

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

Luciano Ramos

“Estudo hemodinâmico e morfológico do miocárdio de ratos hipertensos. Correlação com tratamento preventivo com L-arginina”

São José dos Campos, SP

2005

Luciano Ramos

“Estudo hemodinâmico e morfológico do miocárdio de ratos hipertensos.
Correlação com tratamento preventivo com L-arginina”

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas, da Universidade do
Vale do Paraíba como complementação dos
créditos necessários para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas.

Aluno: Luciano Ramos

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins

São José dos Campos, SP

Outubro - 2005

R144e

Ramos. Luciano

Estudo hemodinâmico e morfológico do miocárdio de ratos hipertensos. Correlação com tratamento preventivo com L-arginina./ Luciano Ramos. - São José dos Campos: Univap, 2005.

87f.: il.; 31 cm

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2005.

1. Hipertensão 2. hipertensão/Prevenção e controle 3. Óxido Nítrico 4. Arginina I. Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins, Orient. II. Título.

CDU:616.12-008.331.1

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo fotocopiador ou transmissão eletrônica.

Assinatura do aluno:



São José dos Campos, 28 de Outubro de 2005.

**“ESTUDO HEMODINÂMICO E MORFOLÓGICO DO MIOCÁRDIO DE RATOS
HIPERTENSOS. CORRRELAÇÃO COM TRATAMENTO PREVENTIVO COM L-
ARGININA”**

Luciano Ramos

Banca Examinadora:

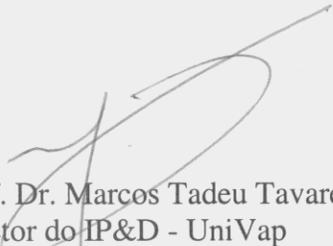
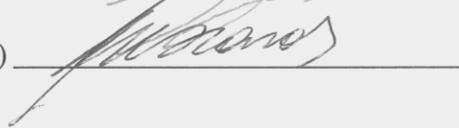
Prof. Dr. **WELLINGTON RIBEIRO** (UNIVAP)



Prof. Dr. **RODRIGO ÁLVARO B. LOPES MARTINS** (UNIVAP)



Prof. Dr. **MARCELO NICOLÁS MUSCARÁ** (USP/SP)



Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco
Diretor do IP&D - UniVap
São José dos Campos, 28 de outubro de 2005.

Dedicatória

Agradeço aos meus pais, **José e Maria**, pela minha vida, pela paciência, carinho e apoio sempre presentes.

A **Tatiana**, meu grande amor, pela paciência, compreensão, pelo apoio nesse momento e por sua ajuda. Por seu amor incondicional nos momentos em que estive distante...

Agradecimentos

A **Deus**, agradeço pelos dons da ciência, fortaleza, paciência, entendimento que se fizeram necessários durante toda essa minha jornada acadêmica.

A meu orientador, **Doutor Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins**, pela paciência, oportunidade e confiança em meu trabalho e por meu crescimento não só científico, mas também pessoal.

“Não se pode ensinar alguma coisa a alguém, pode-se apenas auxiliá-lo a descobrir por si mesmo” (Galileu).

Aos **Doutores Carlos Cogo e Wellington Ribeiro**, pela assessoria na parte científica e também pela suas amizades.

Aos colegas, que me auxiliaram no desenvolvimento desta dissertação: **Luis Gustavo, Carly, Andréa, Rodrigo Labat, Gustavo Teixeira, Toni.**

As secretárias do Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento: **Claudia Herdy Barbosa e Ivone Paranaíba Vilela.**

As bibliotecárias da UNIVAP: **Sra. Rosângela Taranger e Sra. Rúbia Gravito Gomes**, por toda atenção e orientação metodológica.

*“Deus não escolhe os capacitados,
Mais capacita os escolhidos”*

Resumo

Introdução: Foi claramente estabelecido que a inibição crônica da síntese de óxido nítrico em ratos resulta em um aumento contínuo da pressão arterial, mudanças na contração do miocárdio, reestruturação cardíaca e fibrose. O tratamento experimental em ratos com análogos da L-arginina é um dos modelos mais comuns utilizados para se induzir a hipertensão. A resposta compensatória esperada contra os aumentos da resistência no sistema vascular seria a hipertrofia ventricular esquerda. Entretanto, a presença da hipertrofia cardíaca induzida pelo modelo com L-NAME ainda é controverso. O objetivo do presente estudo foi verificar os efeitos da inibição de óxido nítrico através da administração oral de L-NAME em tecidos cardíacos de ratos, e a possível prevenção por L-Arginina. **Métodos:** Foram utilizados 30 ratos Wistar machos pesando entre 250 e 350g. Salina, L-NAME e L-NAME + L-Arginina foram oralmente administradas por gavagem diariamente por 4 semanas. No final do tratamento os animais foram anestesiados, traqueostomizados, entubados com tubo de polietileno, imobilizado com brometo de pancurônio e ventilados artificialmente. A veia jugular direita estava cateterizada para permitir a injeção intravenosa de drogas. A pressão arterial foi monitorada continuamente através de um cateter colocado na artéria carótida esquerda e conectada a um transdutor de pressão arterial, e registrado em um polígrafo. A pressão pulsátil foi obtida diretamente do registro, e a pressão arterial média foi calculada. A taxa cardíaca foi avaliada a cada 5 minutos através das batidas do coração, direto do registro, aumentando a velocidade do indicador. Após o final dos registros hemodinâmicos os animais foram sacrificados por uma dose letal de anestésico. Após o sacrifício, os corações foram removidos e lavados com solução salina (0,9%, P/V) para a remoção de coágulos. Logo depois, os corações foram analisados minuciosamente para separar o átrio e o ventrículo, obtendo o peso total do coração. Após a retirada do ventrículo, a parte restante era pesada, para obter o peso do coração. A avaliação quantitativa do colágeno do miocárdio foi feita através do material obtido do ventrículo esquerdo. As amostras do coração foram fixadas em formol e desidratadas em banho de álcool, logo depois fragmentos do coração foram deixados em xilol por 4 horas. Os corantes Hematoxilina- Eosina (H.E.) e Sirius Red foram usados. Após a coloração das partes, foram montadas em lâminas permanentes para posterior análise em luz de microscopia e fotografado através de sistema de microfotografia. O equipamento usado para a Espectroscopia Raman foi FT-Raman Spectrometer RFS 100. **Resultados:** A administração de L-NAME induz a severa hipertensão, que poderia ser revertida parcialmente por L-Arginina. Nós não observamos hipertrofia cardíaca, mas análises histológicas mostraram um vasto e difuso aumento de colágeno intersticial no grupo tratado com L-NAME, que foi parcialmente prevenido pela administração de Arginina. Estes resultados foram melhor demonstrado pela Espectroscopia FT-Raman que revelou um definido aumento no conteúdo de colágeno nos corações tratados com L-NAME. **Conclusão:** Concluindo, nossos resultados demonstraram que a inibição da NO-sintase foi capaz de produzir um abundante remodelamento cardíaco mas sem a hipertrofia esperada. L-Arginina foi capaz de impedir o remodelamento cardíaco induzido pelo L-NAME assim como as mudanças nos parâmetros hemodinâmicos. **Palavras-Chave:** Hipertensão, Óxido Nítrico, L-Arginina, Remodelamento Cardíaco.

Abstract

Introduction: It has been clearly established that chronic inhibition of nitric oxide synthesis at least in rats results in a sustained increase in blood pressure, changes in myocardial contractility, cardiac remodeling and fibrosis. The experimental treatment of rats with L-Arginine analogs one of the most common model employed in order to induce hypertension. The expected compensatory response against increases in systemic vascular resistance would be the left ventricular hypertrophy. However, the presence of cardiac hypertrophy in L-NAME-induced model of hypertension still controversial. The aim of the present study was to verify the effects of nitric oxide inhibition through oral L-NAME administration on the cardiac tissue of rats, and the possible prevention by L-Arginine. **Methods:** Thirty male Wistar rats weighing between 250 and 350 g were used. Saline, L-NAME or L-NAME + L-Arginine were orally administered by gavage daily for 4 weeks. At the end of the treatments the animals were anesthetized tracheostomized intubated with a polyethylene tube, immobilized with pancuronium bromide and artificially ventilated. The right jugular vein was catheterized to allow the intravenous injections of drugs. The arterial pressure was monitored continually through a catheter placed in the left carotid artery and connected to an arterial pressure transducer, and registered at a polygraph. The pulsatile pressure were obtained directly of the register, and the mean arterial pressure was calculated. The heart rate was evaluated every 5 minutes by counting the heart beatings, directly from the register, increasing the speed of the recorder. After the end of the hemodynamic recordings the animals were sacrificed by a lethal dose of anesthetics. After the sacrifice, the hearts were removed and washed with saline solution (0,9%, p/v) for the removal of clots. Soon after, the hearts were dissected, to separate atria and ventricles, obtaining the total heart weight. After the retreat of the right ventricle, the remaining part was weighed, to obtain the heart weights. The quantitative evaluation of the myocardial collagen was made through the material obtained from right and left ventricles. The heart samples were fastened in formol and dehydrated in alcohol bathings, soon after heart fragments were left in Xilol for 4 hours. Hematoxylin-Eosin (H.E.) and Sirius red dye were used. After the coloration the courts were mounted in permanent sheets for posterior analysis at light microscopy, and photographed through microphotograph system. The equipment used for Raman spectroscopy was FT-Raman Spectrometer RFS 100. **Results:** The administration of L-NAME induces severe hypertension, that could be reverted partially by L-arginine. We did not observe cardiac hypertrophy, but histological analyses showed a wide but difused increases in interstitial collagen in L-NAME treated group, that was partially prevented by Arginine administration. These results were better demonstrated by FT-Raman Spectroscopy that revealed a sharp increase in collagen contents in L-NAME treated hearts. **Conclusion:** In conclusion, our results demonstrates that NO-synthesis inhibition was able to produce profuse cardiac remodeling but without the expected hypertrophy. L-arginine was able to prevent cardiac remodeling induced by L-NAME as well as the changes in hemodynamic parameters.

Key-Words: Hypertension, Nitric Oxide, L-arginine, Cardiac Remodeling.

Lista de Gráficos

Gráfico 1- Pressão arterial sistólica em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações).....	31
Gráfico 2- Pressão arterial distólica em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações).....	33
Gráfico 3- Pressão arterial média em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações).....	35
Gráfico 4- Frequência cardíaca em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações).....	37
Gráfico 5- Duplo Produto em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações).....	39
Gráfico 6- Peso corporal em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações).....	41
Gráfico 7- Peso cardíaco total em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações).....	43
Gráfico 8- Peso do ventrículo esquerdo em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações).....	45
Gráfico 9- Peso cardíaco relativo em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações).....	47
Gráfico 10- Peso cardíaco relativo em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações).....	49

Lista de Tabelas

Tabela 1- Pressão arterial sistólica em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações).....	31
Tabela 2- Pressão arterial distólica em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações).....	33
Tabela 3- Pressão arterial média em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações).....	35
Tabela 4- Frequência cardíaca em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações).....	37
Tabela 5- Duplo Produto em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações).....	39
Tabela 6- - Peso corporal em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações).....	41
Tabela 7- Peso cardíaco total em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações).....	43
Tabela 8- Peso do ventrículo esquerdo em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações).....	45
Tabela 9- Peso cardíaco relativo em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações).....	47
Tabela 10- Peso cardíaco relativo em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações).....	49

Lista de Figuras

Quadro 1- Classificação da Pressão Arterial.....	3
Quadro 2- <i>Parâmetros ajustados com auxílio do Software OPUS 4.2 para a aquisição dos espectros no FT-Raman Spectrometer RFS 100.</i>	28
Quadro 3- Modos Vibracionais e Biomoléculas relacionadas aos picos/áreas dos espectros FT-Raman de músculo cardíaco de rato.....	62
Quadro 4- Relação entre as áreas A1, A2, A3 e A4 dos espectros FT-Raman de tecido muscular cardíaco.....	63
Figura 1- Síntese do óxido nítrico a partir da L-arginina.....	8
Figura 2- Isoformas da No-sintase	9
Figura 3- Esquema de formação do óxido nítrico sob ação das isoenzimas da óxido nítrico-sintase.....	11
Figura 4- FT-Raman Spectrometer RFS 100, Bruker.....	26
Figura 5- Geometria de Espalhamento e Porta Amostra do FT-Raman Spectrometer RFS 100.....	27
Figura 6- Administração de substância por gavagem na qual o tubo flexível ou agulha é introduzido pela entrada gastroesofágica até o estômago. O animal deve estar totalmente imóvel para evitar acidentes.....	30
Figura 7- Corte histológico de um coração representativo do grupo Controle – HE.....	50
Figura 8- Corte histológico de um coração representativo do grupo Controle – HE.....	51
Figura 9- Corte histológico de um coração representativo do grupo Controle – HE.....	52
Figura 10- Corte histológico de um coração representativo do grupo Controle – Picro Síríus Red.....	53
Figura 11- Corte histológico de um coração representativo do grupo Control e – Picro Síríus Red.....	54

Figura 12- Corte histológico de um coração representativo do grupo L-NAME - HE.....	55
Figura 13- Corte histológico de um coração representativo do grupo L-NAME HE.....	56
Figura 14- Corte histológico de um coração representativo do grupo L-NAME Picro Sírius Red.....	57
Figura 15- Corte histológico de um coração representativo do grupo L-NAME Picro Sírius Red.....	58
Figura 16- Corte histológico de um coração representativo do grupo L-NAME Picro Sírius Red.....	59
Figura 17- Corte histológico de um coração representativo do grupo L-NAME+L-Arginina 10mg. – Picro Sírius red.....	60
Figura 18- Corte histológico de um coração representativo do grupo L-NAME+L-Arginina 10mg. – Picro Sírius Red.....	61
Figura 19- Médias dos espectros FT-Raman do ventrículo esquerdo de músculo cardíaco de rato dos grupos Controle, L.NAME+Arg. 10mg, L.NAME+Arg. 30mg, L.NAME+Arg. 100mg e L.NAME sem tratamento. Divisão das Áreas dos espectros Raman: Área 1 (800-1150 cm^{-1}), Área 2 (1150-1380 cm^{-1}), Área 3 (1380-1520 cm^{-1}), Área 4 (1520-1800 cm^{-1}).....	62
Figura 20- Relação entre A2/A4 do Ventrículo Esquerdo.....	63
Figura 21- Relação entre A3/A4 do Ventrículo Esquerdo.....	64

