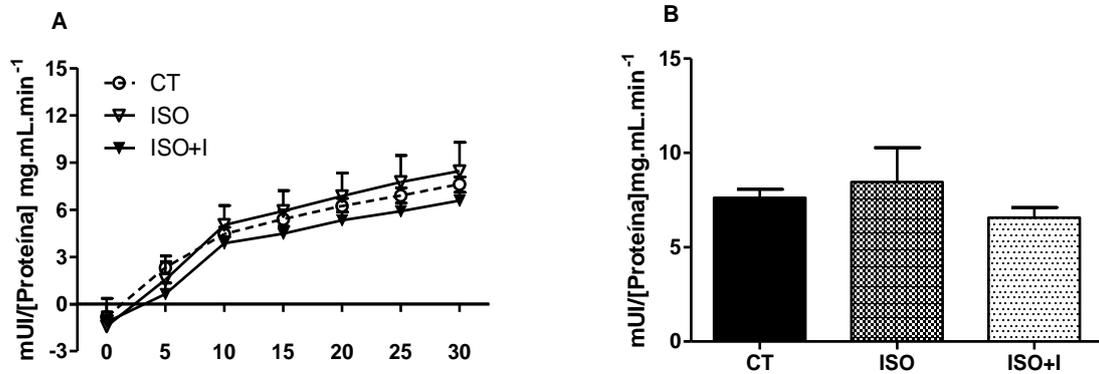
Nota - Os dados são apresentados como Média±EPM. Grupo controle (CT, n=6), grupo Isoproterenol (ISO, n=5-8) e grupo Isoproterenol+Inibidor da Arginase (ISO+I, n=8-10). Foi utilizado para superóxido dismutase (16A) e catalase (16B) os testes *Kruskal-Wallis* seguido do pós-teste de *Dunn* para múltiplas comparações ($P>0,05$) e ANOVA *One-Way* seguido do pós-teste de *Bonferroni* para múltiplas comparações ($^*P<0,05$ vs CT; $^bP<0,001$ vs CT).

Além da análise da atividade enzimática total da superóxido dismutase (SOD), também se avaliou a participação dos dois subtipos da SOD (SOD1/citosólica ou CuZn SOD; SOD2/mitocondrial ou Mn SOD) (KINNULA; CRAPO, 2003).

Segundo os resultados apresentados na tabela 3, observa-se que a SOD citosólica foi mais ativa do que a SOD mitocondrial em todos os grupos experimentais. Embora tenha se constatado que a atividade da SOD 1 apresentou um variação total maior no grupo CT em relação ao seu tempo inicial (7,5 vezes), o grupo ISO demonstrou uma maior atividade no tempo final do ensaio ($8,4 \pm 1,8$ mUI/[Proteína] mg.mL⁻¹), representando um aumento de 1,1 vezes na atividade da SOD em relação ao grupo CT ($7,6 \pm 0,4$ mUI/[Proteína] mg.mL⁻¹), sendo este efeito revertido pela inibição da arginase ($6,6 \pm 0,5$ mUI/[Proteína] mg.mL⁻¹) (Figura 17A, Tabela 3).

Ao contrário da SOD citosólica, a variação da atividade enzimática total do subtipo mitocondrial, em relação ao tempo, inicial foi menor no grupo CT (0,7 vezes) quando comparado aos grupos ISO e ISO+I (1,04 e 1,05 vezes, respectivamente) (Tabela 4). Este resultado refletiu no tempo final do ensaio, com os grupo ISO e ISO+I ($5,0 \pm 0,6$ mUI/[Proteína] mg.mL⁻¹ e $4,5 \pm 0,5$ mUI/[Proteína] mg.mL⁻¹) apresentando uma atividade mais elevada do que o grupo CT ($3,6 \pm 0,3$ mUI/[Proteína] mg.mL⁻¹) representando um aumento de 1,4 e 1,2 vezes, respectivamente (Figura 18).

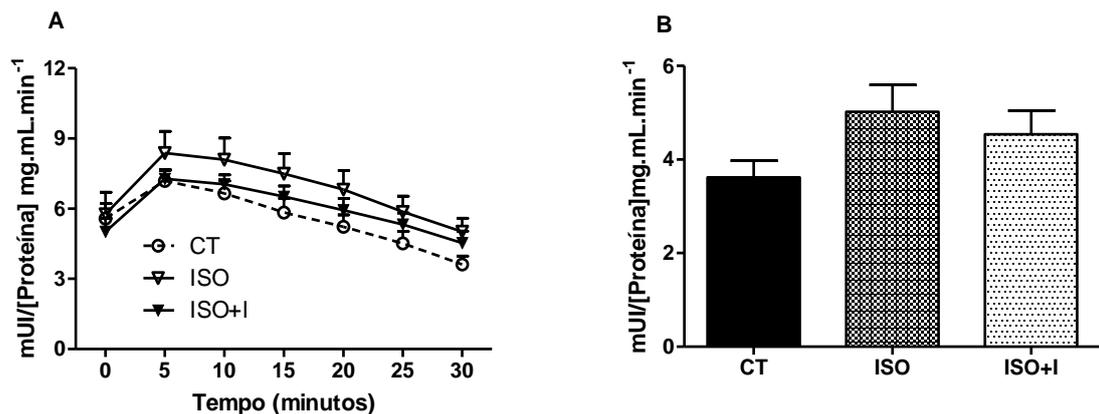
Figura 17 - Atividade enzimática do subtipo citosólico da superóxido dismutase em função do tempo (A) e no tempo de 30 minutos no ventrículo esquerdo (B).



Fonte: Autor, 2013.

Nota - Grupo Controle (CT, n=6), grupo Isoproterenol (ISO, n=8) e grupo Isoproterenol+Inibidor da Arginase (ISO+I, n=10). Os dados são apresentados como Média±EPM. Para análise em função do tempo (17A) utilizou-se o teste ANOVA *Two-Way* seguido do pós-teste de *Bonferroni* para múltiplas comparações enquanto que no tempo de 30 minutos (17B) utilizou-se o teste de *Kruskal-Wallis* seguido do pós-teste de *Dunn* para múltiplas comparações ($P>0,05$).

Figura 18 - Atividade enzimática do subtipo mitocondrial da superóxido dismutase em função do tempo (A) e no tempo de 30 minutos no ventrículo esquerdo (B).



Fonte: Autor, 2013.

Nota - Grupo Controle (CT, n=6), grupo Isoproterenol (ISO, n=8) e grupo Isoproterenol+Inibidor da Arginase (ISO+I, n=10). Os dados são apresentados como Média±EPM. Para análise em função do tempo (18A) utilizou-se o teste ANOVA *Two-Way* seguido do pós-teste de *Bonferroni* para múltiplas comparações ($P>0,05$), enquanto que no tempo de 30 minutos (18B) utilizou-se o teste ANOVA *One-Way* seguido do pós-teste de *Bonferroni* para múltiplas comparações ($P>0,05$).

Tabela 4 - Atividade Específica da Superóxido Dismutase Citosólica (SOD Cit) e Superóxido Dismutase Mitocondrial (SOD Mit) no ventrículo esquerdo

Parâmetros Bioquímicos	CT	ISO	ISO+I
SOD Cit (mUI/[Proteína] mg.mL ⁻¹) no tempo de 30'	7,6±0,4	8,4±1,8	6,6±0,5
Varição da atividade total em relação ao tempo zero	7,5x	6,1x	5,9x
Varição da atividade em relação ao tempo de 30' do grupo CT	-	1,1x	0,8x
SOD Mit (mUI/[Proteína] mg.mL ⁻¹) no tempo de 30'	3,6±0,3	5,0±0,6	4,5±0,5
Varição da atividade total em relação ao tempo zero	0,7x	1,04x	1,05x
Varição da atividade em relação ao tempo de 30' do grupo CT	-	1,4x	1,2x

Fonte: Autor, 2013.

Nota - Os dados são apresentados como Média±EPM. Grupo Controle (CT, n=6), grupo Isoproterenol (ISO, n=8) e grupo Isoproterenol+Inibidor da Arginase (ISO+I, n=10). Para análise da atividade da superóxido dismutase citosólica (SOD Cit) utilizou-se o teste de *Kruskal-Wallis* seguido do pós-teste de *Dunn* para múltiplas comparações ($P<0,05$), enquanto que para superóxido dismutase mitocondrial (SOD Mit) utilizou-se o teste ANOVA *One-Way* seguido do pós-teste de *Bonferroni* para múltiplas comparações ($P>0,05$).

5.2.5 Atividade da arginase e os níveis de nitrito

De acordo com os resultados obtidos, a mensuração colorimétrica da atividade da arginase no plasma foi reduzida tanto no grupo ISO (2,4±0,2 [Ureia] mM/[Proteína] mg.mL⁻¹; * $P<0,05$) quanto no grupo ISO+I (1,9±0,2 [Ureia] mM/[Proteína] mg.mL⁻¹; *** $P<0,0001$) quando comparado ao grupo CT (3,4±0,3 [Ureia] mM/[Proteína] mg.mL⁻¹) (Figura 19A; Tabela 5). A mensuração colorimétrica dos níveis de nitrito (NO₂⁻), através do método de Griess (FOX, 1979; TITHERADGE, 1998), foi utilizada como um indicador indireto da síntese de NO. Segundo os resultados obtidos, observou-se uma redução significativa nos níveis plasmáticos de nitrito nos animais do grupo ISO (1,7±0,3 μM.mL⁻¹) em comparação aos grupos CT e ISO+I (4,2±0,7 μM.mL⁻¹; * $P<0,05$ e 4,0±0,9 μM.mL⁻¹; # $P<0,05$, respectivamente) (Figura 19B; Tabela 5).

No ventrículo esquerdo, não houve alteração funcional da atividade da arginase (CT: 0,184±0,03 [Ureia] mM/[Proteína] mg.mL⁻¹; ISO: 0,206±0,03 [Ureia] mM/[Proteína] mg.mL⁻¹ e ISO+I: 0,142±0,02 [Ureia] mM/[Proteína] mg.mL⁻¹) (Figura 20A; Tabela 5). No entanto, os níveis de nitrito no ventrículo esquerdo foram significativamente reduzidos no grupo ISO (53,3±4,0 μM.mL⁻¹; * $P<0,05$) quando comparado ao grupo CT (76,6±7,9 μM.mL⁻¹). Em contrapartida, sugere-se que o tratamento com L-norvalina foi capaz de reverter os efeitos do isoproterenol (ISO+I; 71,1±5,4 μM.mL⁻¹) (Figura 20B; Tabela 5).

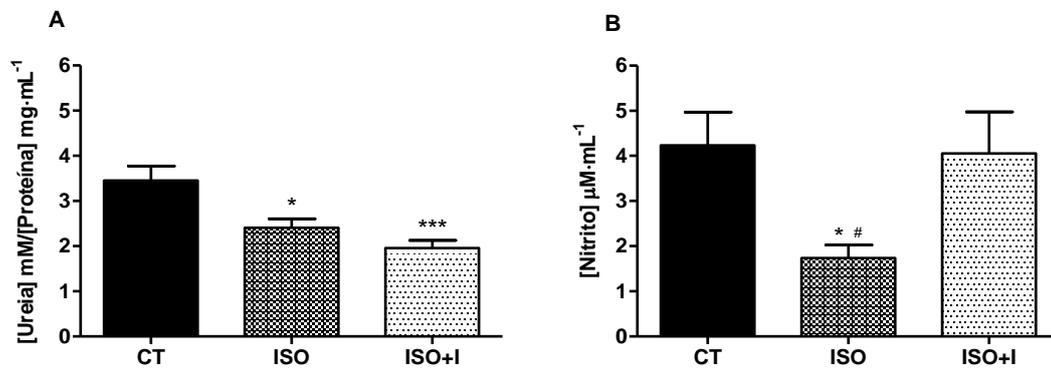
Tabela 5 - Atividade da Arginase e Concentração de Nitrito

Parâmetros Bioquímicos		CT	ISO	Δ%	ISO+I	Δ%	Δ% (vs ISO)
[Ureia] mM/[Proteína] mg·mL ⁻¹	Plasma	3,4±0,3	2,4±0,2 ^a	-24,1	1,9±0,2 ^b	-39,5	-23,9
	Ventrículo Esquerdo	0,18±0,03	0,20±0,03	11,5	0,14±0,02	-23,4	-31,2
[Nitrito] μM·mL ⁻¹	Plasma	4,2±0,7	1,7±0,3 ^a	-52,1	4,0±0,9 ^e	11,7	45,3
	Ventrículo Esquerdo	76,6±7,9	53,3±4,0	-26,3	71,1±5,4	-1,8	18,6

Fonte: Autor, 2013.

Nota - Os dados são apresentados como Média±EPM. Grupo Controle (CT, n=7-11), grupo Isoproterenol (ISO, n=8-12) e grupo Isoproterenol+Inibidor da Arginase (ISO+I, n=10-15). Δ% corresponde à variação da atividade da arginase e dos níveis de nitrito no plasma e ventrículo esquerdo em cada grupo em relação ao grupo CT. Δ% (vs ISO) representa a variação da atividade da arginase e dos níveis de nitrito no plasma e ventrículo esquerdo do grupo ISO+I em relação ao grupo ISO. ANOVA *One-Way* seguido do pós-teste de *Bonferroni* e teste de *Kruskal-Wallis* seguido do pós-teste de *Dunn* para múltiplas comparações (*P<0,05 vs CT; ^bP<0,0001 vs CT; ^eP<0,05 vs ISO).

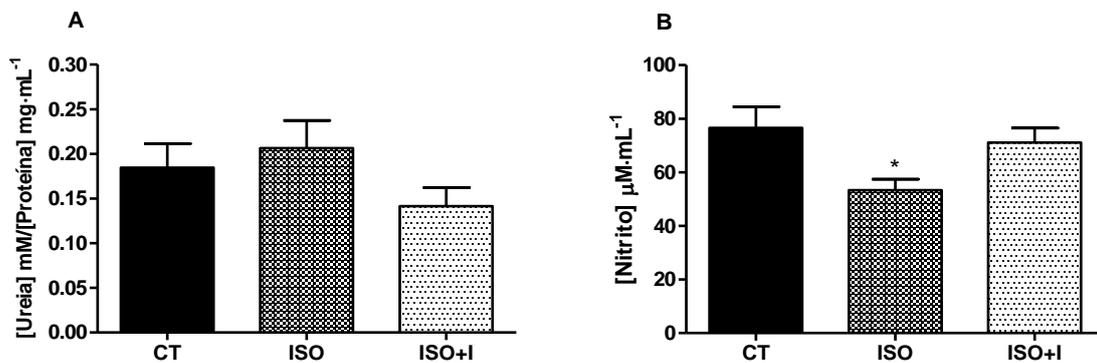
Figura 19 – Avaliação da atividade da arginase (A) e dos níveis de nitrito (B) no plasma.



Fonte: Autor, 2013.

Nota - Grupo Controle (CT, n=11), grupo Isoproterenol (ISO, n=12) e grupo Isoproterenol+Inibidor da Arginase (ISO+I, n=15). Os dados são apresentados como Média±EPM. Para análise da atividade da arginase (19A) utilizou-se o teste ANOVA *One-Way* seguido do pós-teste de *Bonferroni* para múltiplas comparações enquanto que para os níveis de nitrito (19B) utilizou-se o teste de *Kruskal-Wallis* seguido do pós-teste de *Dunn* para múltiplas comparações (*P<0,05 vs CT; ***P<0,0001 vs CT e #P<0,05 vs ISO+I).

Figura 20 – Avaliação da atividade da arginase (A) e dos níveis de nitrito (B) no ventrículo esquerdo.



Fonte: Autor, 2013.

Nota - Grupo Controle (CT, n=6-7), grupo Isoproterenol (ISO, n=7-8) e grupo Isoproterenol+Inibidor da Arginase (ISO+I, n=8-10). Os dados são apresentados como Média±EPM. Tanto para atividade da arginase (20A) quanto para os níveis de nitrito, utilizou-se o teste ANOVA *One-Way* seguido do pós-teste de *Bonferroni* para múltiplas comparações (*P<0,05 vs CT).

6 DISCUSSÃO

Os principais achados deste trabalho sugerem que a inibição da arginase com L-norvalina, administrada por via oral ($\sim 3,0 \text{ mg.Kg}^{-1}$), foi capaz de reverter os efeitos do isoproterenol nos níveis de nitrito, restaurando a produção deste tanto no plasma quanto no ventrículo esquerdo. Além do exposto, constatou-se que a atividade da arginase no plasma foi reduzida em função do tratamento com isoproterenol. Ainda se destaca que, independente da inibição da arginase, o isoproterenol reduziu a peroxidação lipídica plasmática e a atividade da catalase (CAT) no ventrículo esquerdo.

O Efeito da Inibição da Arginase na Hipertrofia

Diante dos resultados obtidos, o tratamento com isoproterenol resultou em hipertrofia cardíaca, corroborando com resultados prévios (PATEL et al., 1991; OKA; ASAI; KUDEJ, 1997; RATHORE et al., 1998). Reforçando estes resultados, Kudej e colaboradores (1997) reportaram que o tratamento crônico com isoproterenol (30 mg.Kg^{-1}) durante 13 dias promoveu um aumento de aproximadamente 27% na razão peso do ventrículo esquerdo/peso corporal bem como no peso cardíaco total em camundongos, sendo este último com uma elevação de cerca de 40% em relação ao grupo controle. Em outro trabalho, Costa e colaboradores (1997) observaram que o tratamento de ratos com isoproterenol (30 mg.Kg^{-1}), durante 8 dias, também foi capaz de promover hipertrofia cardíaca acompanhado de fibrose. Resultados semelhantes foram encontrados por Davel e coautores (2008), onde a hipertrofia atingiu índices de aproximadamente 30% em ratos tratados com isoproterenol (30 mg.Kg^{-1}) por 7 dias. Embora os protocolos experimentais utilizados pelos citados trabalhos tenham sido diferentes em relação à dosagem de isoproterenol utilizada, o tempo de tratamento e a espécie animal, obteve-se resultados similares, sugerindo que a estimulação farmacológica dos receptores β -adrenérgicos pode promover remodelamento cardíaco, em especial, a hipertrofia cardíaca.

Além das adaptações teciduais/macrosscópicas constatadas, observou-se ainda que a atividade da LDH plasmática, um marcador bioquímico de injúria miocárdica, apresentou-se elevada. Este resultado sugere uma alteração metabólica, provavelmente da via glicolítica, exercida pelo isoproterenol. Corroborando com este resultado, Kaundal & Sharma (2011)

observaram que uma única dose de isoproterenol (100 mg.Kg^{-1}) foi capaz de elevar a atividade da LDH em até 20% por um período de até 72 horas após a administração do fármaco em camundongos. Sustentando a ideia de que o agonista β -adrenérgico pode alterar o estado metabólico, principalmente o glicolítico, Zhang e colaboradores (2007) mostraram que a administração deste (5 mg.Kg^{-1}) em ratos durante 7 dias, aumentou exacerbadamente a atividade da LDH plasmática. Nesse sentido, estudos comprovam que as injúrias miocárdicas são capazes de alterar a oxidação de ácidos graxos livres para glicose na produção de ATP, de forma que a utilização da glicose cronicamente, como fonte de energia, pode indicar um prejuízo para o miocárdio (RITCHIE; DELBRIDGE, 2006; VAN BILSEN et al, 2009; YAN et al., 2009; ALTIN; SCHULZE, 2012). Dessa forma, os resultados obtidos indicam que o aumento na atividade da LDH sugere um maior aporte de piruvato para ser oxidado no ciclo de Krebs (LIONETTI; STANLEY; RECCHIA, 2011; STANLEY; RECCHIA; LOPASCHUK, 2005).

Considerando-se os resultados obtidos, sabe-se que a ação simpatomimética do isoproterenol aciona uma cascata de sinalização intracelular que resulta na elevação dos transientes de Ca^{2+} , cAMP e consequente ativação de proteínas kinase A (PKA), promovendo tanto um efeito contrátil positivo como crescimento celular (ZOU; KOMURO; YAMAZAKI, 1999; LAYLAND et al., 2004).

Contrariamente aos eventos apontados, quanto aos efeitos da inibição da arginase nos parâmetros macroscópicos e bioquímicos da hipertrofia cardíaca, os resultados, apresentados e descritos anteriormente, demonstram que o tratamento com L-norvalina ($\sim 3,0 \text{ mg.Kg}^{-1}$) não foi capaz de reverter e/ou prevenir os efeitos da estimulação β -adrenérgica. Bagnost e colaboradores (2008) obtiveram resultados semelhantes com ratos espontaneamente hipertensos submetidos a tratamento crônico com um inibidor seletivo da arginase, N^{ω} -hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA), durante 3 semanas. Neste trabalho, os autores reportaram que a inibição da arginase não foi capaz de prevenir o remodelamento vascular ou cardíaco, mas restaurou a síntese de NO .

Inicialmente, os resultados obtidos não sustentam a hipótese deste trabalho que considera a inibição da arginase uma possível ferramenta na prevenção das adaptações hipertróficas induzidas por isoproterenol. Esta hipótese é fundamentada em trabalhos que mostram um efeito protetor do NO , seja modulando o tônus vascular, seja prevenindo a

apoptose ou mediando a resposta imune (IGNARRO; BUGA, 1987; KIM; TALANIAN; BILLIAR, 1997; KOBAYASHI, 2010; RIBA et al., 2006). Dessa forma, baseado no fato de que a L-arginina é o substrato tanto para a arginase quanto para NOS sugere-se que uma maior biodisponibilidade de substrato para NOS em detrimento da atividade da arginase, o NO produzido atuaria como um agente protetor para o tecido cardíaco (BOUCHER; MOALI; TENU, 1999). Corroborando com esta hipótese, tem sido evidenciada a importância das isoformas constitutivas da NOS na manutenção do bom funcionamento cardiovascular, elevando a disponibilidade de NO (BENDALL et al., 2004; ICHINOSE et al., 2004; DAWSON et al., 2005; CASADEI, 2006).

Aliado a ideia de que uma oferta maior de substrato para NOS, um estudo realizado por Matsuoka e coautores (1996) mostrou que a oferta de L-arginina na água ($0,63 \text{ mmol.Kg}^{-1}$) para ratos espontaneamente hipertensos, durante 12 semanas, preveniu a hipertrofia cardíaca. Semelhantemente, foi demonstrado que, após 12 semanas de oferta de L-arginina na água ($0,7 \text{ mmol.Kg}^{-1}$), este aminoácido reduziu a hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga pressórica em ratos hipertensos (CHANG et al., 2005). Este achado foi corroborado por Lin e colaboradores (2008) que, por sua vez, demonstraram que a administração intraperitoneal de L-arginina (800 mg.Kg^{-1}) para ratos, durante 7 dias, simultaneamente submetidos ao tratamento diário com isoproterenol, foi capaz de prevenir os efeitos hipertróficos do agonista β -adrenérgico. Os efeitos preventivos da maior disponibilidade de L-arginina observados nestes trabalhos citados sugerem a participação da via de sinalização do NO , uma vez que houve um aumento da sua produção e da síntese de *e*NOS. Nesse sentido, Ozaki e colaboradores (2002), estudando camundongos transgênicos, apontaram que o efeito cardioprotetor do NO é mediado pela expressão da *e*NOS que, por sua vez, é capaz de amenizar os efeitos hipertróficos do isoproterenol.

Em contraste com o exposto, outros estudos não confirmam os efeitos protetores da suplementação com esse aminoácido. Nesse sentido, Bartunek e coautores (1998) ofertaram L-arginina (400 mg.Kg^{-1}) durante 6 semanas para ratos submetidos a estenose aórtica e observaram que esta intervenção não impediu a ocorrência de hipertrofia cardíaca. Corroborando com estes resultados, Lee e colaboradores (2009) observaram que a disponibilização de L-arginina (900 mg.Kg^{-1}) na água de beber durante 7 dias não diminuiu as adaptações hipertróficas, embora tenha atenuado a neurotransmissão noradrenérgica em ratos espontaneamente hipertensos. As diferenças encontradas em relação à disponibilidade de L-

arginina para diversos modelos animais que resultam em alterações hipertróficas sugerem que a concentração ofertada e o tempo podem ser determinantes para o efeito esperado, uma vez que se observa nos trabalhos citados que a prevenção exercida pela L-arginina ocorre em condições de concentração elevada e tempo de oferta maior. Sendo assim, acredita-se que, possivelmente, a inibição da arginase com L-norvalina não foi capaz de disponibilizar a quantidade adequada para um efeito cardioprotetor do NO .

Neste sentido, alguns estudos indicam que a superexpressão da arginase II exerce um efeito deletério tanto para a função vascular quanto para contratilidade miocárdica, contribuindo para o *status* hipertensivo, aterosclerótico e disfunção cardíaca em modelos animais (STEPPAN et al., 2006; DEMOUGEOT et al., 2007; SHIN; BERKOWITZ; RYOO, 2012; VAISMAN et al., 2012). Sendo assim, conforme anteriormente apontado, várias evidências indicam a existência de uma relação intrínseca entre a arginase e as isoformas NOS, competindo pelo mesmo substrato, repercutindo, principalmente, no sistema cardiovascular (BOUCHER; MOALI; TENU, 1999; WOLLERT; DREXLER, 2002; BAGNOST et al., 2010; GRÖNROS et al., 2011).

Outra possível justificativa para os resultados obtidos, onde a inibição da arginase com L-norvalina ($\sim 3,0 \text{ mg.Kg}^{-1}$), aparentemente, não exerce efeito protetor na hipertrofia cardíaca, é a possível participação do sistema renina-angiotensina (SRA) no modelo utilizado neste trabalho. Estudos anteriores reforçam esta justificativa. Estes comprovaram que o SRA está envolvido nas alterações cardíacas resultantes da hiperativação β -adrenérgica, de modo que a inibição da síntese de Ang II é capaz de prevenir os efeitos do isoproterenol (NAGANO et al., 1992; COSTA et al., 1997). Coerentemente, trabalhos que utilizaram outros modelos de indução da hipertrofia cardíaca, como estenose aórtica, reportaram a co-ativação do sistema angiotensinérgico, principalmente, através da elevação da Ang II circulante e da sensibilidade do receptores AT1 no tecido cardíaco (AKERS et al., 2000; ZHANG; OHMORI; et al., 2007; RATHORE; MUNAVVAR, 2009). Dessa forma, acredita-se que há uma importante participação do SRA nas respostas obtidas neste trabalho, uma vez que já se sabe dos efeitos deletérios exercidos pela ativação dos receptores para Ang II no tecido cardíaco. Contudo, essa hipótese precisa ser testada para que se tenha subsídios que indiquem ou não a participação desta relevante via.