Lista de Abreviações

HA – Hipertensão Arterial

AVC – Acidente Vascular Cerebral

PAS – Pressão Arterial Sistólica

PAD – Pressão Arterial Diastólica

PA – Pressão Arterial

HAS – Hipertensão Arterial Sistólica

JNC- VI – Joint National Commission – VI

HDL – Lipoproteína de Alta Densidade

DC – Débito Cardíaco

RPT – Resistência Periférica Total

EDRF – Fator de Relaxamento Dependente do Endotélio

NO – Óxido Nítrico

C⁺⁺ - Cálcio

O₂ – Oxigênio

GMP_c – Monofostato Cíclico de Guanosina

NADPH – Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo-Fosfato-Hidrogênio

NANC – Nervos não Adrenérgicos não Colinérgicos

NOS – Óxido Nítrico sintase

FAD – Flavinaadenina Dinucleotídeo

FMN – Flavina Mononucleotídeo

P450-like – Heme proteína da Família Citocromo

iNOS – Sintase Neural

eNOS – Sintase Endotelial

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

bNOS – Sintase cerebral

nNOS – Sintase Neural

LPS – Lipopolissacarides

macNOS – Sintase macrófago

N6 – 1-imioetil lisina

NO-hb – Nitrosi Hemoglobina

PGI₂ – Prostaciclina

DHGPE – Doença Hipertensiva Gestacional como Pré-Eclampsia

TXA₂ – Tromboxone A₂

ADP – Adenosina Difosfato

FT-Raman – Transformada de Fourier Raman

CARS – Espectroscopia Raman Anti-Stoks Coerente

IR – Infravermelho

UV – Ultra Violeta

NO₃⁻ - Nitrato

NO₂⁻ - Nitrito

GC – Enzima Guanilato Ciclase

Sumário

1	Introdução-----	1
1.1	Hipertensão Arterial-----	1
1.1.1	Conceito-----	1
1.1.2	Prevalência-----	2
1.2	Classificação da Pressão Arterial-----	3
1.3	Fisiopatologia da Hipertensão-----	4
1.4	Óxido Nítrico-----	5
1.4.1	Produção de Óxido Nítrico-----	7
1.4.2	Função do Óxido Nítrico-----	8
1.4.3	Óxido Nítrico Sintase-----	9
1.4.4	Mensuração do Óxido Nítrico-----	12
1.5	O Endotélio no Controle da Pressão Arterial-----	13
1.6	L-Arginina-----	14
1.6.1	Principais efeitos da L-arginina-----	15
1.6.2	Metabolismo-----	16
1.7	Espectroscopia Molecular-----	17
1.7.1	Espectroscopia Raman-----	17
1.7.2	Efeito Raman-----	17
1.7.3	Espalhamento Raman-----	18
1.7.4	Polarizabilidade-----	18
1.7.5	Instrumentação em Espectroscopia Raman-----	18
1.7.6	Espectroscopia FT-Raman-----	19
1.7.7	Transformata de Fourier-----	19
2.	Justificativa-----	20
3.	Objetivos-----	21
4.	Material e Método-----	22
4.1	Animais-----	22
4.1.1	Grupos experimentais-----	22
4.2	Coleta de Amostras-----	23
4.2.1	Procedimento Cirúrgico e Parâmetros Hemodinâmicos-----	23

4.2.1.1 Administração Intraperitoneal (IP)-----	24
4.2.2 Protocolo de Eutanásia-----	24
4.2.3 Avaliação dos Pesos Cardíacos-----	24
4.3.1 Análise Estatística-----	25
4.2.4 Dosagem de Colágeno-----	25
4.2.5 Obtenção das Amostras-----	25
4.2.5.1 Armazenamento das Amostras antes da Espectroscopia FT-	25
<i>Raman</i> -----	
4.2.6 Obtenção dos Espectros FT-Raman-----	25
4.2.6.1 Espectrômetros FT-Raman-----	25
4.2.7 Parâmetros do Equipamento-----	27
4.2.8 Preparação das Amostras para Experimento-----	28
4.2.9 Análise dos dados Espectrais-----	29
4.2.10 Análise Histológica-----	29
4.2.10.1 Microscopia de Luz (óptica)-----	29
4.2.10.1.1 Análise Estatística-----	30
4.2.11. Tratamento via Oral (VO) e Gavage-----	30
5. Resultados-----	31
6. Discussão-----	66
7. Conclusão-----	72
Referências Bibliográficas-----	73
Anexo-----	87

1. Introdução

A hipertensão arterial (HA) é considerada como um fator de risco primário para doenças cardiovasculares (acidente vascular cerebral (AVC), insuficiência cardíaca congestiva, angina, insuficiência renal e infarto do miocárdio) podendo ocorrer em todas as idades e em ambos os sexos, mas de acordo com Stamler (1993) indivíduos adultos são os que mais sofrem de pressão arterial alta ($\geq 140/90$ mmHg). Nos dizeres de Kannel (1992) a doença cardíaca é entre as doenças cardiovasculares a mais comum consequência da HA.

Os eventos vasculares possuem uma relação contínua entre a pressão arterial e um maior risco cardiovascular, relacionando um menor risco para adultos com pressão arterial sistólica (PAS) abaixo de 120 mmHg e pressão arterial diastólica (PAD) abaixo de 80 mmHg (STAMLER, 1993). O modelo Framingham usado para previsão do risco da HA prediz a PAS com um importante fator de risco relacionado na ocorrência de doenças coronarianas significativas (KANNEL, 1992). A elevação da pressão arterial (PA) pode causar disfunção do endotélio vascular e lesão que pode levar uma migração de elementos aterogênicos, incluindo LDL, monócitos e macrófagos. Uma análise de alguns dos principais ensaios randomizados de terapia anti – hipertensiva demonstrou uma redução de 42% na incidência de AVC e uma redução de 14% nos casos de doença cardíaca coronariana (COLLINS, 1990; MACMAHON, 1993; MANDARIM-DE-LACERDA, 1997).

1.1 Hipertensão Arterial

1.1.1 Conceito

É um conceito de entidades com etiopatogenia multifatorial, podendo ser primária, criptogenética ou essencial (90%), ou ainda secundária (10%), que possuem como características o aumento sustentado da pressão arterial sistodiastólicas ou somente sistólicas acima da considerado normal para a idade, eventualmente esse aumento sustentado está associado a alterações metabólicas, hormonais e a fenômenos tróficos miocárdicos e vasculares (remodelamento), em especial nos órgãos – alvo (olhos, coração, cérebro, rins e artérias periféricas) que são causadas pelo aumento do

débito cardíaco, do volume intravascular e/ou da resistência periférica total, que são considerados por fatores endócrinos, neurócrinos e autócrino – parácrinos (RIERA, 2000).

1.1.2 Prevalência

A HA atinge cerca de um quinto da população adulta (20%). Em nosso país, por volta de 15 (10%) a 30 (20%) milhões de pessoas possuem essa patologia (BRASIL, 1993), e em crianças e adolescentes observa-se 7% e por volta de 65% nos idosos, já em mulheres acima de 75 anos pode chegar a 80% (RIERA, 2000).

A HA é muito mais severa e freqüente (estima-se em 25%) na raça negra e em ambos os sexos, se compararmos a mulher negra com a mulher branca a prevalência é ainda maior na negra (RIERA, 2000).

Os negros possuem um risco quatro vezes maior de sofrer doença renal terminal em comparação com os brancos, além de apresentarem 80% do aumento nos casos de AVC letais e cerca de 50% de óbitos por cardiopatia A HA é o fator mais importante para doença cerebrovascular, responsável por 65% das mortes por Acidente Vascular Cerebral (AVC) (JARDIM, 1997).

De acordo com Latufo (1996) e col., a HA é inversamente proporcional a escolaridade e renda, quanto maior o grau de instrução e capacidade econômica, menor a incidência, devido ao maior cuidado com a saúde. Essa seria uma explicação parcial da maior prevalência entre negros americanos quando comparado com brancos.

Cerca de 50% dos hipertensos ignoram a sua condição de doentes, dos 50% que são cientes, metade não se tratam, e os que se tratam, 55% possui um controle das cifras da pressão arterial e desta forma conclui-se que apenas 15% dos hipertensos têm controle efetivo da pressão arterial (JARDIM, 1997).

A prevalência relaciona-se com o índice de massa corporal e em particular no homem caucasiano e na mulher negra. O componente genético hereditário quase sempre está presente, dessa forma, se um dos pais é hipertenso, um de cada três descendentes o será e se ambos os genitores o são, dois a cada três filhos o serão (LATUFO, 1996).

Vale a pena ressaltar que a primeira causa de forma isolada de aposentadoria em nosso país é a hipertensão arterial sistólica (HAS) com 19% do total.

1.2 Classificação da pressão arterial

De acordo com as diretrizes do Joint National Commission – VI (JNC-VI) é necessário uma abordagem de caráter agressivo no tratamento da hipertensão, especialmente quando ocorrer danos nos órgãos – alvo, diabetes ou doença cardiovascular clínica (JNC-VI, 1997). A Pressão Arterial (PA) foi reclassificada pela JNC-VI em 1997 como esboçado no Quadro 1 em categorias de riscos para a hipertensão (JNC-VI, 1997).

Quadro 1. Classificação da Pressão Arterial:

Recomendações de Joint National Commission ou detection, Evolution and Treatment of Hypertension.

Categoria de pressão arterial	Sistólica (mmHg)	Diastólica (mmHg)
Ótima	< 120	< 80
Normal	120 – 129	80 – 84
Normal alta	130 – 139	85 – 89
Hipertensão arterial		
Estágio 1 (leve)	140 – 159	90 – 99
Estágio 2 (moderado)	160 – 179	100 – 109
Estágio 3 (grave)	180 – 209	110 – 119
Estágio 4 (muito grave)	> 201	> 120

(JNC-VI, 1997).

A HA encontrada no estágio 1 é a forma mais prevalente da pressão arterial alta. Entretanto todos os estágios estão diretamente associados a um maior risco as doenças cardiovasculares e de insuficiência renal (STEWART, 2003). As principais mudanças na nova classificação são o reconhecimento da PAS abaixo de 120 mmHg e uma PAD inferior a 90 mmHg passarem a ser consideradas ótimas.

Segundo Roberts (1987), a HA leva os pacientes a desenvolver a doença arterial coronariana causada por lesão vascular direta e pelos efeitos adversos pelo miocárdio, que vem à incluir um aumento do estresse parietal e um aumento da demanda de oxigênio pelo miocárdio. Faz-se necessário importantes modificações no estilo de vida como: redução ponderal, maior prática de atividade física e baixa ingestão de sódio e álcool, os quais são itens recomendados como terapia tanto definitiva como coadjuvante para a hipertensão arterial (JNC – VI, 1997).

Kannel (1992), sugere que o risco de doença coronariana nos pacientes hipertensos possui um nível mais elevado naqueles que possuem uma alta relação de colesterol total para colesterol lipoprotéico de alta densidade (HDL), e ainda uma tolerância à glicose deteriorada, fibrinogênio alto, anormalidades eletrocardiográficas, tabagismo e por esses motivos, pessoas hipertensas são mais propensas a desenvolverem o AVC, uma vez que já possuem doença cardiovascular, diabetes, fibrilação atrial, hipertrofia ventricular esquerda.

1.3 Fisiopatologia da Hipertensão

A hipertensão essencial é a forma mais comum desta patologia e é caracterizada por uma PAD elevada e uma vasoconstrição arteriolar geral correlata que faz aumentar a Pressão Arterial Sistólica (PAS). Não há uma causa única da hipertensão essencial, mas podemos dizer que a Pressão Arterial (PA) é determinada pelo produto do Duplo Produto (DC) e uma Resistência Periférica Total (RPT). Entre os fatores já citados anteriormente, e outros relacionados com a hipertensão arterial, estão a obesidade, uma alta ingestão de sal, baixa ingestão de potássio, inatividade física, consumo exacerbado de álcool e estresse psicossocial (PERRY, 1994). Segundo Visser (1994); Mediratta (1995), o acúmulo de gordura visceral intra-abdominal e a hiperinsulinemia estão relacionados com a patogênese da HA.

A HÁ estabelece uma pós-carga ao coração, como resultado ocorre uma maior espessura da parede ventricular esquerda (hipertrofia concêntrica) e enchimento ventricular reduzido (LIEBSON, 1993; MISSAULT, 1993). Um outro fator que altera a massa ventricular esquerda e o enchimento diastólico é o envelhecimento, e a combinação da HA e a idade avançada, como comentado anteriormente, e esse fator

aumenta sensivelmente os riscos de doenças coronarianas e de insuficiência cardíaca (MESSERLI, 1993).

Devido aos riscos para a saúde potencializados pela HA, o tratamento medicamentoso anti-hipertensivo, se torna necessário para otimizar os resultados.

1.4 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é considerado como uma das menores e uma das mais simples moléculas biosintetizada, sendo um radical livre, incolor, inorgânico, com sete elétrons de nitrogênio e oito de oxigênio um elétron desemparelhado.

Devido ao aumento do interesse das funções biológicas do NO, surgiram três linhas de pesquisas independentes.