Embora os resultados parciais obtidos não confirmem a hipótese inicial do trabalho, sugere-se que a atividade desta enzima ainda possa ter um papel relevante nos mecanismos da hipertrofia cardíaca, uma vez que se tenha utilizado um inibidor não específico (L-norvalina, $\sim 3,0 \text{ mg.Kg}^{-1}$) para arginase. Dessa forma, planeja-se utilizar outro fármaco que apresente uma ação tanto mais seletiva quanto maior especificidade na atividade da arginase e assim, avaliar especificamente uma possível participação desta enzima nas adaptações hipertróficas, sendo de grande interesse para o nosso grupo investigarmos tanto na condição patológica como na fisiológica da hipertrofia cardíaca.

Parâmetros Oxidativos na Hipertrofia Cardíaca

Os níveis de peroxidação lipídica são utilizados como um marcador de estresse oxidativo (HALLIWELL; CHIRICO, 1993; WALLIN et al., 1993). Embora os resultados apresentados neste trabalho não tenham demonstrado alterações na peroxidação lipídica do ventrículo esquerdo, muitos estudos tem mostrado a relação direta entre doenças cardiovasculares e a produção de radicais livres (ICHINOSE et al., 2004; KINDO et al., 2012; KISHI; HIROOKA, 2012). Corroborando com os resultados obtidos neste trabalho, em um estudo realizado por Purushothaman e coautores (2011), o objetivo principal foi identificar a sequência temporal dos eventos, distinguindo se o estresse oxidativo e as alterações metabólicas são causa ou consequência da hipertrofia cardíaca em ratos espontaneamente hipertensos. No estudo, observou-se que os níveis de lipídeos peroxidados estavam elevados antes de se observar alterações hipertróficas enquanto que a redução da oxidação de ácidos graxos foi consequência do status hipertrófico do miocárdio.

No entanto, um estudo conduzido por Zhang e colaboradores (2005), mostrou que, tanto agudo (30 minutos; $100 - 1000 \text{ ng.Kg.min}^{-1}$) quanto cronicamente (10 dias; 3 mg.Kg.dia^{-1}), o tratamento com isoproterenol, foi capaz de promover uma elevação dos níveis de peroxidação lipídica em ventrículo esquerdo de ratos. Seguindo estes achados, foi demonstrado, em camundongos, que a liberação de isoproterenol por minibombas osmóticas ($15 \text{ mg.Kg.dia}^{-1}$) durante 11 dias, resultou em elevada peroxidação lipídica no miocárdio hipertrofiado (ZHANG; et al., 2007). Sun e coautores (2009) também demonstraram que a peroxidação lipídica foi mais elevada em animais hipertensos, sendo, este efeito revertido em animais “*knockout*” para *i*NOS, sugerindo que a produção de $\cdot\text{NO}$, por este subtipo

enzimático, foi capaz de aumentar os níveis de peroxidação lipídica. Neste cenário, está bem estabelecido na literatura que há um elevado estresse oxidativo em varias doenças cardiovasculares, principalmente na insuficiência cardíaca e hipertrofia cardíaca (SEDDON; LOOI; SHAH, 2007; KINDO et al., 2012). Contudo, ainda não está claro como o desequilíbrio oxidativo ocorre no modelo de hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol utilizado neste trabalho.

A atividade enzimática das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) foi avaliada no ventrículo esquerdo. Embora não se tenha observado uma alteração significativa na atividade enzimática da SOD, demonstrou-se que a indução da hipertrofia cardíaca elevou a atividade total da enzima no tecido cardíaco. Além deste resultado, a atividade da CAT foi significativamente reduzida independentemente da inibição da arginase. Estes resultados corroboram com outros, onde se tem comprovado que a administração de isoproterenol promove redução significativa da atividade das enzimas SOD e CAT, favorecendo a elevação dos níveis de peroxidação lipídica no miocárdio de camundongos (SRIVASTAVA et al., 2007; SOJITRA; BULANI; KUMAR, 2012). Associado ao exposto, há relatos de que os mecanismos antioxidantes em miocárdio de pacientes com insuficiência cardíaca estão comprometidos, de modo que se observa uma diminuição da atividade da isoforma MnSOD, bem como da expressão da enzima (SAM; KERSTETTER; PIMENTAL, 2005). Corroborando com estes resultados, um estudo realizado por Alvarez e coautores (2008) mostrou que ratos idosos, espontaneamente hipertensos, apresentaram uma redução significativa da atividade da SOD e CAT no miocárdio, sugerindo um efeito dependente da idade, na condição de elevados níveis pressóricos. Somando-se ao exposto, clinicamente, a atividade da SOD e CAT nos eritrócitos está reduzida tanto em pacientes pré-hipertensos quanto em hipertensos, podendo eventualmente levar a aterosclerose (AMIRKHIZI; SIASSI, 2010).

Contrariamente, outros trabalhos mostram resultados controversos aos encontrados no presente trabalho. Rathore e coautores (1998) indicam que a administração de isoproterenol (300 mg.Kg⁻¹) em ratos fêmeas, durante dois dias, elevou a atividade da SOD e da CAT, acompanhado de uma redução da peroxidação lipídica no tecido cardíaco, sugerindo que o sistema antioxidante participa efetivamente para reverter os efeitos do estresse oxidativo provocado pela estimulação β -adrenérgica. Apoiando estes resultados, ratos machos

espontaneamente hipertensos apresentaram uma atividade mais elevada das enzimas SOD e glutathiona peroxidase (GPx) (CSONKA; PATAKI; KOVACS, 2000).

De acordo com a maioria dos trabalhos analisados na literatura que, por sua vez, avaliaram parâmetros oxidativos em modelos animais de hipertrofia cardíaca ou hipertensão, observou-se que não há uma única linha de investigação, e tão pouco consenso acerca das reais alterações oxidativas. Isto, possivelmente, deve-se as diferenças metodológicas de cada trabalho, uma vez que os períodos de administração e as doses do isoproterenol são diferentes (quando utilizado), além de serem utilizados tanto ratos quanto camundongos, incluindo diferenças sexuais e etárias e ainda humanos.

Regulação da Produção de Óxido Nítrico

Muitos trabalhos relacionam a síntese de $^{\bullet}\text{NO}$ e a atividade da arginase, demonstrando uma possível interação entre esta enzima e as isoformas da NOS na utilização do aminoácido L-arginina (LIM et al., 2007).

Embora a atividade enzimática da arginase não tenha apresentado alteração diante da indução da hipertrófica, observa-se que há um discreto incremento na sua função diante da ação β -adrenérgica do isoproterenol. Tal efeito pode ter sido suficientemente responsável pela diminuição nos níveis teciduais de nitrito, um indicador indireto da síntese de $^{\bullet}\text{NO}$, uma vez que a inibição da arginase com L-norvalina foi capaz de restaurar os níveis de nitrito no tecido cardíaco. Estes resultados sugerem que a competição entre a arginase e as diversas isoformas da NOS pode ter um papel relevante para as adaptações miocárdicas frente a estímulos hipertróficos.

Nesse sentido, um importante trabalho realizado por Lin e colaboradores (2008) comprovou que o aumento na biodisponibilidade de L-arginina foi capaz de reverter os efeitos adversos do isoproterenol no modelo de hipertrofia cardíaca, restaurando a síntese proteica de eNOS e os níveis de nitrito circulante, indicando, assim, um aumento da produção de $^{\bullet}\text{NO}$. Resultado semelhante foi encontrado por Chang e coautores (2005) na hipertrofia cardíaca de animais hipertensos, onde a oferta de L-arginina reduziu o grau de hipertrofia e fibrose miocárdica. Reforçando o papel da biodisponibilidade de substrato para NOS (cNOS) na

hipertrofia cardíaca, foi mostrado em outro estudo que, no modelo de estenose aórtica, a oferta diária de L-arginina (400 mg.Kg^{-1}) durante 6 semanas modulou a resposta contrátil do miocárdio hipertrofiado ao isoproterenol e elevou as concentrações intracelulares de cGMP. Em contraste, não impediu o remodelamento miocárdico (BARTUNEK et al., 1998). Este resultado é reforçado por dois trabalhos realizados por Bagnost e colaboradores (2008, 2010), os quais demonstraram que o nor-NOHA (40 mg.Kg^{-1}), um inibidor seletivo da arginase, não foi capaz de impedir o remodelamento miocárdico induzido por hipertensão, mas restabeleceu a síntese de NO .

Corroborando com os achados citados, um trabalho executado por Jung e coautores (2006) mostrou que apenas a arginase I (AI) é sintetizada em cardiomiócitos de felinos e que esta é reduzida em modelo de hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga pressórica, modulando os parâmetros contráteis do miocárdio. Em contrapartida, em condição de isquemia e reperfusão cardíaca, a AI é expressa agudamente em altos níveis no miocárdio de ratos, reduzindo significativamente a biodisponibilidade de NO e contribuindo para o aumento da área isquêmica (JUNG et al., 2010). No entanto, não apenas a AI é expressa em cardiomiócitos, mas a arginase II (AII) também foi identificada em miócitos infectados com *Trypanosoma cruzi*, parasita responsável pela doença de Chagas, sendo esta enzima de grande importância para a sobrevivência do parasita (AOKI et al., 2004; CUERVO et al., 2008). Tais evidências, são reforçadas por estudos que demonstram a importância do metabolismo das poliaminas nas adaptações cardíacas, de modo que há um considerável aumento na atividade da ornitina descarboxilase (ODC) e nas concentrações de putrescina, spermidina e spermina, associada a uma elevação da atividade da arginase na hipertrofia cardíaca (SHANTZ; FEITH; PEGG, 2001; GIORDANO et al., 2012).

Mesmo se percebendo uma diferença nas condições citadas, pode se observar que a arginase modula a via de sinalização do NO no tecido cardíaco. Nesse sentido, foi demonstrado que a arginase e a *i*NOS são expressas a altas concentrações na hipertrofia e insuficiência cardíaca, enquanto a *e*NOS é reduzida, limitando a biodisponibilidade de NO (DREXLER et al., 1998; HEUSCH et al., 2010). No entanto, mesmo sendo expressa em maiores concentrações, a *i*NOS não parece ser relevante para a hipertrofia cardíaca, uma vez que a deleção do gene responsável pela síntese da enzima não foi capaz de impedir os efeitos hipertróficos do isoproterenol (CHA et al., 2009). Em contrapartida, a deleção da *e*NOS comprovou que esta tem um importante papel nas adaptações hipertróficas, potencializando

os efeitos da sobrecarga de pressão sobre o espessamento da parede ventricular esquerda, sugerindo que a produção constitutiva do NO pode ser benéfico para o coração, atenuando as consequências da estimulação β -adrenérgica no tecido cardíaco (HARE et al., 1998; RUETTEN et al., 2005).

Diante do exposto, entendendo-se que a disponibilidade de L-arginina constitui um fator importante para modulação da produção de NO a partir das isoformas cNOS, a restauração da produção de NO tecidual, observada diante da inibição da arginase com L-norvalina ($\sim 3,0 \text{ mg.Kg}^{-1}$), especula-se que o aumento no aporte de L-arginina pode está sendo utilizada pela *i*NOS, uma vez que a L-norvalina não foi capaz de inibir os efeitos hipertróficos do isoproterenol observados neste trabalho. Com o objetivo de se testar esta possibilidade, é intenção da nossa parte realizarmos estudos acerca da arginase com inibidores de maior especificidade do que a L-norvalina, tal como o nor-NOHA, para avaliarmos o papel da arginase, bem como da NOS, nas adaptações promovidas pela hipertrofia cardíaca. Além da arginase, também se faz necessário entender melhor a participação das isoformas da NOS, uma vez que ambas competem pelo mesmo substrato (BOUCHER et al., 1994; DAGHIGH; FUKUTO; ASH, 1994).

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que:

- 1- A inibição da arginase com L-norvalina não preveniu os efeitos hipertróficos do isoproterenol;
- 2- Histologicamente, se observou que a inibição da arginase com L-norvalina não foi capaz de prevenir a hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol;
- 3- O isoproterenol elevou a atividade enzimática da lactato desidrogenase, independente da inibição da arginase com L-norvalina;
- 4- O isoproterenol, independentemente da inibição da arginase, reduziu a peroxidação lipídica plasmática. No entanto, no ventrículo esquerdo não foi alterada;
- 5- Embora não se tenha observado uma diferença significativa na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no ventrículo esquerdo, o tratamento com isoproterenol elevou a atividade da SOD;
- 6- A atividade total da SOD não foi revertida pela inibição da arginase com L-norvalina;
- 7- Interessantemente, observou-se que o isoproterenol reduziu a atividade da catalase (CAT) no ventrículo esquerdo, independente da inibição da arginase;
- 8- A atividade da arginase no plasma foi reduzida diante do tratamento com isoproterenol. No entanto, não se observou o mesmo resultado no ventrículo esquerdo;
- 9- O isoproterenol reduziu significativamente os níveis de nitrito, tanto no plasma quanto no ventrículo esquerdo, sendo revertido pela inibição da arginase.

8 PERSPECTIVAS

O presente trabalho deixou grandes perspectivas para próximas investigações. A primeira, já citada anteriormente, é a necessidade de se responder se teríamos um resultado diferente diante da utilização de um inibidor de maior seletividade/especificidade para arginase, como Nor-NOHA. Aliada a esta pergunta, também se faz necessário saber qual a participação das diferentes isoformas da NOS na condição de inibição da arginase. Ainda será realizado processamento histológico do tecido cardíaco obtido para avaliar macroscopicamente as possíveis alterações resultantes do delineamento experimental executado.

Além das condições citadas acima, pretende-se ainda reproduzir os questionamentos feitos neste trabalho com modelo de hipertrofia cardíaca fisiológica, induzida pelo exercício físico. Neste caso, pouco se sabe sobre a participação da arginase e das isoformas da NOS na modulação da síntese de NO .

Sendo assim, espera-se trazer contribuir com respostas para as questões levantadas nos dias vindouros, sempre prezando pelas boas práticas científicas para produção de conhecimento.

REFERÊNCIAS

- AGABITI-ROSEI, E.; MUIESAN, M. L.; SALVETTI, M. Evaluation of subclinical target organ damage for risk assessment and treatment in the hypertensive patients: left ventricular hypertrophy. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17, p. S104–8, abr. 2006.
- AHN, J. et al. Cardiac structural and functional responses to salt loading in SHR. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 287, n. 2, p. 767–772, ago. 2004.
- AKERS, W. S. et al. Renin-angiotensin system and sympathetic nervous system in cardiac pressure-overload hypertrophy. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 279, n. 6, p. H2797–806, dez. 2000.
- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **The Biochemical Journal**, v. 357, p. 593–615, 1 ago. 2001.
- ALLARD, M. F. et al. AMPK and metabolic adaptation by the heart to pressure overload. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 292, n. 1, p. H140–8, jan. 2007.
- ALLENDER, S. et al. **European Cardiovascular Disease Statistics. 2008 Edition**. p. 1–112, 2008.
- ALTIN, S. E.; SCHULZE, P. C. Metabolism of the right ventricle and the response to hypertrophy and failure. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 55, n. 2, p. 229–33, set. 2012.
- ÁLVAREZ, M.; CALDIZ, C. Is cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats the cause or the consequence of oxidative stress? **Hypertension Research**, v. 31, n. 7, p. 1465–1476, mar. 2008.
- AMIRKHIZI, F.; SIASSI, F. Assessment of antioxidant enzyme activities in erythrocytes of pre-hypertensive and hypertensive women. **Journal of Research in Medical Sciences**, v. 15, n. 10, p. 270–278, set. 2010.

- ANDREW, P. J.; MAYER, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. **Cardiovascular Research**, v. 43, n. 3, p. 521–31, 15 ago. 1999.
- AOKI, M. P. et al. Cruzipain, a major Trypanosoma cruzi antigen, promotes arginase-2 expression and survival of neonatal mouse cardiomyocytes. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 286, n. 2, p. C206–12, fev. 2004.
- AOYAGI, M. et al. Structural basis for endothelial nitric oxide synthase binding to calmodulin. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 4, p. 766–775, fev. 2003.
- ARMUTCU, F. et al. Oxidative stress markers, C-reactive protein and heat shock protein 70 levels in subjects with metabolic syndrome. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 46, n. 6, p. 785–90, jan. 2008.
- ASH, D. E. Structure and function of arginases. **The Journal of Nutrition**, v. 134, p. 2760–2764, out. 2004.
- AVILA, M. D.; MORGAN, J. P.; YAN, X. Genetically modified mouse models used for studying the role of the AT2 receptor in cardiac hypertrophy and heart failure. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p. 1–5, jan. 2011.
- BADENHORST, D. et al. Beta-adrenergic activation initiates chamber dilatation in concentric hypertrophy. **Hypertension**, v. 41, n. 3, p. 499–504, mar. 2003.
- BAGGIO, R. et al. Inhibition of Manganese-Arginase by Borate Leads to the Design of a Transition State Analogue Inhibitor, 2(S)-Amino-6-borono-hexanoic Acid. **Journal American Chemical Society**, v. 2, n. 8, p. 8107–8108, abr. 1997.
- BAGGIO, R.; EMIG, F.; CHRISTIANSON, D. Biochemical and functional profile of a newly developed potent and isozyme-selective arginase inhibitor. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 290, n. 3, p. 1409–16, set. 1999.
- BAGNOST, T. et al. Treatment with the arginase inhibitor N(omega)-hydroxy-nor-L-arginine improves vascular function and lowers blood pressure in adult spontaneously hypertensive rat. **Journal of Hypertension**, v. 26, n. 6, p. 1110–8, jun. 2008.

- BAGNOST, T. et al. Cardiovascular effects of arginase inhibition in spontaneously hypertensive rats with fully developed hypertension. **Cardiovascular Research**, v. 87, n. 3, p. 569–77, 1 ago. 2010.
- BAKER, J. G. The selectivity of beta-adrenoceptor agonists at human beta1-, beta2- and beta3-adrenoceptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 5, p. 1048–61, jul. 2010.
- BANSAL, V.; OCHOA, J. B. Arginine availability, arginase, and the immune response. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 6, n. 2, p. 223–8, mar. 2003.
- BARRY, S. P.; DAVIDSON, S. M.; TOWNSEND, P. A. Molecular regulation of cardiac hypertrophy. **The International Journal of Biochemistry e Cell Biology**, v. 40, p. 2023–2039, fev. 2008.
- BARTUNEK, J. et al. Chronic L-arginine treatment increases cardiac cyclic guanosine 5'-monophosphate in rats with aortic stenosis: effects on left ventricular mass and beta-adrenergic contractile reserve. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 32, p. 528–535, ago. 1998.
- BASCUR, L. et al. Molecular forms of human-liver arginase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 128, p. 149–154, jan. 1966.
- BATES, T. E. et al. Mitochondrial nitric oxide synthase: a ubiquitous regulator of oxidative phosphorylation? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 218, n. 1, p. 40–4, 5 jan. 1996.
- BATES, T.; LOESCH, A. Immunocytochemical evidence for a mitochondrially located nitric oxide synthase in brain and liver. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 213, n. 3, p. 896–900, ago. 1995.
- BENDALL, J. K. et al. Role of myocardial neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide in beta-adrenergic hyporesponsiveness after myocardial infarction-induced heart failure in rat. **Circulation**, v. 110, n. 16, p. 2368–75, 19 out. 2004.

- BERG, T. Increased counteracting effect of eNOS and nNOS on an alpha1-adrenergic rise in total peripheral vascular resistance in spontaneous hypertensive rats. **Cardiovascular Research**, v. 67, n. 4, p. 736–44, 1 set. 2005.
- BERKOWITZ, D. E. et al. Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels. **Circulation**, v. 108, n. 16, p. 2000–6, 21 out. 2003.
- BERNARDO, B. C. et al. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 128, n. 1, p. 191–227, out. 2010.
- BERS, D.; DESPA, S. Na/K-ATPase—an integral player in the adrenergic fight-or-flight response. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 19, n. 4, p. 111–118, mai. 2009.
- BIRSCHMANN, I.; WALTER, U. Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. **Acta Biochimica Polonica**, v. 51, n. 2, p. 397–404, mai. 2004.
- BOUCHER, J. L.; MOALI, C.; TENU, J. P. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, v. 55, n. 8-9, p. 1015–28, jul. 1999.
- BOUCHER, J.-L. et al. N-hydroxy-L-arginine, an intermediate in the L-arginine to nitric oxide pathway, is a strong inhibitor of liver of liver and macrophage arginase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 203, n. 3, p. 1614–1621, set. 1994.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 7 maio 1976.
- BREDT, D. S. Nitric oxide signaling specificity – the heart of the problem. **Journal of Cell Science**, v. 116, p. 09–15, jan. 2003.

BREGAGNOLLO, E.; OKOSHI, K. Efeitos da inibição prolongada da enzima de conversão da angiotensina sobre as características morfológicas e funcionais da hipertrofia ventricular esquerda. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 84, n. 3, p. 225–232, mar 2005.

BRITISH HEART FOUNDATION. **Coronary heart disease statistics: a compendium of health statistics**. p.01-210, nov. 2012.

BRODDE, O. E.; MICHEL, M. C. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. **Pharmacological reviews**, v. 51, n. 4, p. 651–90, dez. 1999.

BRODDE, O.-E.; BRUCK, H.; LEINEWEBER, K. Cardiac Adrenoceptors: Physiological and Pathophysiological Relevance. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 100, n. 5, p. 323–337, abr. 2006.

BROOKES, P. S. Mitochondrial nitric oxide synthase. **Mitochondrion**, v. 3, n. 4, p. 187–204, mar. 2004.

BROWN, G. Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase. **FEBS letters**, v. 369, p. 136–139, ago. 1995.

BURKE, S. L. et al. Levels of renal and extrarenal sympathetic drive in angiotensin II-induced hypertension. **Hypertension**, v. 51, n. 4, p. 878–83, abr. 2008.

BURNS, J. et al. Relationship between central sympathetic drive and magnetic resonance imaging-determined left ventricular mass in essential hypertension. **Circulation**, v. 115, n. 15, p. 1999–2005, 17 abr. 2007.

BYRNE, J. A et al. Contrasting roles of NADPH oxidase isoforms in pressure-overload versus angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. **Circulation Research**, v. 93, n. 9, p. 802–5, 31 out. 2003.

CABELLO, J.; PRAJOUX, V.; PLAZA, M. Immunodiffusion studies on human liver and erythrocyte arginases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 105, n. 3, p. 583–593, 1965.

CAMA, E. et al. Human arginase II: crystal structure and physiological role in male and female sexual arousal. **Biochemistry**, p. 8445–8451, jul. 2003.

CAO, L. et al. Regulation of activity of nuclear factor-kappaB and activator protein-1 by nitric oxide, surfactant and glucocorticoids in alveolar macrophages from piglets with acute lung injury. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 24, n. 12, p. 1316–23, dez. 2003.

CAREY, R. M.; SIRAGY, H. M. Newly Recognized Components of the Renin-Angiotensin System: Potential Roles in Cardiovascular and Renal Regulation. **Endocrine Reviews**, v. 24, n. 3, p. 261–271, 1 jun. 2003.

CARREÑO, J. E. et al. Cardiac Hypertrophy: Molecular and Cellular Events. **Revista Española de Cardiología**, v. 59, n. 5, p. 473–86, mai. 2006.

CASADEI, B. The emerging role of neuronal nitric oxide synthase in the regulation of myocardial function. **Experimental Physiology**, v. 91, n. 6, p. 943–55, nov. 2006.

CHA, H.-N. et al. Deficiency of iNOS Does Not Prevent Isoproterenol-induced Cardiac Hypertrophy in Mice. **The Korean Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 13, n. 3, p. 153–9, jun. 2009.

CHANDRA, S. et al. Oxidative species increase arginase activity in endothelial cells through the RhoA/Rho kinase pathway. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 2, p. 506–19, jan. 2012.

CHANG, H. et al. Reduction of Ventricular Hypertrophy and Fibrosis in Spontaneously Hypertensive Rats by L-arginine. **Chinese Journal of Physiology**, v. 48, n. 1, p. 15–22, mar. 2005.

CHARKOUDIAN, N. et al. Balance between cardiac output and sympathetic nerve activity in resting humans: role in arterial pressure regulation. **Journal Physiology**, v. 568, n. 1, p. 315–321, jul. 2005.

CHATURVEDI, R. et al. Polyamines Impair Immunity to Helicobacter pylori by Inhibiting L-Arginine Uptake Required for Nitric Oxide Production. **Gastroenterology**, v. 139, n. 5, p. 1686–1698, nov. 2010.

CHENG, H. et al. Improvement of endothelial nitric oxide synthase activity retards the progression of diabetic nephropathy in db/db mice. **Kidney international**, v. 82, n. 11, p. 1176–83, dez. 2012.

CHOATE, J. K. et al. Sympathetic control of heart rate in nNOS knockout mice. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 294, p. 354–361, jan. 2008.

CHOI, B.-M. et al. Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. **Journal of biochemistry and molecular biology**, v. 35, n. 1, p. 116–26, 31 jan. 2002.

CHOI, Y. H.; PARK, H. Y. Anti-inflammatory effects of spermidine in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells. **Journal of biomedical science**, v. 19, p. 31, jan. 2012.

CHRISTIANSON, D. W. Arginase: structure, mechanism, and physiological role in male and female sexual arousal. **Accounts of chemical research**, v. 38, n. 3, p. 191–201, mar. 2005.

CHUNG, M.-W.; TSOUTSMAN, T.; SEMSARIAN, C. Hypertrophic cardiomyopathy: from gene defect to clinical disease. **Cell research**, v. 13, n. 1, p. 9–20, fev. 2003.

CICOGNA, A. C. et al. Volume overload influence on hypertrophied myocardium function. **Japanese Heart Journal**, v. 43, n. 6, p. 689–95, nov. 2002.

CODOÑER-FRANCH, P. et al. Polyamines are increased in obese children and are related to markers of oxidative/nitrosative stress and angiogenesis. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 96, n. 9, p. 2821–5, set. 2011.

COLLELUORI, D. M.; MORRIS, S. M.; ASH, D. E. Expression, purification, and characterization of human type II arginase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 389, n. 1, p. 135–143, mai. 2001.

COLLINS, H. E.; RODRIGO, G. C. Inotropic response of cardiac ventricular myocytes to beta-adrenergic stimulation with isoproterenol exhibits diurnal variation: involvement of nitric oxide. **Circulation research**, v. 106, n. 7, p. 1244–52, 16 abr. 2010.