Na primeira linha de pesquisa trabalhos relacionaram o papel do endotélio vascular no processo de relaxamento do vaso sanguíneo. O interesse por esta questão originou-se em uma pesquisa realizada por Furchgott; Zawadzki (1980), o qual demonstrou que o relaxamento vascular induzido por acetilcolina foi dependente do endotélio e evidenciou-se que o efeito demonstrado foi mediado por um fator humoral lábil, sendo conhecido como fator de relaxamento dependente do endotélio (EDRF). Rapoport e Murad (1983), sugeriram que o mecanismo EDRF, o qual causava relaxamento vascular era mediado pela guanosina monofosfato cíclica (GMP_c), sete anos após a descoberta do EDRF, Palmer (1987); Ignarro (1987), demonstraram que esse fator de relaxamento derivado do endotélio era um radical livre, o NO. Foi sugerido que o EDRF e o NO eram indistinguíveis na atividade biológica, estabilidade química e suscetividade à inibidores ou potencializadores e que ambos tinham sua ação inibida pela hemoglobina (proteína que contém o núcleo heme) e ainda que eram potencializados por superóxido dismutase (GREEN, 1981a, 1981).

Antes do trabalho realizado por Rapoport e Murad (1983), dois grupos de pesquisadores, Katsuki e col. (1977) e Schulte e col. (1977), utilizaram os nitratos orgânicos e a nitroglicerina como tratamento da angina pectoris, insuficiência cardíaca congestiva, hipertensão pulmonar e outras complicações vasculares, no qual os dois grupos chegaram a conclusão de que os nitratos orgânicos induziam a um aumento nos níveis de GMP_c utilizada e ainda que estes mesmos compostos, a princípio, eram

inativos e que sua metabolização resultava na produção de NO. Após algum tempo, esses mesmos investigadores chegaram a conclusão que o NO era uma molécula efetora comum a todos os nitrovasodilatadores, resultando assim, na dilatação das artérias coronárias, melhorando o suprimento sangüíneo ao coração e, como conseqüência, alívio dos sintomas. Katsuki e col. (1977) confirmaram que o mecanismo pelo qual tais compostos causavam vasodilatação estava relacionado com a ativação da enzima guanilato ciclase (GC), que é mediada por NO, com o conseqüente acúmulo de GMP_c.

A Segunda linha de pesquisa levava em consideração a produção de óxidos de nitrogênio pelos mamíferos, no qual Shmidt e Walter (1994), sugeriram que os mamíferos seriam capazes de produzir óxidos de nitrogênio, uma vez demonstrado que a quantidade eliminada destes compostos seria maior que a quantidade ingerida. Acreditava-se que óxidos de nitrogênio inorgânicos só poderiam ser produzidos por bactérias através de reações de nitrificação e denitrificação e que estes compostos seriam derivados na dieta dos mamíferos (SZABÓ, 1995). Bredt e Snyder (1992), relataram que organismos humanos seriam capazes de converter nitrato (NO₃⁻) e nitrito (NO₂⁻) da dieta em nitrosaminas carcinogênicas logo após a reação do NO₂⁻ com aminas, esses achados corroboraram para um grande temor, modificando hábitos alimentares, a onde alimentos curados foram excluídos da dieta. Esse temor aumentou quando experimentos realizados em camundongos e em seres humanos, os quais, foram tratados com uma dieta pobre em NO₃⁻ e mesmo assim os grupos pesquisados excretavam uma quantidade substancial deste mesmo composto, comprovando dessa maneira a produção de NO₃⁻ em mamíferos. Mais tarde, ficou demonstrado a produção de NO₃⁻ em camundongos isentos de germes, e uma outra pesquisa do balanço metabólico, deixou comprovado a biossíntese de NO₃⁻ em homens saudáveis (KNOWLES, 1989).

Pesquisas posteriores, realizadas por Hibbs (1987) e col., determinaram a verdadeira origem do NO₃⁻, relacionando a L-arginina como o aminoácido de caráter essencial para a sua produção. Palmer e col. (1988) evidenciaram que a L-arginina era o precursor fisiológico do NO nas células endoteliais, levando em consideração nesses achados, alguns grupos de pesquisadores suspeitavam que o NO se tratava do provável precursor da síntese de NO₃⁻ e NO₂⁻ em macrófagos.(HIBBS, 1988; KICHLER, 1993; MACMORON, 1993).

A terceira e última linha de pesquisa referida, associa-se à investigação do mecanismo de ação de neurotransmissores. Ferrendelli (1974) e col. relataram que um conhecido neurotransmissor, o glutamato, seria capaz de aumentar o GMP_c no sistema nervoso central. Nessa época não se tinha nenhum conhecimento do NO como molécula mensageira e também não se tinha conhecimento da sua formação a partir da arginina.. Estabelecido a via L-arginina e NO (PALMER, 1988) e ainda do paralelismo entre a síntese do NO e do acúmulo de GMP_c (RAPOPORT, 1983) junto as células endoteliais, fizeram com que vários grupos de pesquisas investigassem a existência desta via no sistema nervoso central. Em meados de 1989, confirmou-se a produção de NO no sistema nervoso (BREDT, 1989; FURCHGOTT, 1980; RTHWAITE, 1989). No ano seguinte foi isolado a óxido nítrico sintase (NOS), responsável pela formação de NO.

Através dos achados dessas três linhas de pesquisa, o NO ultrapassou a condição de uma molécula sem importância biológica e pouco estudada para um patamar de molécula mediadora de importantes processos intra e extracelulares (IGNARRO, 1990).

1.4.1 Produção de Óxido Nítrico

A arginina é utilizada pelas células com a finalidade de sintetizar o NO (WU, 1998; PALMER, 1988). Através da presença de oxigênio molecular a L arginina sintetiza o radical livre e gasoso, NO, e L – citrulina em um processo catalisado pela enzima óxido nítrico sintase pelas células do endotélio vascular (KUO, 1995).

O NO atravessa o endotélio e chega ao músculo liso vascular estimulando a enzima guanilato ciclase solúvel e a formação de GMP_c (monofosfato cíclico de guanosina) intracelular, e a consequência desta reação é o relaxamento das células da musculatura lisa vascular (LYONS, 1995; CONGER, 1994).

O aumento dos níveis de GMP intracelular é capaz de interromper a ligação do cálcio com complexo actina-miosina, e conseqüentemente, induzir vasodilatação através do relaxamento das células da musculatura lisa vascular (CERQUEIRA, 2002). Se o NO aumentado provoca uma vasodilatação a sua formação diminuída provocará uma vasoconstrição moderada (WENNMALN, 1994). De acordo com Wong (1996) o efeito vasodilatador do NO parece depender de estímulos físicos do fluxo pulsátil e força de cisalhamento nas células endoteliais vasculares.

As células musculares lisas também produzem NO e dessa forma regulam a atividade dessas células por um mecanismo dependente da GMP_c (MOLLACE, 1991).

Na figura 1 é demonstrado a reação química na qual é formado o NO. A L-arginina é transformada em um intermediário, N^g-hidroxi-L-arginina com presença de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-hidrogênio (NADPH) e C⁺⁺ e O₂.

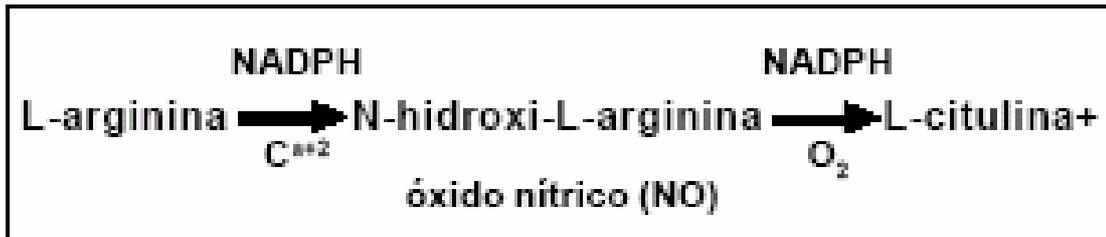


Figura 1: Síntese do óxido nítrico a partir da L-arginina.

1.4.2 Função do Óxido Nítrico

O NO possui funções como: citotoxicidade mediada por macrófagos, inibição da atividade, adesão e agregação plaquetária, relaxamento do corpo cavernoso peniano humano, regulação da pressão sanguínea basal etc (CERQUEIRA, 2002). A atividade do NO foi descrita no endotélio, cérebro, nervos não adrenérgicos não colinérgicos (NANC), macrófagos, neutróficos, rins, células epiteliais pulmonares, mucosa gastrointestinal e miocárdio (KIECHELE, 1993; BARRACINA, 2001; SHAPIRA, 1994), e também atua na vasodilatação presente na angiogênese fisiológica ou patológica (ZICHE, 2000).

No cérebro, o NO está envolvido no aprendizado e na memória, no trato gastrointestinal no relaxamento não adrenérgico não colinérgico nas musculaturas longitudinal e circular do esfíncter esofágico (ADAMS, 1996; MEGNIEN, 1996).

No sistema respiratório, o NO exerce um controle neurogênico da broncodilatação, no sistema reprodutor, possui controle no relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso peniano e seus vasos sanguíneos aferentes (ADAMS, 1996).

No sistema circulatório está envolvido na coagulação sanguínea e na cascata fibrinolítica e trombótica relacionado a dano endotelial (KUO, 1995; LOSCALZO, 2001; NATHAN, 1992).

Nos vasos sanguíneos, atua na modulação do diâmetro vascular, na resistência vascular e no relaxamento vascular (COOKE, 1993; CHESTER, 1990).

As artérias e as arteríolas produzem mais NO em relação as veias e vênulas e a vasodilatação causada pelo cisalhamento é considerado maior nas artérias se comparada com as arteríolas e vasos resistentes (WENNMALIAN, 1994), porém nas artérias ocorre uma liberação contínua de NO, dessa forma mantendo o tônus dilatador (MONCADA, 1991; SNYDER, 1992; MULKOW, 1994).

1.4.3 Óxido Nítrico Sintase

A óxido nítrico sintase (NOS) é a enzima responsável pela síntese de NO. A NOS é encontrada em três isoformas, sendo que uma NOS induzida (iNOS) e duas NOS constitutivas (eNOS) (KIECHELE, 1993; WONG, 1996).

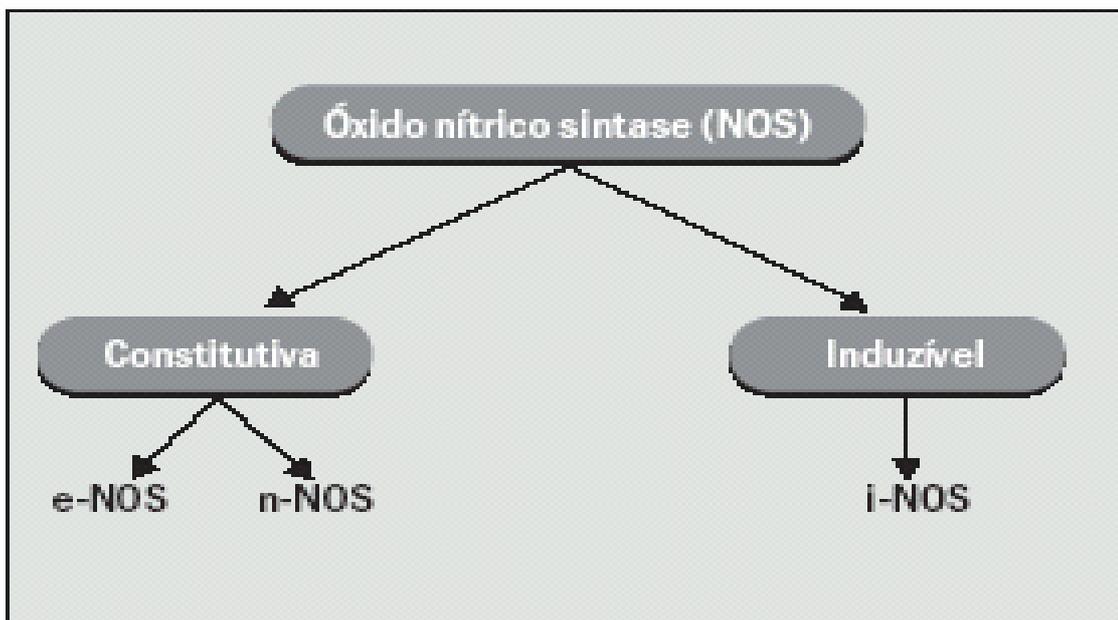


Figura 2: Isoformas da No-sintase

As NOS são inibidas por análogos da L arginina (MONCADA, 1991) e seus cofatores são NADPH, tetrahydrobiopterina (BH4), flavinaadenina dinucleotódeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e hemeoproteínas da família citocromo P450-like (FARREL, 1996; FLORA FILHO, 2000).

Isoforma I ou óxido nítrico - sintase neuronal (nNOS)

É uma isoforma constitutiva que está presente nas células neuronais centrais e periféricas, células epiteliais, sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP) e outros, sua atividade é regulada por Ca^{++} e calmodulina (VIARO, 2000), Tem como função a regulação duradoura da transmissão sináptica no sistema nervoso central, regulação da pressão sanguínea (VIARO, 2000) e atua no relaxamento do músculo liso e na vasodilatação via nervos nitrérgicos periféricos (FÖRSTERMANN, 1994; NUMAGUCHI, 1995).

Na literatura esta isoforma também pode ser chamada de bNOS (brain NO syntase) ou nNOS (neuronal NO synthase) (KONTUREK, 1995).

Isoforma II ou óxido nítrico – sintase induzida (iNOS)

Esta enzima é manifestada em macrófagos, células endoteliais, células da musculatura lisa vascular e miócitos cardíacos, depois de estimulação com lipopolissacárides (LPS) e citoquinas, devido a estas características tem um importante papel em atividade antimicrobianas, antiparasitárias e antineoplásticas, não é regulada por cálcio (VIARO, 2000; FÖRSTERMANN, 1994) e também pode ser chamada de macNOS (macrophage NO synthase) (KONTUREK, 1995; ZAMIN, 2002).

Isoforma III ou óxido nítrico – sintase endotelial (eNOS)

É uma isoforma constitutiva e tem como função produzir NO no endotélio vascular em condições basais e força de cisalhamento causado pelo fluxo sanguíneo pode vir a aumentar a sua produção (FÖRSTERMANN, 1994). A sua função é a regulação do tônus vascular e da função plaquetária e é regulada pela concentração de cálcio livre intracelular e pelo complexo Ca^{++} -calmodulina (VIARO, 2000) e também encontrada como cNOS ou ECNOS (endothelial constitutive NO synthase) (KONTUREK, 1995).