CONESKI, P.; SCHOENFISCH, M. Competitive Formation of N-Diazeniumdiolates and N-Nitrosamines via Anaerobic Reactions of Polyamines with Nitric Oxide. **Organic letters**, v. 11, n. 23, p. 5462–5465, dez. 2009.

COSTA, E. A. S. et al. Enalaprilato na prevenção da hipertrofia ventricular esquerda induzida pelo isoproterenol. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 69, n. 1, p. 35–39, jul. 1997.

COSTANZO, L. DI et al. Crystal structure of human arginase I at 1.29-Å resolution and exploration of inhibition in the immune response. **PNAS**, v. 102, n. 37, p. 13058–13063, set. 2005.

COSTANZO, L. DI et al. Inhibition of human arginase I by substrate and product analogues. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 496, n. 2, p. 101–108, fev. 2010.

CROMBEZ, E. A.; CEDERBAUM, S. D. Hyperargininemia due to liver arginase deficiency. **Molecular genetics and metabolism**, v. 84, n. 3, p. 243–51, mar. 2005.

CSONKA, C.; PATAKI, T.; KOVACS, P. Effects of oxidative stress on the expression of antioxidative defense enzymes in spontaneously hypertensive rat hearts. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n. 7, p. 612–619, out. 2000.

CUERVO, H. et al. Inducible nitric oxide synthase and arginase expression in heart tissue during acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice: arginase I is expressed in infiltrating CD68+ macrophages. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 12, p. 1772–82, 15 jun. 2008.

DAGHIGH, F.; FUKUTO, J. M.; ASH, D. E. Inhibition of rat liver arginase by intermediate in NO biosynthesis, N-hidroxy-L-arginine: implications for the regulation of nitric oxide biosynthesis by arginase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 202, n. 1, p. 174–180, jul. 1994.

DAVEL, A. P. C. et al. Effects of isoproterenol treatment for 7 days on inflammatory mediators in the rat aorta. **American Journal Physiology. Heart Circulation Physiology**, v. 295, p. 211–219, maio. 2008.

DAWSON, D. et al. nNOS gene deletion exacerbates pathological left ventricular remodeling and functional deterioration after myocardial infarction. **Circulation**, v. 112, n. 24, p. 3729–37, 13 dez. 2005.

DELPY, E.; COSTE, H.; GOUVILLE, A C. Effects of cyclic GMP elevation on isoprenaline-induced increase in cyclic AMP and relaxation in rat aortic smooth muscle: role of phosphodiesterase 3. **British Journal of Pharmacology**, v. 119, n. 3, p. 471–8, out. 1996.

DEMIRCAN, N.; GUREL, A.; ARMUTCU, F. The evaluation of serum cystatin C, malondialdehyde, and total antioxidant status in patients with metabolic syndrome. **Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 14, n. 2, p. 97–101, fev. 2008.

DEMOUGEOT, C. et al. Arginase inhibition reduces endothelial dysfunction and blood pressure rising in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Hypertension**, v. 23, n. 5, p. 971–8, maio. 2005.

DEMOUGEOT, C. et al. Time course of vascular arginase expression and activity in spontaneously hypertensive rats. **Life Sciences**, v. 80, n. 12, p. 1128–34, 27 fev. 2007.

DENNINGER, J. W.; MARLETTA, M. A. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1411, n. 2-3, p. 334–50, 5 maio. 1999.

DOWLING, D.; COSTANZO, L. DI. Evolution of the arginase fold and functional diversity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 13, p. 2039–2055, jul. 2009.

DREXLER, H. et al. Expression, activity and functional significance of inducible nitric oxide synthase in the failing human heart. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 32, n. 4, p. 955–63, out. 1998.

DURANTE, W.; JOHNSON, F. K.; JOHNSON, R. A. Arginase: a critical regulation of nitric oxide synthesis and vascular function. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, n. 9, p. 906–911, set. 2007.

EFENDIEV, R.; DESSAUER, C. W. AKAPs and adenylyl cyclase in cardiovascular physiology and pathology. **Journal Cardiovascular Pharmacology**, v. 58, n. 4, p. 339–344, out. 2011.

- EVERED, M.; ROBINSON, M. The renin—angiotensin system in drinking and cardiovascular responses to isoprenaline in the rat. **The Journal of Physiology**, v. 316, p. 357–367, jul. 1981.
- FARACI, F.; SOBEY, C. Role of potassium channels in regulation of cerebral vascular tone. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 18, p. 1047–1063, out. 1998.
- FEIL, R. et al. Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice. **Circulation Research**, v. 93, n. 10, p. 907–16, 14 nov. 2003.
- FERGUSON, S. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 1, p. 1–24, mar. 2001.
- FIFER, M. A.; VLAHAKES, G. J. Management of symptoms in hypertrophic cardiomyopathy. **Circulation**, v. 117, n. 3, p. 429–39, 22 jan. 2008.
- FILHO, R. F.; ZILLBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica do Brasil**, v. 46, n. 3, p. 265–271, jul. 2000.
- FILHO, R. S.; MARTINEZ, T. Fatores de risco para doença cardiovascular: velhos e novos fatores de risco, velhos problemas! **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, p. 212–214, jun. 2002.
- FISHER, J. P.; FADEL, P. J. Therapeutic strategies for targeting excessive central sympathetic activation in human hypertension. **Experimental Physiology**, v. 95, n. 5, p. 572–80, maio. 2010.
- FLEMING, I. Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 459, p. 793–806, maio. 2010.
- FOX, J. B. J. Kinetics and mechanisms of the Griess reaction. **Analytical Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 1493–1502, ago. 1979.
- FRIEBE, A.; KOESLING, D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. **Circulation Research**, v. 93, n. 2, p. 96–105, 25 jul. 2003.

FURCHGOTT, R. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. **Bioscience Reports**, v. 19, n. 4, p. 235–251, ago. 1999.

FURCHGOTT, R.; ZAWADZKI, J. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373–376, nov. 1980.

FURNIVAL, C.; LINDEN, R.; SNOW, H. The inotropic and chronotropic effects of catecholamines on the dog heart. **The Journal of Physiology**, v. 214, p. 15–28, abr. 1971.

FYHRQUIST, F.; SAIJONMAA, O. Renin-angiotensin system revisited. **Journal of Internal Medicine**, v. 264, n. 3, p. 224–36, set. 2008.

GARCIA, J.; INCERPI, E. Fatores e mecanismos envolvidos na hipertrofia ventricular esquerda eo papel anti-hipertrófico do óxido nítrico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 90, n. 6, p. 443–450, jun. 2008.

GEALEKMAN, O.; ABASSI, Z.; RUBINSTEIN, I. Role of myocardial inducible nitric oxide synthase in contractile dysfunction and beta-adrenergic hyporesponsiveness in rats with experimental volume-overload heart failure. **Circulation**, v. 1, p. 236–243, jan. 2002.

GHAFOURIFAR, P. et al. Mitochondrial Nitric-oxide Synthase Stimulation Causes Cytochrome c Release from Isolated Mitochondria. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 44, p. 31185–31188, out. 1999.

GHAFOURIFAR, P.; RICHTER, C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. **FEBS Letters**, v. 418, n. 3, p. 291–296, dez. 1997.

GIORDANO, E. et al. Overexpression of ornithine decarboxylase decreases ventricular systolic function during induction of cardiac hypertrophy. **Amino Acids**, v. 42, n. 2-3, p. 507–18, fev. 2012.

GIOTTI, A.; LEDDA, F.; MANNAIONI, P. Effects of noradrenaline and isoprenaline, in combination with alfa and beta-receptor blocking substances, on the action potential of cardiac Purkinje fibres. **The Journal of Physiology**, v. 229, p. 99–113, fev. 1973.

GIRALDEZ, R. R.; ZWEIER, J. L. An improved assay for measurement of nitric oxide synthase activity in biological tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 261, p. 29–35, 15 jul. 1998.

GO, A. S. et al. Heart Disease and Stroke Statistics--2013 Update A Report From the American Heart Association. **Circulation**, v. 127, p. 241, 12 dez. 2013.

GOAILLARD, J. M.; VINCENT, P. V; FISCHMEISTER, R. Simultaneous measurements of intracellular cAMP and L-type Ca²⁺ current in single frog ventricular myocytes. **The Journal of Physiology**, v. 530, p. 79–91, 1 jan. 2001.

GOLDSTEIN, S.; ALI, A. S.; SABBAH, H. Ventricular Remodeling: mechanisms and Prevention. **Cardiology Clinics**, p. 623–632, nov. 1998.

GRASSI, G. et al. Sympathetic and baroreflex cardiovascular control in hypertension-related left ventricular dysfunction. **Hypertension**, v. 53, n. 2, p. 205–209, fev. 2009.

GRASSI, G.; SERAVALLE, G.; QUARTI-TREVANO, F. The “neuroadrenergic hypothesis” in hypertension: current evidence. **Experimental Physiology**, v. 95, n. 5, p. 581–6, maio. 2010.

GRODY, W. W. et al. Differential expression of the two human arginase genes in hyperargininemia - Enzymatic, pathological and molecular analysis. **Journal Clinical of Investigation**, v. 83, p. 602–609, fev. 1989.

GRÖNROS, J. et al. Arginase inhibition restores in vivo coronary microvascular function in type 2 diabetic rats. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 300, n. 4, p. H1174–81, abr. 2011.

GUNNETT, C. A. et al. NO-Dependent Vasorelaxation Is Impaired After Gene Transfer of Inducible NO-Synthase. **Arteriosclerosis, Trombosis and Vascular Biology**, p. 1281–1287, ago. 2001.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, p. 715–725, maio. 1993.

HAMMOND, J.; BALLIGAND, J.-L. Nitric oxide synthase and cyclic GMP signaling in cardiac myocytes: from contractility to remodeling. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 52, n. 2, p. 330–40, fev. 2012.

HARE, J. M. et al. Increased sensitivity to nitric oxide synthase inhibition in patients with heart failure: potentiation of beta-adrenergic inotropic responsiveness. **Circulation**, v. 97, n. 2, p. 161–166, 20 jan. 1998.

HEATON, D. A et al. Remodeling of the cardiac pacemaker L-type calcium current and its beta-adrenergic responsiveness in hypertension after neuronal NO synthase gene transfer. **Hypertension**, v. 48, n. 3, p. 443–52, set. 2006.

HENKEL, D. M. et al. Death in heart failure: a community perspective. **Circulation. Heart Failure**, v. 1, n. 2, p. 91–7, jul. 2008.

HEO, J.; CAMPBELL, S. L. Superoxide anion radical modulates the activity of Ras and Ras-related GTPases by a radical-based mechanism similar to that of nitric oxide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 13, p. 12438–45, abr. 2005.

HERON, M. Deaths : Leading Causes for 2009. **National Vital Statistics Report**, v. 61, n. 7, p. 01-95, out.2012.

HERZFELD, B. A.; RAPER, S. M. The heterogeneity of arginases in rat tissues. **Biochemical Journal**, v. 153, p. 469–478, fev. 1976.

HEUSCH, P. et al. Increased inducible nitric oxide synthase and arginase II expression in heart failure: no net nitrite/nitrate production and protein S-nitrosylation. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 299, n. 2, p. 446–453, ago. 2010.

HOLMES, J. W. Candidate mechanical stimuli for hypertrophy during volume overload. **Journal of Applied Physiology**, v. 97, n. 4, p. 1453–60, out. 2004.

HONSHO, S. et al. Pressure-mediated hypertrophy and mechanical stretch induces IL-1 release and subsequent IGF-1 generation to maintain compensative hypertrophy by affecting Akt and JNK pathways. **Circulation Research**, v. 105, n. 11, p. 1149–58, 20 nov. 2009.

HU, C.-M. et al. Heme oxygenase-1 inhibits angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in vitro and in vivo. **Circulation**, v. 110, n. 3, p. 309–16, 20 jul. 2004.

HUANG, Q.-Q. et al. Co-expression of skeletal and cardiac troponin T decreases mouse cardiac function. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 294, n. 1, p. 213–222, jan. 2008.

HUYNH, N. N. et al. The vascular effects of different arginase inhibitors in rat isolated aorta and mesenteric arteries. **British Journal of Pharmacology**, v. 156, n. 1, p. 84–93, jan. 2009.

ICHINOSE, F. et al. Pressure overload-induced LV hypertrophy and dysfunction in mice are exacerbated by congenital NOS3 deficiency. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 286, n. 3, p. 1070–1075, mar. 2004.

IEDA, M.; FUKUDA, K. Cardiac Innervation and Sudden Cardiac Death. **Current Cardiology Reviews**, v. 5, p. 289–295, nov. 2009.

IGNARRO, L.; BUGA, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 84, p. 9265–9269, dez. 1987.

INGWALL, J. S. Energy metabolism in heart failure and remodelling. **Cardiovascular Research**, v. 81, p. 412–419, fev. 2009.

JAIN-GHAI, S.; NAGAMANI, S. Arginase I deficiency: Severe infantile presentation with hyperammonemia: More common than reported? **Molecular Genetics and Metabolism** v. 104, p. 107–111, set. 2011.

JAMEEL, M. N.; ZHANG, J. Myocardial energetics in left ventricular hypertrophy. **Current Cardiology Reviews**, v. 5, n. 3, p. 243–50, ago. 2009.

JANERO, D. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 9, p. 515–540, ago. 1990.

Jl, K.; MINAKAWA, M.; FUKUI, K. Increased Superoxide Radical with a Decrease in Vascular Endothelial Growth Factor and Inducible Nitric Oxide Synthase Level Leads to the

Progression of Left Ventricular Hypertrophy in a Pressure-Overload Rat Heart Model. **Annals of thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 14, n. 4, p. 210–217, ago. 2008.

JUNG, A. S. et al. Modulation of contractility by myocyte-derived arginase in normal and hypertrophied feline myocardium. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 290, n. 5, p. H1756–62, maio. 2006.

JUNG, C. et al. Arginase inhibition mediates cardioprotection during ischaemia-reperfusion. **Cardiovascular research**, v. 85, n. 1, p. 147–54, 1 jan. 2010.

JUNIOR, W.; FRANCHINI, K. Influência de fatores ambientais e genéticos na hipertrofia e remodelamento cardíacos na hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, p. 414–424, out. 2001.

KAMP, T. J.; HELL, J. W. Regulation of Cardiac L-Type Calcium Channels by Protein Kinase A and Protein Kinase C. **Circulation Research**, v. 87, n. 12, p. 1095–1102, 8 dez. 2000.

KAPILOFF, M. S. et al. An adenylyl cyclase-mAKAPbeta signaling complex regulates cAMP levels in cardiac myocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 35, p. 23540–6, 28 ago. 2009.

KATOVICH, M. J. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 as a novel target for gene therapy for hypertension. **Experimental Physiology**, v. 90, n. 3, p. 299–305, maio. 2005.

KAUNDAL, M.; SHARMA, S. Analysis of isoproterenol-induced changes in gastrocnemius muscle and serum lactate dehydrogenase expression in mice. **Singapore Medical Journal**, v. 52, n. 4, p. 274–82, abr. 2011.

KIM, Y. M.; TALANIAN, R. V; BILLIAR, T. R. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 49, p. 31138–48, 5 dez. 1997.

KINDO, M. et al. Pressure overload-induced mild cardiac hypertrophy reduces left ventricular transmural differences in mitochondrial respiratory chain activity and increases oxidative stress. **Frontiers in Physiology**, v. 3, n. August, p. 332, jan. 2012.

KINNULA, V. L.; CRAPO, J. D. Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 167, n. 12, p. 1600–19, 15 jun. 2003.

KISHI, T.; HIROOKA, Y. Oxidative stress in the brain causes hypertension via sympathoexcitation. **Frontiers in Physiology**, v. 3, p. 335, ago. 2012.

KOBAYASHI, Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 88, n. 6, p. 1157–62, dez. 2010.

KOBILKA, B. K. Structural insights into adrenergic receptor function and pharmacology. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 4, p. 213–8, maio. 2011.

KONRAD, P. et al. Monosodium glutamate neonatal treatment induces cardiovascular autonomic function changes in rodents. **Clinics**, v. 67, n. 10, p. 1209–1214, maio. 2012.

KUDEJ, R. K. et al. Effects of chronic beta-adrenergic receptor stimulation in mice. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 29, n. 10, p. 2735–46, out. 1997.

LACZA, Z. et al. Mitochondrial nitric oxide synthase is not eNOS, nNOS or iNOS. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, n. 10, p. 1217–1228, nov. 2003.

LANDER, H.; OGIESTE, J.; PEARCE, S. Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21ras. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 3, p. 7017–7020, mar. 1995.

LANG, R. J. et al. Nitric oxide and thiol reagent modulation of Ca²⁺-activated K⁺ (BKCa) channels in myocytes of the guinea-pig taenia caeci. **The Journal of Physiology**, v. 525 Pt 2, p. 363–76, 1 jun. 2000.

LANG, R.; WATSON, M. Nitric oxide donors, S-nitroso-L-cysteine and sodium nitroprusside, on the whole- • cell and single channel currents in single myocytes of the guinea- • pig proximal colon. **British Journal of Pharmacology**, v. 123, p. 505–517, fev. 1998.

LAVOIE, J. L.; SIGMUND, C. D. Minireview: Overview of the Renin-Angiotensin System--An Endocrine and Paracrine System. **Endocrinology**, v. 144, n. 6, p. 2179–2183, 1 jun. 2003.

LAVULO, L. T. et al. Subunit-subunit interactions in trimeric arginase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 17, p. 14242–14248, abr. 2001.

LAYLAND, J. et al. Essential role of troponin I in the positive inotropic response to isoprenaline in mouse hearts contracting auxotonically. **The Journal of Physiology**, v. 556, p. 835–47, 1 maio. 2004.

LEE, C. et al. L-arginine supplementation reduces cardiac noradrenergic neurotransmission in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 47, n. 1, p. 149–155, abr. 2009.

LEE, D. S. et al. A systematic assessment of causes of death after heart failure onset in the community: impact of age at death, time period, and left ventricular systolic dysfunction. **Circulation. Heart Failure**, v. 4, n. 1, p. 36–43, jan. 2011.

LEENEN, F. H.; YUAN, B. Dietary-sodium-induced cardiac remodeling in spontaneously hypertensive rat versus Wistar-Kyoto rat. **Journal of Hypertension**, v. 16, n. 6, p. 885–92, jun. 1998.

LEVICK, S. P. et al. Sympathetic nervous system modulation of inflammation and remodeling in the hypertensive heart. **Hypertension**, v. 55, n. 2, p. 270–6, fev. 2010.

LEYCHENKO, A. et al. Stretch-induced hypertrophy activates NFkB-mediated VEGF secretion in adult cardiomyocytes. **PloS One**, v. 6, n. 12, p. 1–9, jan. 2011.

LI, Y. Guanylyl Cyclase-A Inhibits Angiotensin II Type 1A Receptor-Mediated Cardiac Remodeling, an Endogenous Protective Mechanism in the Heart. **Circulation**, v. 106, n. 13, p. 1722–1728, 3 set. 2002.

LIM, H. K. et al. Mitochondrial arginase II constrains endothelial NOS-3 activity. **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**, v. 293, n. 6, p. H3317–H3324, 5 out. 2007.

- LIN, Y. et al. L-arginine inhibits isoproterenol-induced cardiac hypertrophy through nitric oxide and polyamine pathways. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 103, n. 2, p. 124–30, ago. 2008.
- LIN, Y. et al. The ornithine decarboxylase/polyamine system inhibits angiotensin-induced hypertrophy of cardiomyocytes through the NO/cGMP-dependent protein kinase type-I. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 25, p. 443–450, jan. 2010.
- LIONETTI, V.; STANLEY, W. C.; RECCHIA, F. A. Modulating fatty acid oxidation in heart failure. **Cardiovascular Research**, v. 90, n. 2, p. 202–9, 1 maio. 2011.
- LIU, V. W. T.; HUANG, P. L. Cardiovascular roles of nitric oxide : A review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice. **Cardiovascular Research**, v. 77, p. 19–29, jan. 2008.
- LIU, Y.; FENG, Q. NOing the heart: role of nitric oxide synthase-3 in heart development. **Differentiation**, v. 84, n. 1, p. 54–61, jul. 2012.
- LIU, Z.; HILBELINK, D. R.; GERDES, A. M. Regional changes in hemodynamics and cardiac myocyte size in rats with aortocaval fistulas: Long-term effects. **Circulation Research**, v. 69, p. 59–65, 1 jul. 1991.
- LOSCALZO, J.; WELCH, G. Nitric Oxide and its Role in the Cardiovascular System. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 38, n. 2, p. 87–104, set. 1995.
- LUIKING, Y. C.; ENGELEN, M. P. K. J.; DEUTZ, N. E. P. Regulation of nitric oxide production in health and disease. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 13, p. 97–104, jan. 2010.
- LYKKESFELDT, J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. **Clinica Chimica Acta**, v. 380, n. 1-2, p. 50–8, 1 maio. 2007.
- MAASS, A. H. et al. Hypertrophy, Fibrosis and Sudden Cardiac Death in Response to Pathological Stimuli in Mice With Mutations in Cardiac Troponin T. **Circulation**, v. 110, p. 2102–2109, out. 2004.

MANSUY, D.; BOUCHER, J.-L. Alternative nitric oxide-producing substrates for NO synthases. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 8, p. 1105–21, 15 out. 2004.

MARSHALL, H. E.; STAMLER, J. S. Exhaled nitric oxide (NO), NO synthase activity, and regulation of nuclear factor (NF)-kB. **American Journal Respiratory Cell Molecular Biology**, v. 21, p. 296–297, set. 1999.

MARTIN, C. S.; HARDER, B. A.; EPPENBERGER, H. M. Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes. **Journal of Molecular Medicinal**, v. 75, p. 901–920, nov. 1997.

MASSIN, M.; DERKENNE, B. Cardiac autonomic dysfunction in diabetic children. **Diabetes Care**, v. 22, n. 11, p. 1845–1850, nov. 1999.

MATOS-SOUZA, J. R.; FRANCHINI, K. G.; JUNIOR, W. N. Hipertrofia ventricular esquerda: o caminho para a insuficiência cardíaca. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 15, n. 2, p. 71–74, abr. 2008.

MATSUO, T.; CARABELLO, B. Mechanisms of cardiac hypertrophy in canine volume overload. **Heart and Circulatory Physiology**, v. 275, p. 65–74, jul. 1998.

MATSUOKA, H.; NAKATA, M.; KOHNO, K. Chronic L-arginine administration attenuates cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 27, p. 14–18, jan. 1996.

MCBRYDE, F. D. et al. Angiotensin II-based hypertension and the sympathetic nervous system: the role of dose and increased dietary salt in rabbits. **Experimental Physiology**, v. 92, n. 5, p. 831–40, set. 2007.

MCMULLEN, J. R.; JENNINGS, G. L. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: Novel therapeutic strategies to treat heart failure. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, p. 255–262, abr. 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - SISTEMA DE INFORMAÇÃO SOBRE MORTALIDADE.
Indicadores e Dados Básicos 2011 - Brasil: Indicadores de Mortalidade.
<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2011/c08.def>.

MISTRY, D. K.; GARLAND, C. J. Nitric oxide (NO)-induced activation of large conductance Ca²⁺-dependent K⁺ channels (BK(Ca)) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery. **British Journal of Pharmacology**, v. 124, n. 6, p. 1131–40, jul. 1998.

MOOLMAN-SMOOK, J. C. et al. Molecular genetics of cardiomyopathy: changing times, shifting paradigms. **Cardiovascular Journal of South Africa**, v. 14, n. 3, p. 145–55, maio. 2003.

MORANDI, L. et al. High plasma creatine kinase: review of the literature and proposal for a diagnostic algorithm. **Neurological Sciences**, v. 27, n. 5, p. 303–11, nov. 2006.

MORRIS, S. M.; BHAMIDIPATI, D.; KEPKA-LENHART, D. Human type II arginase : sequence analysis and tissue-specific expression. **Gene**, v. 193, n. November 1996, p. 157–161, jul. 1997.

MULLERSHAUSEN, F.; LANGE, A.; MERGIA, E. Desensitization of NO/cGMP signaling in smooth muscle: blood vessels versus airways. **Molecular Pharmacology**, v. 69, n. 6, p. 1969–1974, jun. 2006.

MYSLIVECEK, J.; TROJAN, S. Regulation of adrenoceptors and muscarinic receptors in the heart. **General Physiology and Biophysics**, v. 22, n. 1, p. 3–14, mar. 2003.

NAGANO, M. et al. Role of cardiac angiotensin II in isoproterenol-induced left ventricular hypertrophy. **Hypertension**, v. 19, p. 708–712, jun. 1992.

NAKAYAMA, H. et al. The IP₃ receptor regulates cardiac hypertrophy in response to select stimuli. **Circulation Research**, v. 107, n. 5, p. 659–66, 3 set. 2010.

NASCIMBEN, L. et al. Mechanisms for increased glycolysis in the hypertrophied rat heart. **Hypertension**, v. 44, p. 662–667, out. 2004.

NATIONAL HEART, L. AND B. I. **Fact Book - Fiscal Year 2011**. p.01-212, fev. 2012.

NÉGRERIE, M. et al. Control of nitric oxide dynamics by guanylate cyclase in its activated state. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 50, p. 46815–21, 14 dez. 2001.

- NIKI, E. et al. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, n. 1, p. 668–76, 9 dez. 2005.
- NISHIMURA, R. A; OMMEN, S. R.; TAJIK, A J. Cardiology patient page. Hypertrophic cardiomyopathy: a patient perspective. **Circulation**, v. 108, n. 19, p. e133–5, 11 nov. 2003.
- NIU, X. et al. Cardioprotective effect of beta-3 adrenergic receptor agonism: role of neuronal nitric oxide synthase. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 59, n. 22, p. 1979–1987, maio. 2012.
- NOGUEIRA, J. B. Left ventricular hypertrophy in systemic hypertension. Benefits of its reversal. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 73, n. 1, p. 103–12, jul. 1999.
- NORTON, G. R. et al. Heart Failure in Pressure Overload Hypertrophy: The Relative Roles of Ventricular Remodeling and Myocardial Dysfunction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 39, n. 4, p. 664–671, fev.2002.
- OKA, N.; ASAI, K.; KUDEJ, R. Downregulation of caveolin by chronic beta-adrenergic receptor stimulation in mice. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v. 273, p. 1957–1962, dez. 1997.
- OKAHA, H. Assay for lipid peroxide in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351–358, jun. 1979.
- ORGANIZATION, W. H. **The global burden of disease: 2004 Update**. p. 01-160, 2008.
- ORGANIZATION, W. H. **Chronic diseases are the major cause of death and disability worldwide**. p. 01-03, 2005.
- ORGANIZATION, W. H. **Global Health Risks: Mortality and burden of disease attributable to selected major risks**. p. 01-62, 2009.
- ORGANIZATION, W. H. **Global status report on noncommunicable diseases**. p. 01-176, 2011.
- ORGANIZATION, W. H. **World Health Statistical**. p. 01-172, 2013.