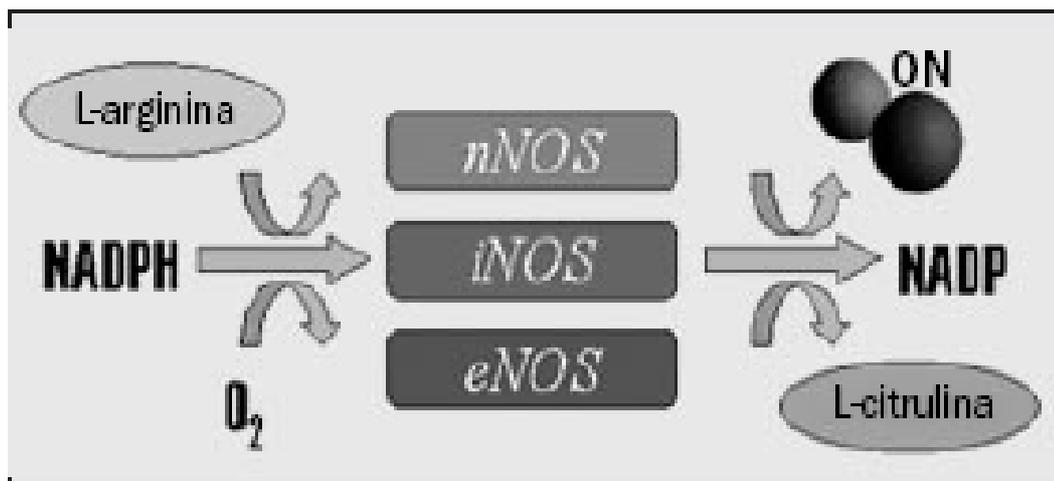


Figura 3: Esquema de formação do óxido nítrico sob ação das isoenzimas da óxido nítrico-sintase.

Inibidores inespecíficos:

Inibem tanto a ecNOS como a iNOS, são derivados metilados e nítricos da L-arginina, e atuam por competição (KOSHLAND, 1992). Os mais conhecidos são o L-NMMA, e o L-NOARG.

Inibidores específicos:

Inibem especificamente a isoforma iNOS. São a aminoguanidina, a L-canavanina, a N6-(1-imioetil)lisina(L-NIL) e a 2,4-diamino 6-hidríxi-pirimidina (PERRY, 1994)

1.4.3.1 Anatomia e funções autócrinas e parácrinas da NOS no coração normal

- **ecNOS:** a maior parte de sua atividade no coração está no endotélio ao longo da rede de artérias, veias e capilares do miocárdio e está presente na camada endocárdica das cavidades cardíacas. Esta isoforma inibe o tônus contrátil e a proliferação de células musculares lisas subjacentes dos vasos, inibe a agregação plaquetária e a adesão de monócitos, promove relaxamento diastólico e diminuição do consumo de oxigênio no músculo cardíaco através de ação parácrina do NO e ainda é expressada de maneira

constitucional nos miócitos cardíacos de roedores e em humanos, opondo-se autocrinamente à ação inotrópica de catecolaminas após estimulação muscarínica colinérgica e estimulação de receptores beta-adrenérgicos. (VIARO,2000).

- **nNOS**: esta isoforma é menos proeminente no coração. É expressa em terminações simpáticas normais e regula a liberação de catecolaminas no coração (VIARO,2000).

- **iNOS**: não está presente no coração normal, mas esta isoforma está relacionado com macrófagos devido a remodelamento após lesões cardíacas. Participa na defesa imunológica contra microorganismos intracelulares e vírus, NO produzido autócrina e parácrinamente modulam a vasoplegia e a depressão miocárdica características da estimulação do sistema imune e promove morte celular através da apoptose (VIARO,2000; RODRIGUES, 2001).

1.4.4 Mensuração do Óxido Nítrico

O NO é determinado com base em efeitos fisiológicos, como o relaxamento dos vasos sangüíneos ou pode ser avaliado por análogos da L-arginina ou hemoglobina (ARCHER, 1993; BODE-BÖGER, 1996;HIBBS, 1988).

Vários métodos estão sendo utilizados e as mais avançadas tecnologias estão sendo propostos na literatura frente a determinação de NO, tanto direta como indiretamente, utilizando ensaios que reflitam a sua presença. As determinações diretas do NO estão sendo obtidos utilizando metodologias complexas, tais como, a ressonância eletrônica para-magnética (EPR) e a quimioluminescência) e também utilizando detecção eletroquímica, através de sensores intravasculares (KIECHLE, 1993).

A sua produção também pode ser medida de forma indireta por isótopos estáveis no plasma ou excretados na urina (nitrito e nitrato) devido a administração de arginina marcada (BEAUMIER, 1995; FORTE, 1998), por GMP_c, do co-produto (l-citrulina), detecção de nitrosol hemoglobina (NO-hb) nas hemácias circulantes, da quantificação histoquímica da NOS. Da determinação da atividade da NOS, da avaliação de suas ações fisiológicas, tais como, relaxamento vascular e a inibição da agregação

plaquetária, através do uso de inibidores da NOS (ARCHERS, 1996; DUSSE, 1998; KIECHLE, 1993).

1.5. O endotélio no controle da Pressão Arterial

O endotélio vascular tem como importante função o controle da resistência periférica e, neste caso, na regulação da pressão arterial sistêmica. As células endoteliais participam de forma direta nos mecanismos contráteis e relaxadores da microcirculação, e isso se dá através da produção de substâncias vasoativas que atuam localmente e modulando o tônus das células musculares lisas da parede dos vasos adjacentes. Essas substâncias vasoativas são ativadas por alterações nas concentrações de mensageiros intracelulares (monofosfato cíclico de guanosina (GMP_c) e cálcio, através de interações das células endoteliais com constituintes do plasma (por ex.: plaquetas)(ADYAMA, 2003; GAYOTTO, 2001).

As substâncias vasoativas são classificadas da seguinte forma::

Fatores relaxantes: (NO, prostaciclina (PGI₂) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio) (BARRON, 1995; LOSEKANN, 1997; MONCADA, 1993).

Fatores constritores: (endotelina, tromboxone, angiotensina II) (BARRON, 1995; LOSEKANN, 1997; MONCADA, 1993).

O endotélio vascular, possui também, função de inativar substâncias vasoativas, como a serotonina e bradicinina. Na gênese da hipertensão arterial sistêmica e na doença hipertensiva gestacional como pré eclampsia (DHGPE) pode-se evidenciar alterações e desequilíbrio na síntese endotelial de vasodilatadores e vasoconstritores (BURROW, 1995). A HA pode ser causada por disfunção da célula endotelial, ocasionando um aumento de agentes vasoconstritores, como a endotelina, ou por uma reduzida liberação de agentes vasodilatadores, como NO (MONCADA, 1993; SELLINGMAN, 1994)

A formação do ácido aracdônio, a partir de fosfolídeos da membrana celular é um outro e importante mecanismo no controle da contração e no relaxamento da

microcirculação. Através da ação do ciclo – oxigenase sobre o ácido aracdônio, são liberados uma série de metabólitos (entre eles estão a PGI₂ e o tromboxone A₂ (TXA₂)), que podem levar a vasoconstrição ou vasodilatação, a PGI₂ provoca vasodilatação e determina a inibição da agregação das plaquetas ao endotélio e o TXA₂ induz a vasoconstrição e agragação plaquetária, aumentando assim a possibilidade de fenômenos de trombose na microcirculação. A homeostase desses metabólitos, que possuem ações opostas, é responsável pela adequação da atividade das células endoteliais (LOSEKANN, 1997).

1.6. L-Arginina

A L-arginina é um aminoácido semi-essencial, a sua síntese em neonatais e crianças é considerada insuficiente para suprir as necessidades orgânicas dessas faixas etárias, no entanto, a L-arginina é um aminoácido não essencial em indivíduos adultos saudáveis (BORGES, 1990). Mesmo o organismos podendo, normalmente, sintetizar a L-arginina em quantidades adequadas, sob determinadas condições, a ingestão deste aminoácido pode ser favorável para o crescimento óptimo de certos mamíferos (VAN BUREN, 1990).

A L-arginina assume um caráter essencial como nutriente para indivíduos traumatizados e influencia os componentes imunológicos por possuir propriedades tecido específicas (BORGES, 1990; DALY, 1990).

A administração de L-arginina associa-se aos efeitos imunoestimuladores, anti-tumorais e efeitos anabólicos com uma melhora de alguns processos traumáticos (DALY, 1990).

Além de participar do ciclo da uréia, a L-arginina também é utilizada para sintetizar a creatinina e fornecer ornitina para que poliaminas sejam sintetizadas. Pelo fato da L-arginina ser solicitada metabolicamente e de caráter contínuo, existe uma neo-síntese da L-arginina nos túbulos proximais renais a partir da citrulina (FLORA FILHO, 2000).

O aminoácido semi-essencial L-arginina serve como o principal substrato para o eNOS. Muito é conhecido sobre o metabolismo intermediário da L-arginina e o seu papel no balanço do nitrogênio e homeostase, mais recentemente esse aminoácido foi

reconhecido como precursor da NOS, o qual cataliza a oxidação de 5 elétrons da L-arginina para L-citrulina e produzem a quantidade estequiométrica de NO no processo (LOSCALZO, 2000).

A L-arginina é primeiramente convertida em N^G-hidroxi-L-arginina pelo eNOS, e caminhos alternativos para N-hidroxilação da L-arginina podem aumentar a disponibilidade desta reação intermediária, a qual poderia facilitar o movimento do substrato pela enzima e além disso, N^G-hidroxi-L-arginina inibe a arginase e pode dessa forma aumentar os níveis do estado de equilíbrio intracelular da L-arginina (LOSCALZO, 2000). Um outro e possível mecanismo interessante e relevante aos indivíduos com doença aterotrombótica é que o LDL oxidado e a lisofosfatidilcolina diminui o transporte da L-arginina para as células endoteliais, a L-arginina compete com outros aminoácidos cationicos para o transporte para as células, em especial a L-glutamina e a L-arginina aumentada pode vir a aumentar a concentração do substrato intracelular através da melhora de competitividade celular (LOSCALZO, 2000).

Alguns mecanismos indiretos propostos pelo qual a L-arginina aumenta a bioatividade do NO na vasculatura são diversos. A L-arginina aumenta a secreção de insulina, a qual por si só promove uma vasodilatação, além disso a L-arginina estimula a liberação de histamina das células mastócitos, as quais também invocam uma resposta vasodilatadora. (LOSCALZO, 2000). Administrando sal de ácido hidrocloreto, a L-arginina induz uma acidose extracelular a onde pode alterar o pH intracelular e assim afetar os caminhos de sinalização celular dependente de pH, incluindo a transferência de cálcio, que modula a síntese de eNOS ativo e NO, por último, a L-arginina pode atenuar a atividade da norepinefrina aumentando os efeitos vasos dilatadores endógenos, incluindo o NO (LOSCALZO, 2000).

1.6.1 Principais efeitos da L-arginina

Os principais efeitos da L-arginina são:

a) Promeve ação timotrófica (BARBUL, 1983; MADDEN, 1988).

b) Mantém a função imunológica das células T pós trauma, ou ainda, diminui de forma marcada a imunossupressão que está associada a essa condição (MADDEN, 1988; BARBUL, 1990; DALY, 1988).

c) Estimula o processo de cicatrização (BARBUL, 1983; BARBUL, 1990; BORGES, 1990)

d) Promove atividade anti-tumoral (DALY, 1990; DUDRICK, 1991; VAN BUREN, 1990).

Através dos efeitos da L-arginina, em várias vias metabólicas dos processos celulares, ditas como síntese protéica, síntese de poliamina e creatina, síntese de nitrito, reações de ribosilação da adenosina difosfato (ADP) e através da secreção de hormônios (hormônio do crescimento, prolactina, insulina, glicagina e catecolaminas), resultam o potencial de sua influência.

1.6.2 Metabolismo

O metabolismo da L-arginina está relacionada com os aminoácidos ornitina e citrulina. A L-arginina é obtida por via exógena e endógena, estando esta relacionada com as enzimas hepáticas e renais do ciclo da uréia (BORGUES, 1990). De acordo com Van Buren (1990), através da via endógena, pequenas quantidade de L-arginina são liberadas pelo fígado, devido a uma elevada atividade da arginase hepática, que a metaboliza em ornitina e citrulina, sendo esta lançada na circulação (VAN BUREN, 1990). A citrulina é por sua vez captada da circulação dos rins (80%) e metabolizada em L-arginina. Esta é posteriormente liberada para a circulação podendo participar da síntese protéica tecidual (BORGUES, 1990; VAN BUREN, 1990). Já através da via exógena, após a L-arginina é absorvida no intestino e transportado pela membrana basolateral dos enterócitos para o fígado (sistema porta) sendo capturado rapidamente pela circulação esplânica (CASTILLO, 1993). A L-arginina é absorvida por intermédio de transportadores de aminoácidos do epitélio intestinal (SOUBA; PACITTI, 1992). Com a concentração de arginina no lúmen do intestino aumentado, os carreadores

ficam saturados e, através de um sistema de difusão simples, o aminoácido é transportado através das membranas celulares (INOUE, 1993; SAUBA, PACITTI, 1992).

1.7 Espectroscopia Molecular

A espectroscopia investiga a relação da radiação eletromagnética com a matéria, um dos seus principais objetivos seria a determinação dos níveis de energia de átomos ou moléculas. De forma direta, obtém-se as diferenças entre estes níveis de energia a partir de medidas que determinarão as posições relativas dos níveis energéticos. Em relação as moléculas, a região espectral onde observa-se estas transições depende do tipo de níveis energéticos envolvidos, tais como: eletrônicos, vibracionais e/ou rotacionais, dessa forma, as vibrações moleculares poderão ser medidas através de diferentes técnicas como: a Espectroscopia de Absorção Eletrônica, Espectroscopia de Fluorescência, Espectroscopia de Absorção no Infravermelho, Espectroscopia Raman e variáveis desta mesma técnica (SALA, 1995).

1.7.1 Espectroscopia Raman

As formas espectroscópicas, de forma geral, fornecem dados de forma detalhada em relação aos níveis de energia dos espécimes analisados. No caso da Espectroscopia Vibracional Raman, a sua vantagem está na aquisição de uma maior gama de detalhes proporcionada pelos níveis de energia vibracional frente aos níveis de energia eletrônica, enquanto a Fluorescência, os espectros eletrônicos são formados por bandas largas e usualmente sem estrutura, os vibracionais Raman representam a “impressão digital” das moléculas (FARIA; SANTOS, 1997).

1.7.2 Efeito Raman

O efeito produzido pelo Raman é o espalhamento inelástico da luz produzido por íons, átomos e moléculas relacionado à mudança de frequência da luz incidente quando espalhada, desta maneira, existem alguns movimentos que constituem o conjunto de

modos vibracionais normais, como exemplo temos: Modo de Estiramento entre duas ligações atômicas; Modo de Dobramento entre três átomos conectados por duas ligações; Modo de Deformação fora do plano que muda a estrutura da molécula de plana para angular (SALA, 1995).

A Espectroscopia Raman fundamenta-se no fenômeno no qual ocorre uma mudança de frequência da luz quando esta é espalhada pela moléculas. A frequência de deslocamento Raman é equivalente a mudança de energia. Os resultados observados são usualmente expressos em termos de número de ondas e não frequência.

1.7.3 Espalhamento Raman

A luz espalhada apresenta o mesmo comprimento de onda da luz incidente em sua maior parte, este espalhamento é conhecido como elástico ou Rayleigh, porém poderá apresentar um comprimento de onda diferente da luz incidente, constituindo um espalhamento inelástico ou Raman (SALA, 1995).

1.7.4 Polarizabilidade

Para que um modo vibracional possa ser Raman ativo é necessário a variação da polarizabilidade de uma molécula durante a vibração, ou seja, o momento de dipolo a ser considerado é induzido pela radiação eletromagnética (SALA, 1995).

1.7.5 Instrumentação em Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman necessita do uso de fontes de luz monocromática.

A Espectroscopia Raman pode ser classificada em ultra violeta (UV), visível e Infra-Vermelho (IR), baseada por sua fonte de luz utilizada. Nas áreas biológicas, biomédicas, as aplicações da Espectroscopia Raman são mais utilizadas nas fontes de excitação na área do Infravermelho, devido à propriedade física de se conseguir uma diminuição virtual da emissão de auto- fluorescência de enzimas presentes nos tecidos biológicos (SCHRADER, 1989; SCHADER, 1995; SCHADER; MOORE, 1997; SCHARDER, 1997).

1.7.6 Espectroscopia FT-Raman

Quando os sinais Raman são obtidos a partir de amostras biológicas, esses sinais se tornam mais fracos, a emissão de fluorescência acaba por ser a maior interferência para as medidas de Espectroscopia Raman (ALCANTARA, 2002). No sinal Raman convencional, aonde para excitação utiliza-se lasers de radiação visível, por volta de 90% das amostras contidas de impurezas, produzem uma forte fluorescência, dessa forma, marcando o sinal Raman (ANGEL e col, 1995), para corrigir esta fluorescência que é indesejável ao espectro Raman, utiliza-se algumas técnicas: a Espectroscopia Raman com Transformada de Fourier (FT-Raman), qual seria a melhor opção pois mantém a maioria das bandas de absorção dos fluoróforos fora do espectro Raman (ALCANTARA, 2002).

1.7.7 Transformata de Fourier

A Transformata de Fourier promove a mudança do domínio do tempo ou espaço (x,y) para o domínio da frequência facilitando o seu processamento digital da imagem. Essa Transformata Discreta de Fourier Bi- dimensional. Foi desenvolvida por Jean Baptiste Joseph Fourier, o qual foi um matemático francês e esse método tornou-se uma ferramenta matemática de enorme aplicabilidade frente a soluções dos problemas de processamento digital de imagens (FONSECA NETO, 1998).

2. JUSTIFICATIVA

A hipertensão é um problema comum e crônico. O tratamento adequado costuma reduzir a morbidez e a mortalidade cardiovascular. Para além da intervenção medicamentosa, são muitas as estratégias de intervenção capazes de fornecer meios de tratamento alternativo da hipertensão. No que diz respeito ao uso do aminoácido L-arginina, esperamos identificar uma associação inversa entre seu uso regular e a incidência ou risco da hipertensão.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi verificar os efeitos da inibição de óxido nítrico através da administração oral de L-NAME em tecidos cardíacos de ratos, e a possível prevenção por L-Arginina.

Os objetivos específicos do trabalho consiste em:

- A) Avaliar a possível hipertrofia cardíaca induzida pela inibição da síntese de NO;
- B) Avaliar o possível remodelamento cardíaco induzido pela inibição da síntese de NO;
- C) Verificar os níveis da pressão arterial, frequência cardíaca e duplo produto entre os grupos controle e tratado;
- D) Avaliar o efeito da administração oral de L-Arginina na prevenção dos danos causados pela inibição da síntese de NO.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados 30 ratos machos da linhagem Wistar, adultos jovens, pesando entre 300 ± 70.711 . Os animais foram obtidos do biotério do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), os quais foram mantidos em condições controladas de temperatura (22-25°C) e luminosidade (ciclo 12hs claro/12hs escuro), e 50%-70% de umidade relativa. A alimentação foi de água e ração (Purina/Brasil) “ad libitum”. Contudo foi verificado diariamente o consumo calórico, protéico, glicídico e lipídico dos animais, com base na tabela nutricional da ração utilizada.

4.4.1 Grupos Experimentais

30 animais foram aleatoriamente divididos em 5 grupos com 06 indivíduos cada, conforme descrito nos protocolos abaixo:

Grupo 1: Grupo controle recebeu ração padrão e água fresca.

Grupo 2: Grupo tratado com 20 mg diárias de L-NAME com um volume de 0,5 ml durante 28 dias. Recebeu ração padrão e água fresca.

Grupo 3: Grupo tratado com 20 mg diárias de L-NAME com um volume de 0,5 ml e tratado simultaneamente com 10 mg diárias de L-Arginina com um volume de 0,5 ml durante 28 dias. Recebeu ração padrão e água fresca.

Grupo 4: Grupo tratado com 20 mg diárias de L-NAME com um volume de 0,5 ml e tratado simultaneamente com 30 mg diárias de L-Arginina com um volume de 0,5 ml durante 28 dias. Recebeu ração padrão e água fresca.

Grupo 5: Grupo tratado com 20 mg diárias de L-NAME com um volume de 0,5 ml e tratado simultaneamente com 100 mg diárias de L-Arginina com um volume de 0,5 ml durante 28 dias. Recebeu ração padrão e água fresca.

4.2. Coleta das Amostras

4.2.1 Procedimento Cirúrgico e Parâmetros Hemodinâmicos

Os ratos foram anestesiados com Tiletamina + Zolazepam (40 mg/Kg¹), administrado intraperitonealmente (i.p); a anestesia foi complementada por uma outra injeção via intraperitoneal de 15 mg kg⁻¹ de Tiletamina + Zolazepam antes do período controle, e quando necessário. Os ratos foram traqueostomizados, entubados com um tubo de polietileno e imobilizados com brometo de pancurônio (1 mg kg⁻¹ i.v), com doses suplementares de 1 mg kg⁻¹ quando necessários. Os animais foram ventilados artificialmente por um respirador artificial da UGO BASILE 7052 Rodent Ventilator (volume corrente de 2 ml kg⁻¹, e frequência respiratória de 75 ciclos min⁻¹), a veia jugular direita foi cateterizada para permitir as injeções intravenosas de brometo de pancurônio. A pressão arterial foi continuamente monitorada através de um catéter colocado na artéria carótida esquerda e conectado a um transdutor de pressão arterial da UGO BASILE, que foi ligado a um fisiógrafo GEMINI 7070 da UGO BASILE o qual foi previamente calibrado e estabelecido uma escala com uma coluna de mercúrio da UGO BASILE, só então foi processado e registrado a pressão. A pressão arterial pulsátil (sistólica e diastólica) foi obtida diretamente do registro pressórico, e a pressão arterial média foi calculada somando-se a pressão diastólica mais 1/3 da pressão diferencial; a frequência cardíaca foi avaliada a cada 5 minutos pela contagem dos batimentos cardíacos, diretamente do registro, aumentando-se a velocidade do registrador.

Após o término do procedimento cirúrgico, foi respeitado um intervalo de 15 minutos para estabilização das condições hemodinâmicas, antes do início do experimento propriamente dito..

Foram tabulados os valores das pressões arteriais sistólica e diastólica, e calculado o valor da pressão arterial média e da frequência cardíaca calculada a cada

intervalo de 5 minutos sendo estes valores tomados como valores hemodinâmicos basais.

4.2.1.1 Administração intraperitoneal (IP)

As injeções intraperitoneais (IP) normalmente foram as mais utilizadas na experimentação com roedores. A substância é injetada na cavidade peritoneal entre os órgãos abdominais. Normalmente, injeta-se na metade posterior do abdome com o animal contido pelo dorso. O tamanho das agulhas normalmente utilizado é 25 mm x 5 mm ou 25 mm x 7 mm.

4.2.2 Protocolo de Eutanásia

Ao final de 4 semanas os animais foram submetidos ao protocolo de eutanásia que consiste em 0,1 ml de Cloridrato de Xilazina + 0,1 ml de Cloridrato de Ketamina injetado intraperitonealmente e após o efeito anestésico, os animais foram colocados em uma câmara mortuária, e sacrificados por superdose de Halotano. Isto ocorreu após o registro da pressão arterial e da frequência cardíaca.

4.2.3 Avaliação dos pesos cardíacos

Após o sacrifício dos animais, os corações foram removidos para posterior análise. Estes foram lavados com solução salina (0,9%, p/v) para a remoção de coágulos. Em seguida, os corações foram dissecados, os átrios removidos e os ventrículos pesados, obtendo-se desta forma o peso cardíaco total (PCT, mg). Após a retirada do ventrículo direito, o tecido remanescente foi pesado, obtendo-se assim o peso ventricular esquerdo (PVE, mg) a diferença entre o peso cardíaco total e o peso ventricular esquerdo se da o peso ventricular direito (PVD, mg). Estes valores foram corrigidos em função do peso corpóreo obtido na última semana de tratamento, e desta forma, foram finalmente expressos como peso cardíaco relativo ($PCR = PCT/\text{peso corpóreo}$, mg/g), índice do peso ventricular esquerdo ($IPVE = PVE/\text{peso corpóreo}$, mg/g) e o índice do peso ventricular direito ($IPVD = PVR/\text{peso corpóreo}$ mg/g).

4.4.3.1 Análise Estatística do peso cardíaco

Os resultados foram expressos como média \pm erro-padrão da média. A análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas foi aplicada para avaliar diferenças no peso corporal e na pressão arterial e ANOVA de uma via foi usada para comparar os pesos cardíacos. O teste de Bonferroni foi aplicado.

4.4.4 Dosagem de Colágeno

A avaliação quantitativa do colágeno miocárdico foi feita através do material obtido a partir do ventrículo direito (VD) e de ventrículo esquerdo (VE).

4.4.5 Obtenção das amostras

4.4.5.1 Armazenamento das amostras antes da Espectroscopia FT-Raman.

A separação das amostras para o experimento foi realizada logo após o procedimento de ressecção cirúrgica do material. As mesmas foram devidamente identificadas, sendo colocadas em tubos criogênicos Nalgene[®] e, em seguida, armazenadas em nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da realização da Espectroscopia FT-Raman no Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica (LEVB) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP) em São José dos Campos, São Paulo

4.4.6 Obtenção dos espectros FT-Raman

4.4.6.1 Espectrômetro FT-Raman

O equipamento utilizado neste estudo para aquisição dos espectros Raman das amostras de músculo cardíaco foi o FT-Raman Spectrometer RFS 100 da Bruker[®] Alemanha, instalado no LEVB. O equipamento se compõe de subunidades importantes que serão descritas a seguir.



Figura 4. FT-Raman Spectrometer RFS 100, Bruker

LASER Nd: YAG (Neodímio: Ítrio Alumínio Granada)

O LASER de Nd: YAG usado no FT-Raman Spectrometer emite alta intensidade de radiação em 1064 nm. A potência do laser deste equipamento é de no máximo 500 mW, podendo ser eletronicamente ajustada para cada tipo de amostra a ser estudada. Neste experimento, a potência ajustada para o *laser* de Nd: YAG foi de 110 mW, potência máxima ajustada para a coleta dos sinais Raman sem que houvesse aquecimento e assim degradação das amostras.

Geometria de Espalhamento

Neste estudo, utilizou-se a geometria de espalhamento de 180° devido ao alto grau de rejeição contra o Espalhamento Rayleigh. Para maximizar o sinal Raman, fixou-se cada amostra em um espelho de Alumínio.



Figura 5. Geometria de Espalhamento e Porta Amostra do FT-Raman Spectrometer RFS 100

4.4.7 Parâmetros do Equipamento

A partir do software instalado no FT-Raman Spectrometer RFS 100, o OPUS versão 4.2, Copyright © Bruker Optik GmHb 1997-2002, pode-se ajustar todos os parâmetros do equipamento, como potência do laser, abertura de feixe, ajuste na transformada de Fourier, auxílio durante a aquisição dos espectros, armazenamento e manipulação dos dados espectrais, gráficos em três dimensões (3D); análises quantitativas, armazenamento dos dados em forma de bibliotecas.

A seguir serão descritos (Quadro 2) os parâmetros ajustados no Equipamento FT-Raman, para a aquisição dos espectros Raman, tanto para as amostras normais, quanto para as amostras alteradas.

Quadro 2. Parâmetros ajustados com auxílio do Software OPUS 4.2 para a aquisição dos espectros no FT-Raman Spectrometer RFS 100.

Espectrômetro FT-Raman RFS 100	Tecido Cardíaco
Parâmetros de Aquisição	
Espera antes das medidas	10 segundos
Espera para Estabilização	5 segundos
Número de Varreduras	300
Resolução	4 cm ⁻¹
Tempo total de Varreduras (médio)	246 segundos
Parâmetros Ópticos	
Abertura do Feixe	7.0 mm
Potência do Laser Raman	300 mW saída
Potência do Laser na Amostra	123 mW

Neste experimento, foi estabelecido que as amostras não ficariam expostas ao ambiente por mais de 10 minutos. Sendo assim, ajustados os parâmetros do equipamento, adequamos a coleta de um a três espectros Raman por amostra. Este número variou porque o equipamento rejeita espectros de baixa qualidade, aumentando o tempo de coleta para atingir o número de varreduras desejadas. Nas amostras normais, a média de coletas foram de dois espectros por amostra, e para os tecidos alterados, foram duas coletas por amostra.

4.4.8 Preparação das Amostras para Experimento

Sendo o objetivo da Espectroscopia Raman fornecer resultados morfo-químicos sem a manipulação das amostras, foi a título de padronização que os espécimes de tecido cardíaco foram adequados ao experimento, como descrito a seguir:

Descongelamento das Amostras

No intuito de preservar os espécimes biológicos, para que não se degradassem quando expostos ao ambiente, o descongelamento dos mesmos em soro fisiológico a 9% foi realizado somente no momento serem utilizados para o experimento. Assim sendo, procedia-se o corte da matriz original congelada que rapidamente era recolocada no nitrogênio líquido.

4.4.9 Análise Estatística dos Dados Espectrais Raman

Os espectros FT-Raman obtidos e armazenados pelo OPUS[®] (Bruker, Inc., Karlsruhe, Alemanha), foram convertidos para o formato ASCII, para posterior processamento e análise.

4.4.10 Análise Histológica

4.4.10.1 Microscopia de luz (óptica)

As amostras de coração serão fixadas em formol a 10% por um período de 72 horas. Posteriormente as amostras serão desidratadas e submetidas a uma série gradativa de banhos de álcool, começando com 50% e progredindo até o álcool absoluto 100% (SYNTH). Em seguida fragmentos de coração serão diafanizadas com Xilol por 4 horas (SYNTH). Para impregnação (embebição) e inclusão em Paraplast[®] das amostras. Estas serão colocadas em recipientes de alumínio adequados, com Paraplast[®] fundido por 4 horas. Após a impregnação, as amostras serão colocadas em um pequeno recipiente coberto com parafina fundida por inteiro e deixadas para endurecer, formando um bloco contendo o tecido. Para a microtomia serão realizados cortes com 5 µm de espessura em micrótomo LEICA RM 2125 RT, e serão levados e colocados em banho-maria. Uma vez precedido o preparo das amostras os cortes serão colocados em lâminas para serem corados, com o corante Hematoxilina-Eosina (H.E.) e Picrosirius red. Após a coloração os cortes serão montados em lâminas permanentes para posterior análise ao microscópio óptico, e fotografadas através de sistema de microfotografia (Olympus

System Microscope Model CX 41 – Olympua PM10SP Automatic Photomicrographic System).

4.4.10.1 Análise Estatística Histológica

As análises estatísticas serão feitas através da análise de variância (ANOVA) e do Teste Tukey-Kramer de comparação múltipla com nível de significância de $p < 0,05$.

4.4.10.2 Tratamento via oral (VO) e gavage

A substância é introduzida na cavidade oral (VO) ou no aparelho digestório através de um tubo esofágico ou estomacal (gavage). Tal método é algumas vezes referido como enteral, significando a passagem pelo trato digestório.

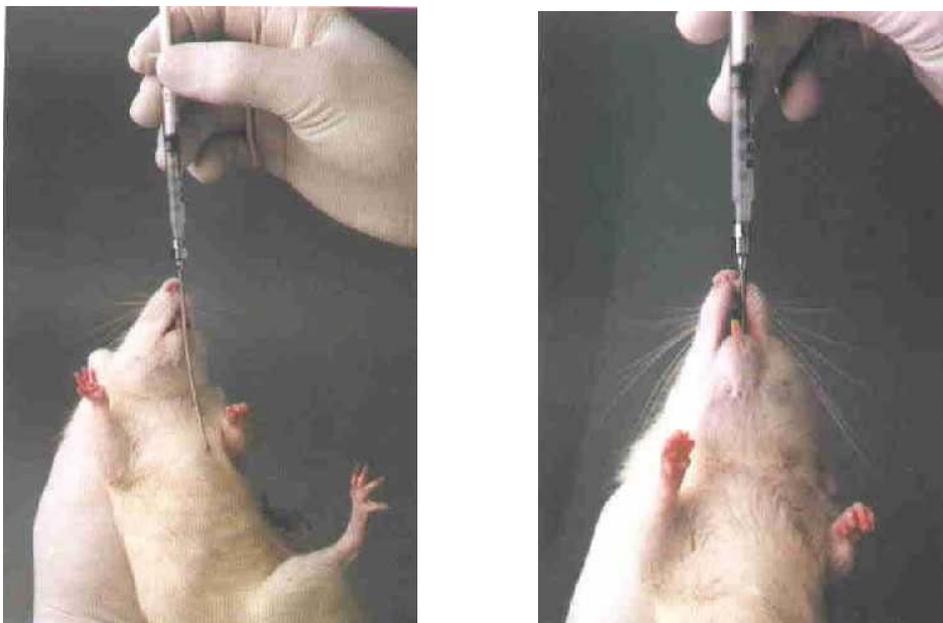


Figura 6: Administração de substância por gavagem na qual o tubo flexível ou agulha é introduzido pela entrada gastroesofágica até o estômago. O animal deve estar totalmente imóvel para evitar acidentes.

5. Resultados

Hemodinâmicos

Avaliação do efeito da L-Arginina de forma preventiva no processo da hipertensão (frequência cardíaca, duplo produto, peso corporal, peso cardíaco, peso do ventrículo esquerdo, peso cardíaco relativo e índice do peso do ventrículo esquerdo).

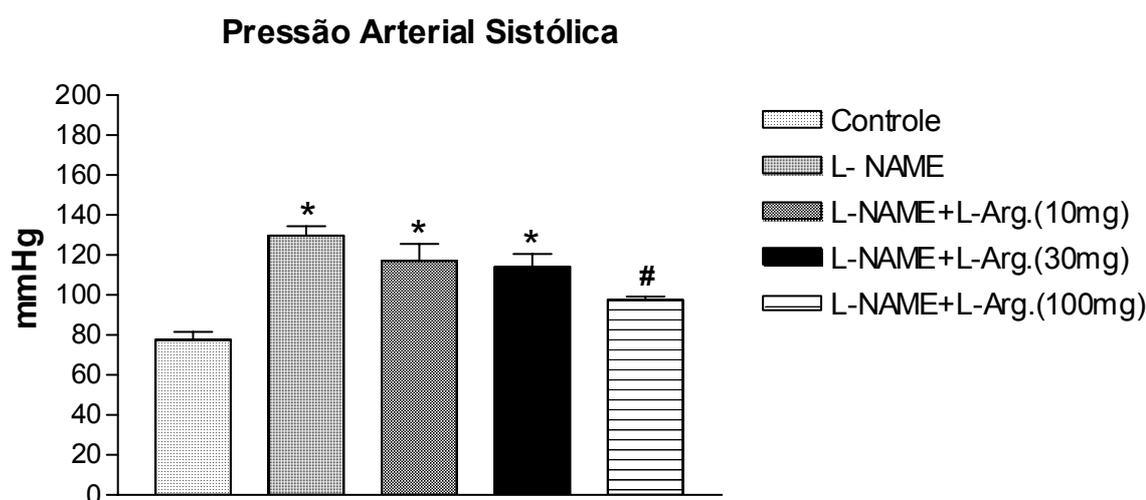


Gráfico 1- Pressão arterial sistólica em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações). Os dados representam a média \pm S.E.M., $n = 6$, $P < 0,05$ quando comparado com o grupo * Controle, # L-NAME (Anova, seguido teste de Bonferroni de comparação de medidas repetidas).

Tabela 1 - Pressão arterial sistólica em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações).

Amostra	Controle	LN	LN+Arg.10mg	LN+Arg.30mg	LN+Arg.100mg
1	70	119	99	85	100
2	70	150	120	120	90
3	70	120	90	110	100
4	75	132	125	130	100
5	90	128	149	120	95
6	90	130	120	120	100
Média	77.5	129.833	117.166	114.166	97.5
SEM	4.031	4.578	8.483	6.379	1.708

O gráfico 1 e a tabela 1, representa os valores da pressão arterial sistólica em ratos nos diferentes grupos, onde podemos observar a elevação da pressão arterial sistólica no qual apresentou um aumento estatisticamente significativo quando comparado ao grupo **Controle** ($77,5 \pm 4,031$) versus os grupos **L-NAME** ($129,833 \pm 4,578$), **L-NAME + L-Arginina (10mg)** ($117,166 \pm 8,483$) e **L-NAME + L-Arginina (30mg)** ($114,166 \pm 6,379$).

Ao compararmos o grupo **L-NAME** ($129,833 \pm 4,578$) em relação ao grupo **L-NAME + L-Arginina (100mg)** ($97,5 \pm 1,708$), podemos observar uma redução estatisticamente significativo em relação a pressão arterial sistólica.

Pressão Arterial Diastólica

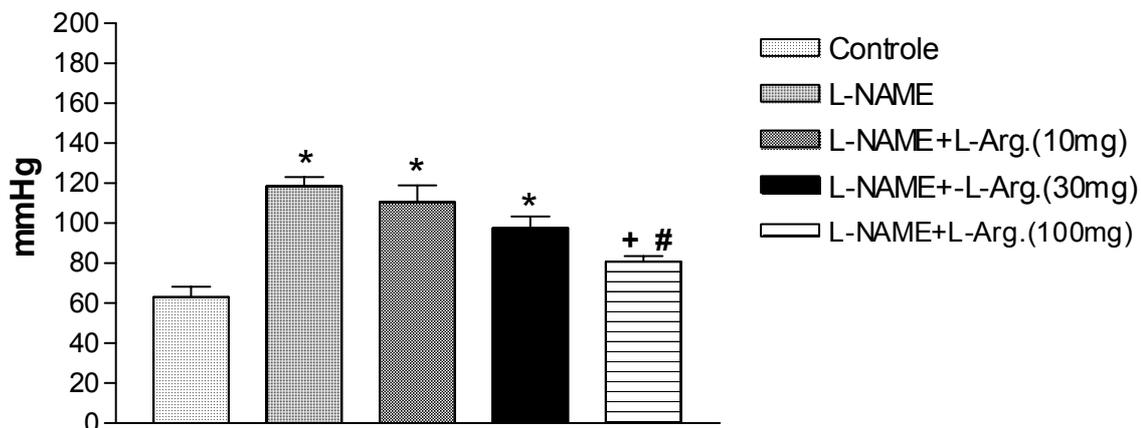


Gráfico 2- Pressão arterial distólica em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações). Os dados representam a média \pm S.E.M., n = 6, P < 0,05 quando comparado com o grupo * Controle, # L-NAME, + L-NAME + L-Arginina(10mg) (Anova, seguido teste de Bonferroni de comparação de medidas repetidas).

Tabela 2 - Pressão arterial distólica em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações).

Amostra	Controle	LN	LN+Arg.10mg	LN+Arg.30mg	LN+Arg.100mg
1	50	110	95	75	85
2	55	140	110	110	70
3	60	110	85	95	80
4	55	120	118	115	80
5	80	119	145	100	80
6	78	112	110	90	90
Média	63	118.5	110.5	97.5	80.83
SEM	5.228	4.660	8.441	5.881	2.713

O gráfico 2 e a tabela 2, representa a pressão arterial diastólica em ratos nos diferentes grupos, onde podemos observar que a pressão arterial diastólica, apresentou um aumento estatisticamente significativo quando comparado ao grupo **Controle** ($63 \pm 5,228$) versus os grupos **L-NAME** ($118,5 \pm 4,660$), **L-NAME + L-Arginina (10mg)** ($110,5 \pm 8.441$), **L-NAME + L-Arginina (30mg)**.

Ao compararmos os grupos **L-NAME** ($118,5 \pm 4,660$) em relação ao grupo **L-NAME + L-Arginina (100mg)** ($80,83 \pm 2,713$), podemos observar uma redução estatisticamente significativo na pressão arterial diastólica, o mesmo acontecendo com os grupos **L-NAME + L-Arginina (10mg)** ($110,5 \pm 8.441$) versus o grupo **L-NAME + L-Arginina(100mg)** ($80,83 \pm 2,713$).

Pressão Arterial Média

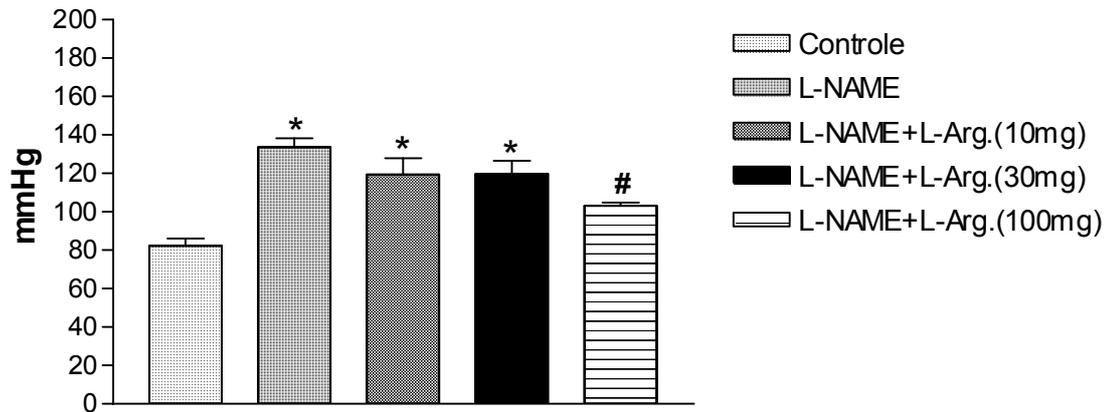


Gráfico 3 - Pressão arterial média em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações). Os dados representam a média \pm S.E.M., n = 6, P < 0,05 quando comparado com o grupo * Controle, # L-NAME (Anova, seguido teste de Bonferroni de comparação de medidas repetidas).

Tabela 3 - Pressão arterial média em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações).

Amostra	Controle	LN	LN+Arg.10mg	LN+Arg.30mg	LN+Arg.100mg
1	56,66	143,33	96,33	78,33	90
2	60	113,33	113,33	113,33	76,66
3	63,33	74,44	86,66	100	106,66
4	61	124	120,33	120	86,66
5	83,33	122	146,33	106,66	85
6	82	118	123,33	100	93,33
Média	67,72	115,85	114,385	103,05	89,71
SEM	11.781	22.738	21.126	14.392	10.023

O gráfico 3 e a tabela 3, demonstra a pressão arterial média em ratos nos diferentes grupos, onde observou-se que a pressão arterial média, apresentou um aumento estatisticamente significativo quando comparado ao grupo **Controle** ($82,33 \pm 3,762$) versus os grupos **L-NAME** ($133,61 \pm 4,646$), **L-NAME + L-Arginina (10mg)** ($119,385 \pm 8,532$), **L-NAME + L-Arginina (30mg)** ($119,72 \pm 6,851$).

Quando comparamos o grupo **L-NAME** ($133,61 \pm 4,646$) em relação ao **grupo L-NAME + L- Arginina (100mg)** ($103,051 \pm 1,634$) podemos observar que houve uma redução estatisticamente significativo na pressão arterial média.

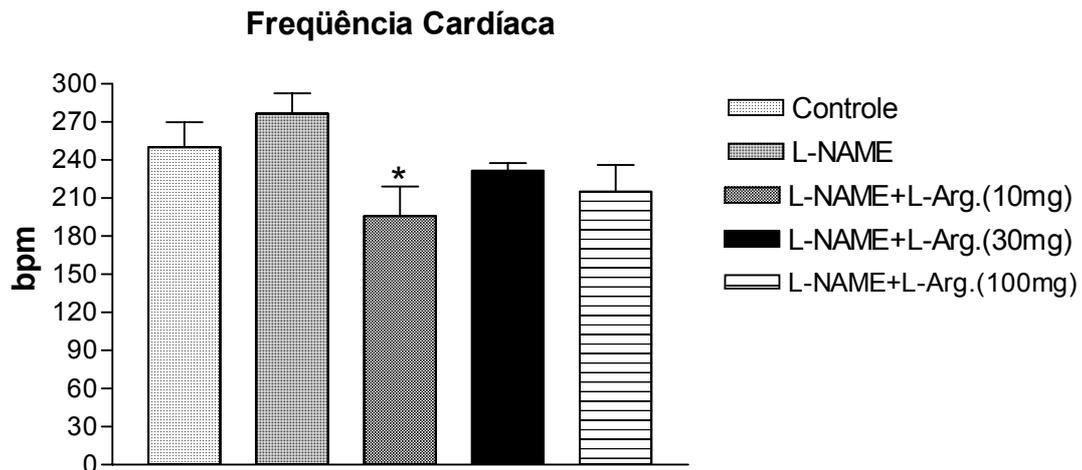


Gráfico 4 – Frequência cardíaca em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações). Os dados representam a média \pm S.E.M., n = 6, P < 0,05 quando comparado com o grupo, * L-NAME (Anova, seguido teste de Tukeyde uma via).

Tabela 4 - Frequência cardíaca em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações).

Amostra	Controle	LN	LN+Arg.10mg	LN+Arg.30mg	LN+Arg.100mg
1	320	280	90	210	110
2	240	240	230	230	240
3	270	290	250	250	230
4	250	320	220	220	230
5	250	310	180	240	240
6	170	220	205	240	240
Média	250	276.666	195.833	231.666	215
SEM	19.833	16.055	23.253	6.009	21.095

O gráfico 4 e a tabela 4, representa a frequência cardíaca em ratos nos diferentes grupos, onde podemos observar que a frequência cardíaca, apresentou um aumento estatisticamente significativo quando comparado ao **L-NAME** ($276,666 \pm 16,055$) versus o grupo **L-NAME + L-Arginina (10mg)** ($195,833 \pm 23,253$).

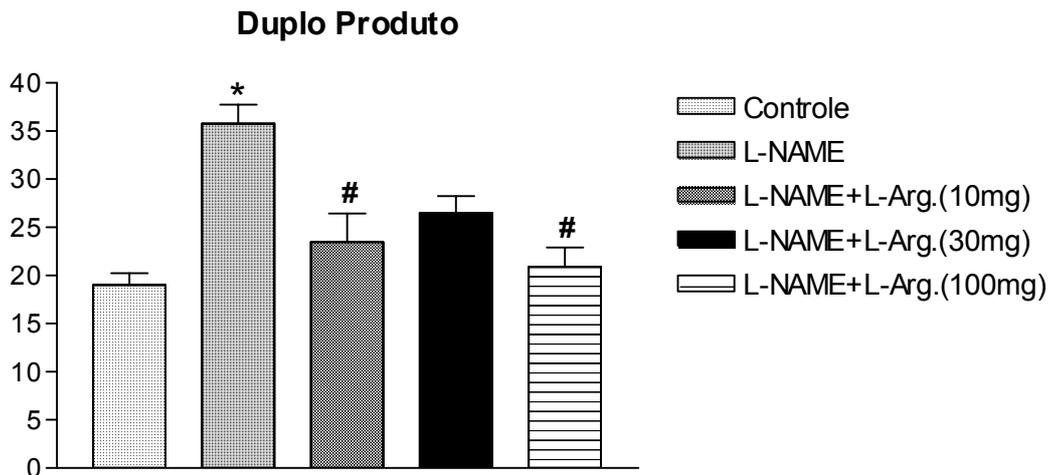


Gráfico 5 – Duplo Produto em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações). Os dados representam a média \pm S.E.M., n = 6, P < 0,05 quando comparado com o grupo, * Controle, # L-NAME (Anova, seguido teste de Tukeyde uma via).

Tabela 5 - Duplo Produto em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações).

Amostra	Controle	LN	LN+Arg.10mg	LN+Arg.30mg	LN+Arg.100mg
1	22.400	33.320	8.910	17.850	11.000
2	16.300	36.000	27.600	27.600	21.600
3	18.900	34.800	25.500	27.500	23.000
4	18.750	42.240	27.500	28.500	23.000
5	22.500	39.680	26.850	28.800	22.800
6	15.300	28.600	24.600	28.800	24.000
Média	19.025	35.773	23.493	26.508	20.900
SEM	1.223	1.963	2.956	1.747	2.004

No gráfico 5 e na tabela 5, podemos observar o duplo produto em ratos nos diferentes grupos, o qual apresentou um aumento estatisticamente significativo quando comparado o grupo **Controle** ($19,025 \pm 1,223$) versus o grupo **L-NAME** ($35,773 \pm 1,963$).

Ao compararmos o grupo **L-NAME** ($35,773 \pm 1,963$) em relação ao grupo **L-NAME + L-Arginina (10mg)** ($23,493 \pm 2,956$), podemos observar uma redução estatisticamente significativa em relação ao duplo produto, o mesmo acontecendo ao grupo **L-NAME** ($35,773 \pm 1,963$) versus o grupo **L-NAME + L-Arginina (100mg)** ($20,9 \pm 2,004$).

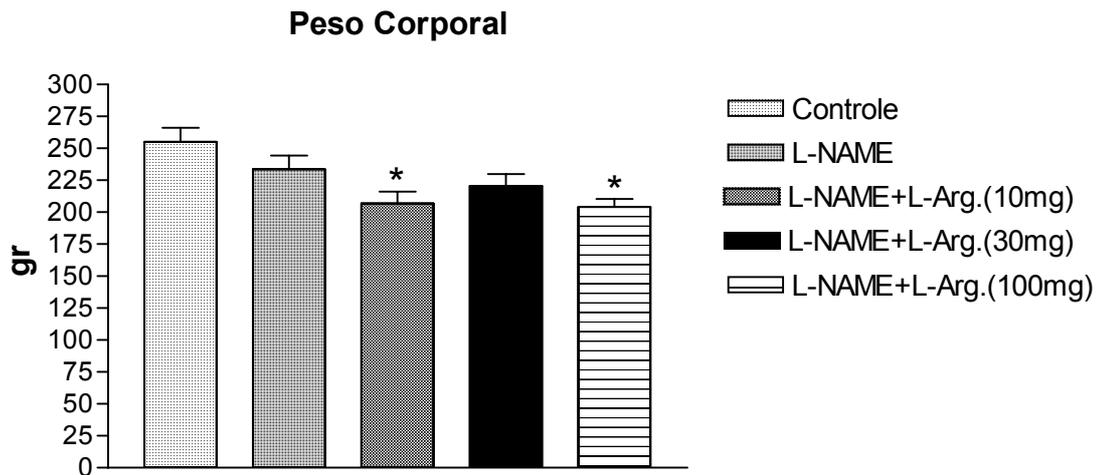


Gráfico 6 – Peso corporal em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações). Os dados representam a média \pm S.E.M., n = 6, P < 0,05 quando comparado com o grupo, * Controle (Anova, seguido teste de Bonferroni de comparação de mediadas repetidas).

Tabela 6 - Peso corporal em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações).

Amostra	Controle	LN	LN+Arg.10mg	LN+Arg.30mg	LN+Arg.100mg
1	253	242	213	194	180
2	245	221	215	191	202
3	265	237	246	220	204
4	274	272	193	240	221
5	285	237	191	235	199
6	209	193	183	243	219
Média	255.166	233.666	206.833	220.5	204.166
SEM	10.925	10.607	9.397	9.433	6.107

O gráfico 6 e a tabela, representa o peso corporal em ratos, no qual podemos observar que o peso corporal apresentou uma redução estatisticamente significativo quando comparado ao grupo **Controle** ($255,166 \pm 10,925$) versus os grupos **L-NAME + L-Arginina (10mg)** ($206,833 \pm 9,397$) e **L-NAME + L-Arginina (100mg)** ($204,166 \pm 6,107$).

Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada quando comparamos os demais grupos.

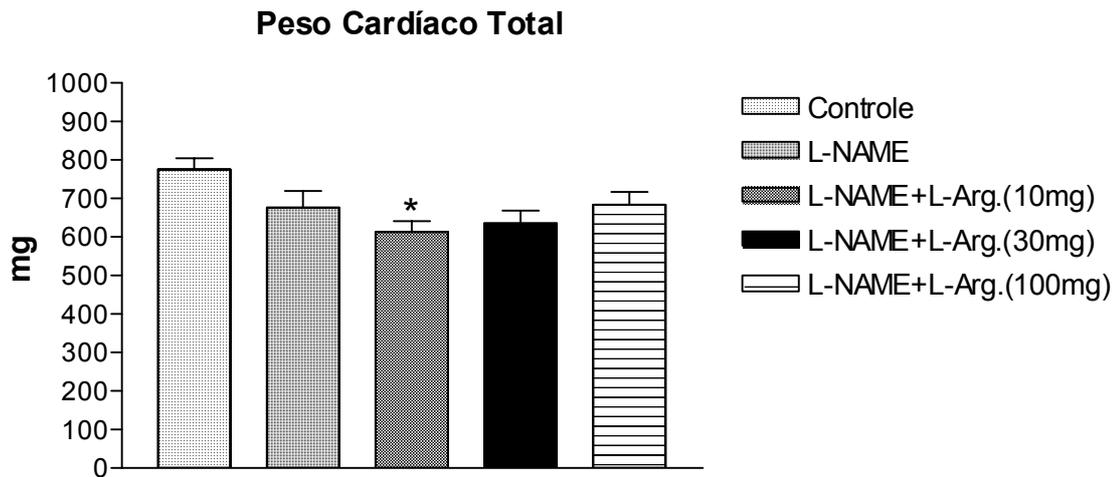


Gráfico 7 – Peso cardíaco total em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações). Os dados representam a média \pm S.E.M., n = 6, P < 0,05 quando comparado com o grupo, * Controle (Anova, seguido teste de Bonferroni de comparação de mediadas repetidas).

Tabela 7 - Peso cardíaco total em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações).

Amostra	Controle	LN	LN+Arg.10mg	LN+Arg.30mg	LN+Arg.100mg
1	800	760	630	520	550
2	840	660	560	600	680
3	800	800	690	632	684
4	730	690	580	610	670
5	650	500	690	690	720
6	830	650	530	760	800
Média	775	676.666	613.333	635.333	684
SEM	29.524	42.635	27.649	33.533	33.126

No gráfico 7 e na tabela 7 podemos observar que o peso cardíaco total em ratos apresentou uma redução estatisticamente significativo ao compararmos o grupo **Controle** ($775 \pm 29,524$) em relação ao grupo **L-NAME + L-Arginina (10mg)** ($613,333 \pm 27,649$).

Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada quando comparamos os demais grupos.

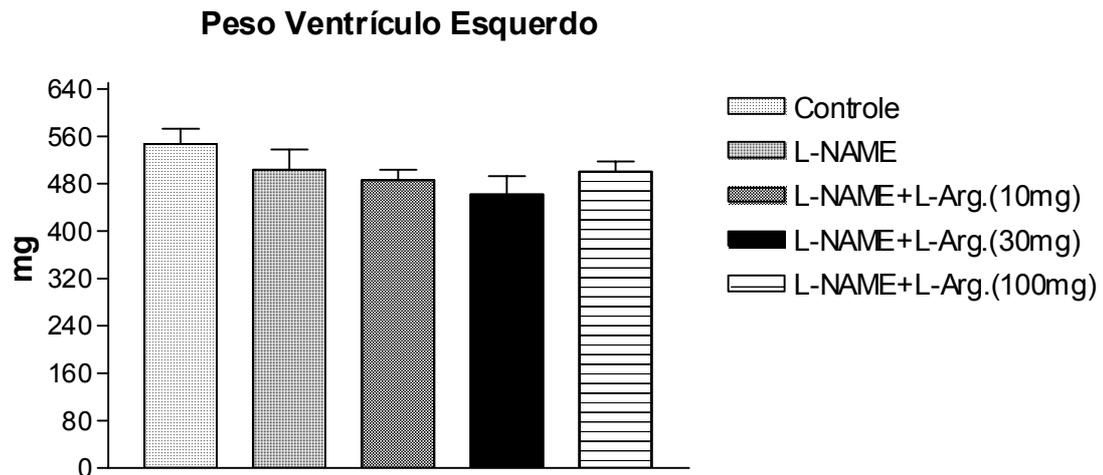


Gráfico 8 – Peso do ventrículo esquerdo em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações). Os dados representam a média \pm S.E.M., $n = 6$, $P < 0,05$ (Anova, seguido teste de Bonferroni de comparação de mediadas repetidas).

Tabela 8 - Peso do ventrículo esquerdo em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações).

Amostra	Controle	LN	LN+Arg.10mg	LN+Arg.30mg	LN+Arg.100mg
1	560	510	500	330	440
2	620	450	430	460	500
3	590	660	510	462	500
4	510	500	460	450	470
5	440	420	500	530	530
6	560	480	410	540	560
Média	546.666	503.333	468.333	462	500
SEM	26.034	34.124	17.013	30.703	17.321

No gráfico 8 e na tabela 8, foi observado que o peso do ventrículo esquerdo , não apresentou dados estatisticamente significativos quando comparados em relação ao grupo Controle e aos demais grupos.

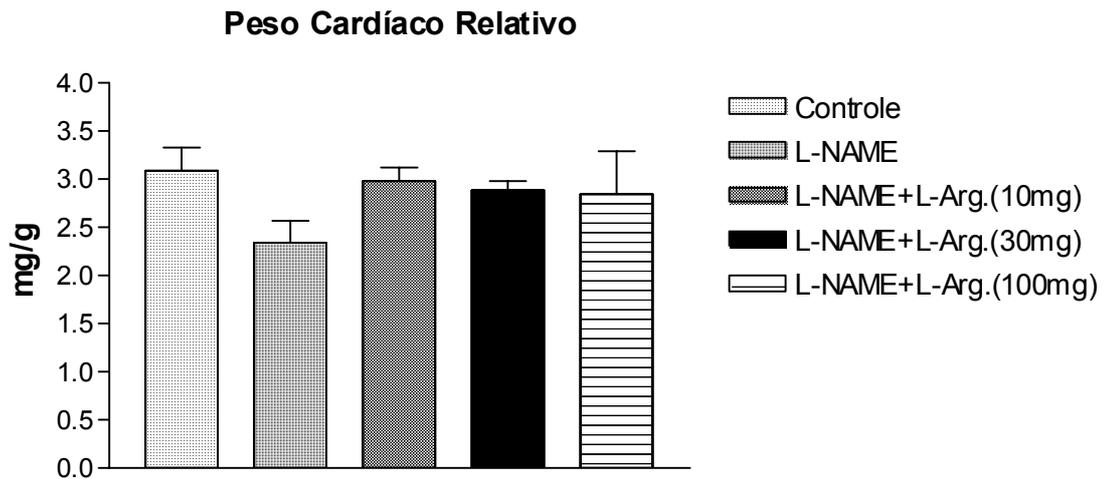


Gráfico 9 – Peso cardíaco relativo em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações). Os dados representam a média \pm S.E.M., $n = 6$, $P < 0,05$ (Anova, seguido teste de Bonferroni de comparação de mediadas repetidas).

Tabela 9 - Peso cardíaco relativo em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações).

Amostra	Controle	LN	LN+Arg.10mg	LN+Arg.30mg	LN+Arg.100mg
1	3.162	3.140	2.957	2.680	3.055
2	3.429	2.036	2.604	3.141	3.366
3	3.019	2.784	2.804	2.885	3.344
4	2.664	1.838	3.005	2.541	3.031
5	2.280	1.772	3.618	2.936	3.618
6	3.971	2.487	2.896	3.127	0.652
Média	3.0875	2.3428	2.9806	2.885	2.8443
SEM	0.2408	0.2255	0.1400	0.0978	0.4474

No gráfico 9 e na tabela 9, foi observado que o peso cardíaco relativo não apresentou dados estatisticamente significativos quando comparados em relação ao grupo Controle e aos demais grupos.

Índice do Peso do Ventrículo Esquerdo

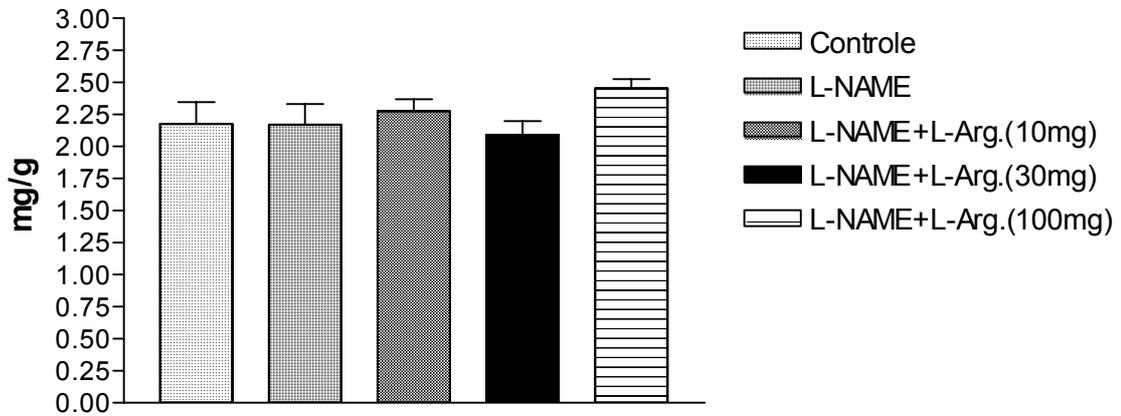


Gráfico 10 – Peso cardíaco relativo em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações). Os dados representam a média \pm S.E.M., $n = 6$, $P < 0,05$ (Anova, seguido teste de Bonferroni de comparação de mediadas repetidas).

Tabela 10 - Peso cardíaco relativo em ratos após 28 dias de tratamento com L-NAME e L-Arginina + L-NAME (em diferentes concentrações).

Amostra	Controle	LN	LN+Arg.10mg	LN+Arg.30mg	LN+Arg.100mg
1	2.213	2.107	2.347	1.701	2.444
2	2.530	2.036	2.000	2.408	2.475
3	2.226	2.784	2.073	2.092	2.453
4	1.861	1.838	2.383	1.874	2.126
5	1.544	1.772	2.618	2.255	2.663
6	2.679	2.487	2.240	2.222	2.557
Média	2.1755	2.1706	2.2768	2.092	2.453
SEM	0.1714	0.1600	0.0916	0.1070	0.0735

No gráfico 10 e na tabela 10, foi observado que o peso cardíaco relativo não apresentou dados estatisticamente significativos quando comparados em relação ao grupo Controle e aos demais grupos.

Histológicos

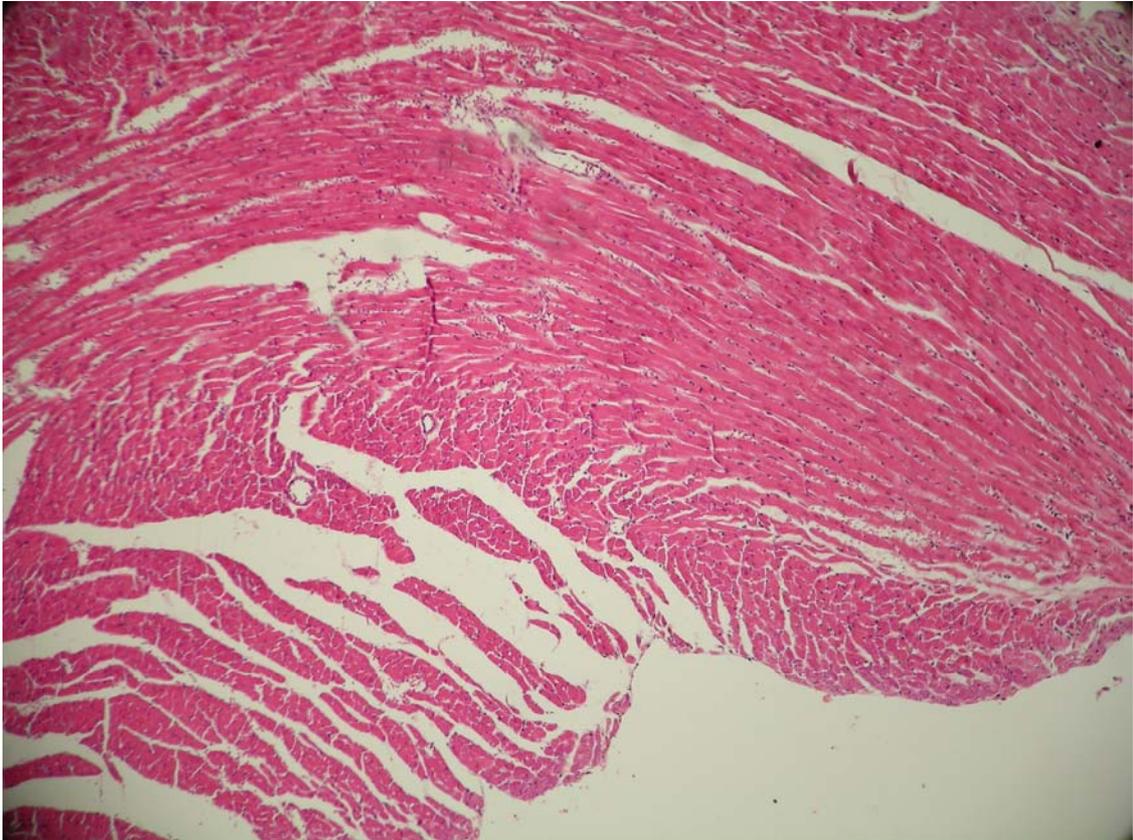


Figura 7: Corte histológico do ventrículo esquerdo de um coração representativo do grupo Controle. Na fotografia observam-se a luz ventricular e fibras cardíacas preservadas da parede ventricular esquerda.

Coloração: Hematoxilina-Eosina, aumento 40x

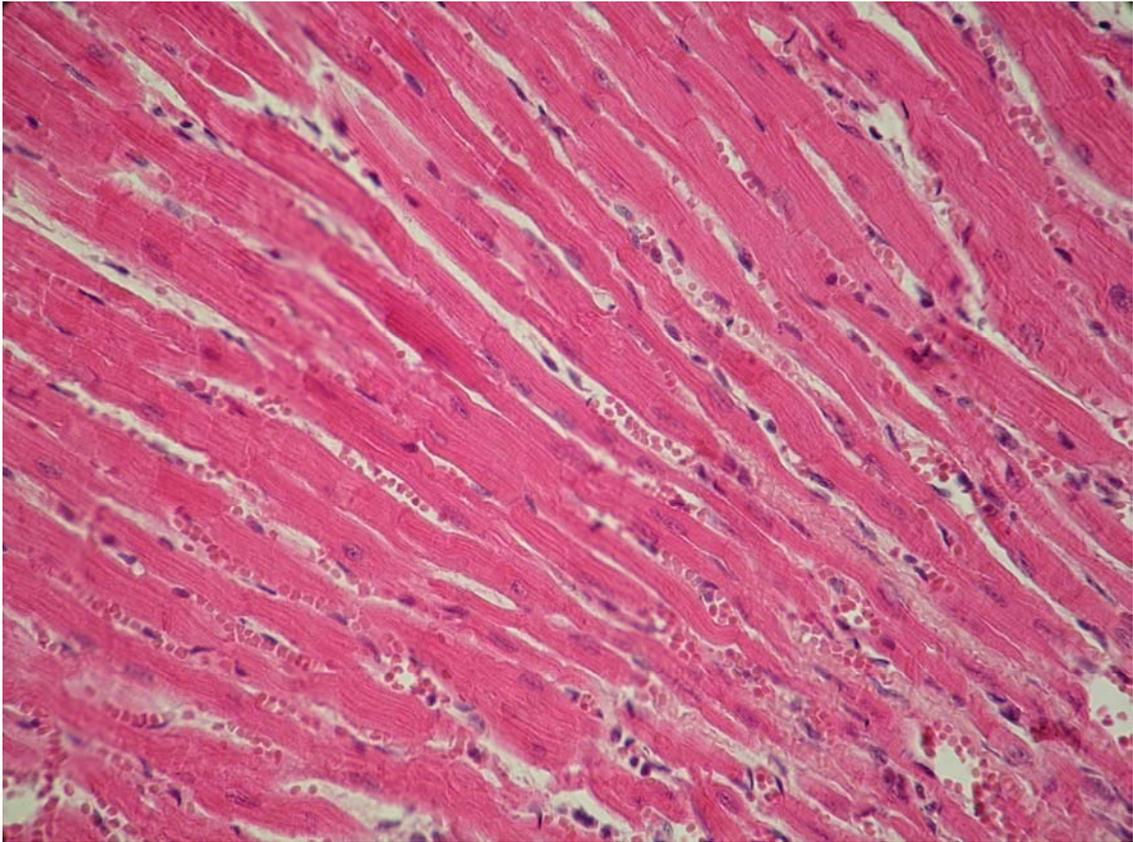


Figura.8: Corte histológico do ventrículo esquerdo de um coração representativo do grupo Controle Na fotografia observam-se fibras cardíacas preservadas da parede ventricular esquerda.

Coloração: Hematoxilina-Eosina, aumento 400x