OSADCHII, O. E. et al. Temporal changes in myocardial adrenergic regulation with the progression to pump dysfunction after chronic beta-adrenoreceptor activation in rats.

European Journal of Physiology, v. 455, n. 2, p. 251–60, nov. 2007.

OU, Z.; WEI, W.; HUANG, D. l-Arginine restores endothelial nitric oxide synthase-coupled activity and attenuates monocrotaline-induced pulmonary artery hypertension in rats.

American Journal of Endocrinology and Metabolism, v. 298, p. 1131–1139, jun. 2010.

OZAKI, M. et al. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase attenuates cardiac hypertrophy induced by chronic isoproterenol infusion. **Circulation Journal**, v. 66, p. 851–856, set. 2002.

PATEL, M. B. et al. Altered function and structure of the heart in dogs with chronic elevation in plasma norepinephrine. **Circulation**, v. 84, p. 2091–100, nov. 1991.

PAUL, M.; MEHR, A.; KREUTZ, R. Physiology of local renin-angiotensin systems.

Physiological Reviews, v. 86, p. 747–803, jul. 2006.

PEGG, A. E. Regulation of ornithine decarboxylase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 21, p. 14529–32, 26 maio. 2006.

PELAT, M. et al. High isoproterenol doses are required to activate beta3-adrenoceptor-mediated functions in dogs. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 304, n. 1, p. 246–253, jan. 2003.

PENDERGRASS, K. Sex differences in circulating and renal angiotensins of hypertensive mRen(2). Lewis but not normotensive Lewis rats. **Heart and Circulatory Physiology**, v. 295, p. 10–20, jul. 2008.

PEROZICH, J.; HEMPEL, J.; JR, S. M. M. Roles of conserved residues in the arginase family. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1382, p. 23–37, jan. 1998.

PERSSON, P. B. Renin: origin, secretion and synthesis. **The Journal of Physiology**, v. 552, n. Pt 3, p. 667–71, 1 nov. 2003.

PODEROSO, J. J. The formation of peroxynitrite in the applied physiology of mitochondrial nitric oxide. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 484, n. 2, p. 214–20, 15 abr. 2009.

POP-BUSUI, R. Cardiac autonomic neuropathy in diabetes: a clinical perspective. **Diabetes Care**, v. 33, n. 2, p. 434–41, mar. 2010.

POP-BUSUI, R.; EVANS, G. Effects of cardiac autonomic dysfunction on mortality risk in the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD) trial. **Diabetes Care**, v. 33, n. 7, p. 1578–1584, jul. 2010.

POREMBSKA, Z.; ZAMECKA, E. Immunological properties of rat arginases. **Acta Biochemica Polonica**, v. 31, n. 2, p. 223–227, dez. 1984.

POST, H.; PIESKE, B. Arginase: a modulator of myocardial function. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 290, n. 5, p. H1747–8, maio. 2006.

PURUSHOTHAMAN, S. et al. Temporal relation of cardiac hypertrophy , oxidative stress , and fatty acid metabolism in spontaneously hypertensive rat. **Molecular and Cellular Biochemistry**, p. 59–64, maio. 2011.

RABELO, L. A et al. Endothelium dysfunction in LDL receptor knockout mice: a role for H₂O₂. **British Journal of Pharmacology**, v. 138, n. 7, p. 1215–20, abr. 2003.

RATHORE, H.; MUNAVVAR, A. Interaction between renin–angiotensin and sympathetic nervous systems in a rat model of pressure overload cardiac hypertrophy. **Autonomic and Autacoid Pharmacology**, v. 29, p. 171–180, out. 2009.

RATHORE, N. et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in isoproterenol induced oxidative stress in rats tissues. **Pharmacological research**, v. 38, n. 4, p. 297–303, out. 1998.

RAYCHAUDHURI, B. et al. Nitric oxide blocks nuclear factor-kappaB activation in alveolar macrophages. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 21, n. 3, p. 311–6, set. 1999.

RECCHIA, F. A. et al. Reduced Nitric Oxide Production and Altered Myocardial Metabolism During the Decompensation of Pacing-Induced Heart Failure in the Conscious Dog. **Circulation Research**, p. 969–979, nov. 1998.

RIBA, R. et al. Von Willebrand factor activates endothelial nitric oxide synthase in blood platelets by a glycoprotein Ib-dependent mechanism. **Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH**, v. 4, n. 12, p. 2636–44, dez. 2006.

RIBEIRO, H. B. et al. Estudo evolutivo da morfologia e função cardíaca em ratos submetidos a estenose aórtica supravalvar. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 81, n. 6, p. 562–568, 2003.

RITCHIE, R. H.; DELBRIDGE, L. Cardiac hypertrophy, substrate utilization and metabolic remodeling: cause or effect? **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, p. 159–166, jan. 2006.

ROHINI, A. et al. Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy. **Pharmacological Research**, v. 61, p. 269–80, abr. 2010.

ROMANO, M.; MACIEL, B. Alterações cardíacas decorrentes da hipertensão arterial. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 2, p. 169–174, abr. 2008.

ROMERO, M. J. et al. Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity. **Circulation Research**, v. 102, n. 1, p. 95–102, 4 jan. 2008.

ROMERO, M. J. et al. Diabetes-induced vascular dysfunction involves arginase I. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 302, n. 1, p. H159–66, 1 jan. 2012.

ROWLAND, T. Sudden unexpected death in young athletes: reconsidering “hypertrophic cardiomyopathy”. **Pediatrics**, v. 123, n. 4, p. 1217–22, abr. 2009.

RUETTEN, H. et al. Concentric left ventricular remodeling in endothelial nitric oxide synthase knockout mice by chronic pressure overload. **Cardiovascular Research**, v. 66, n. 3, p. 444–53, 1 jun. 2005.

RUGALE, C. et al. Sodium restriction prevents cardiac hypertrophy and oxidative stress in angiotensin II hypertension. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 284, n. 5, p. H1744–50, maio. 2003.

RUIZ-HURTADO, G.; DELGADO, C. Nitric oxide pathway in hypertrophied heart: new therapeutic uses of nitric oxide donors. **Journal of Hypertension**, v. 28, p. S56–61, set. 2010.

RUZICKA, M. et al. The renin-angiotensin system and volume overload-induced cardiac hypertrophy in rats. Effects of angiotensin converting enzyme inhibitor versus angiotensin II receptor blocker. **Circulation**, v. 87, n. 3, p. 921–930, mar. 1993.

RUZICKA, M.; YUAN, B.; LEENEN, F. H. Effects of enalapril versus losartan on regression of volume overload- induced cardiac hypertrophy in rats. **Circulation**, v. 90, n. 1, p. 484–491, jul. 1994.

RYOO, S. et al. Oxidized low-density lipoprotein-dependent endothelial arginase II activation contributes to impaired nitric oxide signaling. **Circulation Research**, v. 99, n. 9, p. 951–60, 27 out. 2006.

RYOO, S. et al. Endothelial arginase II: a novel target for the treatment of atherosclerosis. **Circulation Research**, v. 102, n. 8, p. 923–32, 25 abr. 2008.

RYOO, S. et al. OxLDL-dependent activation of arginase II is dependent on the LOX-1 receptor and downstream RhoA signaling. **Atherosclerosis**, v. 214, n. 2, p. 279–287, fev. 2011.

SAM, F.; KERSTETTER, D.; PIMENTAL, D. Increased reactive oxygen species production and functional alterations in antioxidant enzymes in human failing myocardium. **Journal of Cardiac Failure**, v. 11, n. 6, p. 473–480, fev. 2005.

SARAIVA, R. M. et al. Deficiency of neuronal nitric oxide synthase increases mortality and cardiac remodeling after myocardial infarction: role of nitroso-redox equilibrium. **Circulation**, v. 112, n. 22, p. 3415–22, 29 nov. 2005.

SCHENK, G.; MITIČIĆ, N.; GAHAN, L. Binuclear Metallohydrolases: Complex Mechanistic Strategies for a Simple Chemical Reaction. **Accounts of Chemical Research**, v. 45, n. 1593-1603, jun. 2012.

SCHIMKE, R. T.; DOYLE, D. Control of enzyme levels in animal tissues. **Annual Review of Biochemistry**, v. 39, p. 929–976, jul. 1970.

SCHIMKE, R. T. Arginine deiminase (Mycoplasma). In: **Methods in Enzymology**. v. 17, parte A. p. 310-313, 1970.

SCHLÜTER, K. D. et al. Central role for ornithine decarboxylase in beta-adrenoceptor mediated hypertrophy. **Cardiovascular Research**, v. 45, n. 2, p. 410–7, jan. 2000.

SCISLO, T. J.; ICHINOSE, T. K.; LEARY, D. S. O. Stimulation of NTS A 1 adenosine receptors differentially resets baroreflex control of regional sympathetic outputs. **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**, v. 294, p. 172–182, 2008.

SEARS, C. E. et al. Cardiac neuronal nitric oxide synthase isoform regulates myocardial contraction and calcium handling. **Circulation research**, v. 92, n. 5, p. e52–9, 21 mar. 2003.

SEDDON, M.; LOOI, Y. H.; SHAH, A. M. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. **Heart (British Cardiac Society)**, v. 93, n. 8, p. 903–7, ago. 2007.

SELVETELLA, G. et al. Adaptive and maladaptive hypertrophic pathways: points of convergence and divergence. **Cardiovascular research**, v. 63, p. 373–80, 15 ago. 2004.

SELVETELLA, G.; LEMBO, G. Mechanisms of cardiac hypertrophy. **Heart failure clinics**, v. 1, n. 2, p. 263–73, jul. 2005.

SEN, S. et al. Cardiac Hypertrophy in Spontaneously Hypertensive Rats. **Circulation Research**, v. 35, p. 775–781, 1974.

SHANKS, R. G. et al. Stimulation of adrenergic beta-receptors by orciprenaline. **British Medical Journal**, v. 1, p. 610–612, 15 jan. 1967.

SHANTZ, L.; FEITH, D.; PEGG, A. Targeted overexpression of ornithine decarboxylase enhances beta-adrenergic agonist-induced cardiac hypertrophy. **Biochemical Journal**, v. 32, p. 25–32, 2001.

SHIN, W. S.; BERKOWITZ, D. E.; RYOO, S. W. Increased arginase II activity contributes to endothelial dysfunction through endothelial nitric oxide synthase uncoupling in aged mice. **Experimental and molecular medicine**, v. 44, n. 10, p. 594–602, 31 out. 2012.

SILVA, B. R.; PERNOMIAN, L.; BENDHACK, L. M. Contribution of oxidative stress to endothelial dysfunction in hypertension. **Frontiers in physiology**, v. 3, p. 1–5, jan. 2012.

SIM, D. S.; LIEU, H.; ANDRE, P. Biomarkers and Bioassays for Cardiovascular Diseases: Present and Future. **Biomarker insights**, v. 3, n. 650, p. 293–302, jan. 2008.

SKRZYPEK-OSIECKA, I.; ROBIN, Y.; POREMBSKA, Z. Purification of rat kidney arginases A1 and A4 and their subcellular distribution. **Acta Biochimica Polonica**, v. 30, n. 1, p. 83–92, 1983.

SMITH, C. S. et al. Altered creatine kinase adenosine triphosphate kinetics in failing hypertrophied human myocardium. **Circulation**, v. 114, n. 11, p. 1151–8, 12 set. 2006.

SOJITRA, B.; BULANI, Y.; KUMAR, U. Nitric oxide synthase inhibition abrogates hydrogen sulfide-induced cardioprotection in mice. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 360, n. 1-2, p. 61–69, 2012.

SOLTYSINSKA, E.; OLESEN, S. P.; OSADCHII, O. E. Myocardial structural, contractile and electrophysiological changes in the guinea-pig heart failure model induced by chronic sympathetic activation. **Experimental Physiology**, v. 96, n. 7, p. 647–63, jul. 2011.

SON, S. M. Reactive oxygen and nitrogen species in pathogenesis of vascular complications of diabetes. **Diabetes and Metabolism Journal**, v. 36, n. 3, p. 190–8, jun. 2012.

SOROKINA, N. et al. Recruitment of compensatory pathways to sustain oxidative flux with reduced carnitine palmitoyltransferase I activity characterizes inefficiency in energy metabolism in hypertrophied hearts. **Circulation**, v. 115, n. 15, p. 2033–41, 17 abr. 2007.

SPADARI-BRATFISCH, R. C.; DOS SANTOS, I. N. Adrenoceptors and adaptive mechanisms in the heart during stress. **Stress, neurotransmitters and hormones: Annals N.Y. Science**, v. 1148, p. 377–83, dez. 2008.

SPECTOR, E. B. et al. Subcellular localization and differential antibody specificity of arginase in tissue culture and whole animals. **Int. J. Devl. Neuroscience**, v. 12, n. 4, p. 337–342, 1994.

SRIVASTAVA, S. et al. Downregulation of CuZn-superoxide dismutase contributes to β -adrenergic receptor-mediated oxidative stress in the heart. **Cardiovascular Research**, v. 74, p. 445–455, 2007.

STANLEY, W. C.; RECCHIA, F. A.; LOPASCHUK, G. D. Myocardial Substrate Metabolism in the Normal and Failing Heart. p. 1093–1129, 2005.

STARK, J. C. C. et al. Effect of overexpressed adenylyl cyclase VI on beta 1- and beta 2-adrenoceptor responses in adult rat ventricular myocytes. **British journal of pharmacology**, v. 143, n. 4, p. 465–76, out. 2004.

STEPPAN, J. et al. Arginase modulates myocardial contractility by a nitric oxide synthase 1-dependent mechanism. **PNAS**, v. 103, n. 12, p. 4759–64, 21 mar. 2006.

STEVENS, A.; SCHMIDT, M.; DUNCAN, B. Gender inequalities in non communicable disease mortality in Brazil. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 17, n. 10, p. 2627–2634, 2012.

SUBRAMANIAN, D. et al. New predictive models of heart failure mortality using time-series measurements and ensemble models. **Circulation. Heart failure**, v. 4, n. 4, p. 456–62, jul. 2011.

SUN, Y. et al. Deletion of iNOS provides cardioprotection in mice with 2-kidney, 1-clip hypertension. **Hypertension**, v. 53, n. 1, p. 49–56, 2009.

TAEGTMEYER, H.; OVERTURF, M. L. Effects of moderate hypertension on cardiac function and metabolism in the rabbit. **Hypertension**, v. 11, n. 5, p. 416–426, 1 maio. 1988.

TANAKA, S. et al. Antiapoptotic effect of haem oxygenase-1 induced by nitric oxide in experimental solid tumour. **British journal of cancer**, v. 88, n. 6, p. 902–9, 24 mar. 2003.

- TARONE, G.; LEMBO, G. Molecular interplay between mechanical and humoral signalling in cardiac hypertrophy. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 9, p. 376–382, set. 2003.
- TENG, T.-H. K. et al. Heart failure: incidence, case fatality, and hospitalization rates in Western Australia between 1990 and 2005. **Circulation. Heart failure**, v. 3, n. 2, p. 236–43, mar. 2010.
- TENNYSON, A. G.; LIPPARD, S. J. Generation, translocation, and action of nitric oxide in living systems. **Chemistry and Biology**, v. 18, n. 10, p. 1211–20, 28 out. 2011.
- THENGCHAISRI, N. et al. Upregulation of arginase by H₂O₂ impairs endothelium-dependent nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 26, n. 9, p. 2035–42, set. 2006.
- THOMAS, G. D. Neural control of the circulation. **Advances in physiology education**, v. 35, n. 1, p. 28–32, mar. 2011.
- TIAN, R. et al. Increased Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase Activity in Rat Hearts With Pressure-Overload Hypertrophy. **Circulation**, v. 104, n. 14, p. 1664–1669, 2 out. 2001.
- TITHERADGE, M. The enzymatic measurement of nitrate and nitrite. In: **Methods in Molecular Biology - Nitric Oxide Protocols**. [s.l.: s.n.]. v. 100p. 83–91.
- TSAI, A.-L. et al. Dynamic ligand exchange in soluble guanylyl cyclase (sGC): implications for sGC regulation and desensitization. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 50, p. 43182–92, 16 dez. 2011.
- UMAR, S.; VAN DER LAARSE, A. Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 333, n. 1-2, p. 191–201, jan. 2010.
- VAISMAN, B. L. et al. Selective endothelial overexpression of arginase II induces endothelial dysfunction and hypertension and enhances atherosclerosis in mice. **PloS one**, v. 7, n. 7, p. e39487, jan. 2012.

VAN BILSEN, M.; VAN NIEUWENHOVEN, F. A.; VAN DER VUSSE, G. J. Metabolic remodelling of the failing heart: beneficial or detrimental? **Cardiovascular research**, v. 81, n. 3, p. 420–8, 15 fev. 2009.

VINIK, A. I. The conductor of the autonomic orchestra. **Frontiers in Endocrinology**, v. 3, p. 1–13, 2012.

VINIK, A. I.; MASER, R. E.; ZIEGLER, D. Review Article Autonomic imbalance : prophet of doom or scope for hope? **Diabetic Medicine**, v. 28, p. 643–651, 2011.

WALLIN, B. et al. Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate - its use for evaluation of antioxidants. **Analytical Biochemistry**, v. 208, p. 10–15, 1993.

WALLUKAT, G. The beta-adrenergic receptors. **Herz**, v. 27, n. 7, p. 683–90, nov. 2002.

WANG, Z.-Q. et al. Differential Regulation of Renal Angiotensin Subtype AT1A and AT2 Receptor Protein in Rats With Angiotensin-Dependent Hypertension. **Hypertension**, v. 33, n. 1, p. 96–101, 1 jan. 1999.

WEI, M. X. et al. Distinct actions of intermittent and sustained β -adrenoceptor stimulation on cardiac remodeling. **Science China Life Science**, v. 54, n. 6, p. 429–501, 2011.

WEINBERG, E. O. et al. Gender differences in molecular remodeling in pressure overload hypertrophy. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 34, n. 1, p. 264–73, jul. 1999.

WOLLERT, K. C.; DREXLER, H. Regulation of cardiac remodeling by nitric oxide: focus on cardiac myocyte hypertrophy and apoptosis. **Heart failure reviews**, v. 7, n. 4, p. 317–25, out. 2002.

WOODCOCK, E. A et al. Cardiac alpha 1-adrenergic drive in pathological remodelling. **Cardiovascular research**, v. 77, n. 3, p. 452–62, 1 fev. 2008.

XIAO, R. et al. Recent advances in cardiac beta 2-adrenergic signal transduction. **Circulation research**, v. 85, p. 1092–1100, 1999.

XIAO, R. P. Beta-adrenergic signaling in the heart: dual coupling of the beta2-adrenergic receptor to G(s) and G(i) proteins. **Science's STKE : signal transduction knowledge environment**, v. 104, p. 1–10, 16 out. 2001.

YAMAZAKI, T.; KOMURO, I.; YAZAKI, Y. Molecular mechanism of cardiac cellular hypertrophy by mechanical stress. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 27, p. 133–140, 1995.

YAN, J. et al. Increased glucose uptake and oxidation in mouse hearts prevent high fatty acid oxidation but cause cardiac dysfunction in diet-induced obesity. **Circulation**, v. 119, n. 21, p. 2818–28, 2 jun. 2009.

YE, Y. et al. Myocardial creatine kinase kinetics and isoform expression in hearts with severe LV hypertrophy. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 281, n. 1, p. H376–86, jul. 2001.

YU, H. et al. Widespread expression of arginase I in mouse tissues: biochemical and physiological implications. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 51, n. 9, p. 1151–1160, 2003.

YU, H. C. M. et al. Salt Induces Myocardial and Renal Fibrosis in Normotensive and Hypertensive Rats. **Circulation**, v. 98, n. 23, p. 2621–2628, 8 dez. 1998.

ZHANG, G.-X. et al. Cardiac oxidative stress in acute and chronic isoproterenol-infused rats. **Cardiovascular research**, v. 65, n. 1, p. 230–8, 1 jan. 2005.

ZHANG, G.-X. et al. Role of AT1 receptor in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and oxidative stress in mice. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 42, n. 4, p. 804–11, abr. 2007.

ZHANG, J. et al. Isoproterenol-induced cardiotoxicity in sprague-dawley rats: correlation of reversible and irreversible myocardial injury with release of cardiac troponin T and roles of iNOS in myocardial injury. **Toxicologic pathology**, v. 36, n. 2, p. 277–8, fev. 2008.

ZHANG, Y. et al. Urotensin II accelerates cardiac fibrosis and hypertrophy of rats induced. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 28, n. 1, p. 36–43, 2007.

ZHAO, X. et al. Cardiac hypertrophy and cardiac renin-angiotensin system in Dahl rats on high salt intake. **Journal of Hypertension**, v. 18, n. 9, p. 1319–26, set. 2000.

ZHENG, M.; HAN, Q.-D.; XIAO, R.-P. Distinct beta-adrenergic receptor subtype signaling in the heart and their pathophysiological relevance. **Acta Physiologica Sinica**, v. 56, n. 1, p. 1–15, 25 fev. 2004.

ZIMMER, H.-G.; GERLACH, E. Effect of beta-adrenergic stimulation on myocardial adenine nucleotide metabolism. **Circulation Research**, v. 35, p. 536–543, 1 out. 1974.

ZIOLO, M. T. et al. Myocyte nitric oxide synthase 2 contributes to blunted beta-adrenergic response in failing human hearts by decreasing Ca²⁺ transients. **Circulation**, v. 109, n. 15, p. 1886–91, 20 abr. 2004.

ZOU, Y.; KOMURO, I.; YAMAZAKI, T. Both G_s and G_i proteins are critically involved in isoproterenol-induced cardiomyocyte hypertrophy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 14, p. 9760–9770, 1999.

ANEXO A

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Maceió – AL, 10/08/2011

Senhor (a) Pesquisador (a), Luiza Antas Rabelo
Carlos Alberto Silva Júnior
Valéria Nunes de Souza

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), em 12/01/2011 e com base no parecer emitido pelo (a) relator (a) do processo nº **021462/2010-91** sob o título, **Papel da arginase na reatividade vascular e no balanço redox em um modelo murino de Hipertrofia Cardíaca por indução simpatomimética**, vem por meio deste instrumento comunicar a aprovação do processo supra citado, com base no item VIII.13, b, da Resolução nº 196/96.

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 196/96, item V.4).

É papel do(a) pesquisador(a) assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e sua justificativa. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o(a) pesquisador(a) ou patrocinador(a) deve enviá-los à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem incluídas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item IV. 2.e).

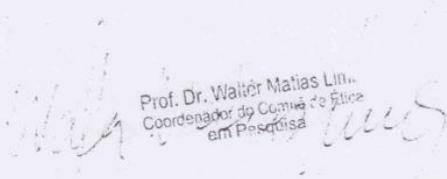
Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos no Cronograma do Protocolo e na Res. CNS, 196/96.

Na eventualidade de esclarecimentos adicionais, este Comitê coloca-se a disposição dos interessados para o acompanhamento da pesquisa em seus dilemas éticos e exigências contidas nas Resoluções supra - referidas.

Esta aprovação não é válida para subprojetos oriundos do protocolo de pesquisa acima referido.

(*) Áreas temáticas especiais

Válido até; junho de 2012



Prof. Dr. Waldir Matias Lima
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa

ANEXO B

Parecer do Consubstanciado



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
PARECER CONSUBSTANCIADO



PROTOCOLO: 0214622010-91

I. Identificação

1. Título: Papel da arginase na reatividade vascular e no balanço redox em um modelo murino de hipertrofia cardíaca por indução simpatomimética
2. Pesquisador(a) orientador(a): **Profa. Luiza Antas Rabêlo**
3. Orientandos(as): **Carlos Alberto Silva Júnior e Valéria Nunes de Souza**
4. Instituição onde se realizará: UFAL/ICBS
5. Data de apresentação ao CEP: 08/11/2010
6. Data de apresentação ao parecerista: 21/12/2010
7. Natureza da pesquisa: Projeto de Pesquisa

II. Resumo e Objetivos:

Segundo os autores a hipertrofia cardíaca é um indicador muito importante de risco de morbidade e mortalidade cardiovascular. Um dos meios mais utilizados para diagnosticar e auxiliar nas decisões de tratamento dos riscos cardiovasculares é a determinação dos níveis plasmáticos de biomarcadores. O desbalanço redox está envolvido nestas patologias. **Objetivo Geral:** Avaliar o papel do balanço redox e da arginase em um modelo murino de hipertrofia cardíaca por indução farmacológica simpatomimética. **Objetivos Específicos:** 1. Avaliar o crescimento corporal dos animais; 2. Avaliar os mecanismos hemodinâmicos, tais como pressão arterial e frequência cardíaca, neste modelo animal; 3. Estudar os mecanismos envolvidos na função vascular; 4. Avaliar a função cardíaca, mensurando, especificamente, de marcadores de dano cardíaco, a exemplo da creatina quinase, troponina, e lactato desidrogenase; 5. Analisar o papel do balanço redox e da enzima arginase neste modelo animal; 6. Avaliar a função hepática nestes animais e 7. Avaliar o perfil glicêmico através dos testes de resistência à insulina e tolerância à glicose nestes animais.

Serão utilizados camundongos C57BL/6 de ambos os sexos provenientes do Biotério Central da UFAL. Os animais serão divididos em grupos: Controles, Isoproterenol (ISO) e Isoproterenol + inibidor da arginase (ISSO -I). O grupo ISSO será tratado com isoproterenol para indução do infarto durante 7 dias e o ISSO - I receberá na água a L-Norvalina durante 7 dias. Parâmetros avaliados: crescimento corporal dos animais, avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca, avaliação morfológicas dos tecidos corporais cardíacos, hepáticos e renais, avaliação da função vascular em anéis de aorta, avaliação da atividade enzimática e perfil glicêmico.

Os documentos apresentados foram: orçamento (financiado), folha de rosto para pesquisa envolvendo animais devidamente assinada, formulário devidamente assinado e currículo dos pesquisadores.

III. Comentários do Relator.

O projeto apresentado à apreciação ao Comitê de Ética está escrito de acordo com as normas preconizadas para elaboração de projeto de pesquisa. Portanto, diante do exposto sugerimos ao Comitê de Ética em Pesquisa que considere, salvo melhor entendimento, o Projeto como aprovado.

VI. Data da Reunião:

*Protocolo
de pesquisa
aprovado*

Dr. Walter Matias Lima
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa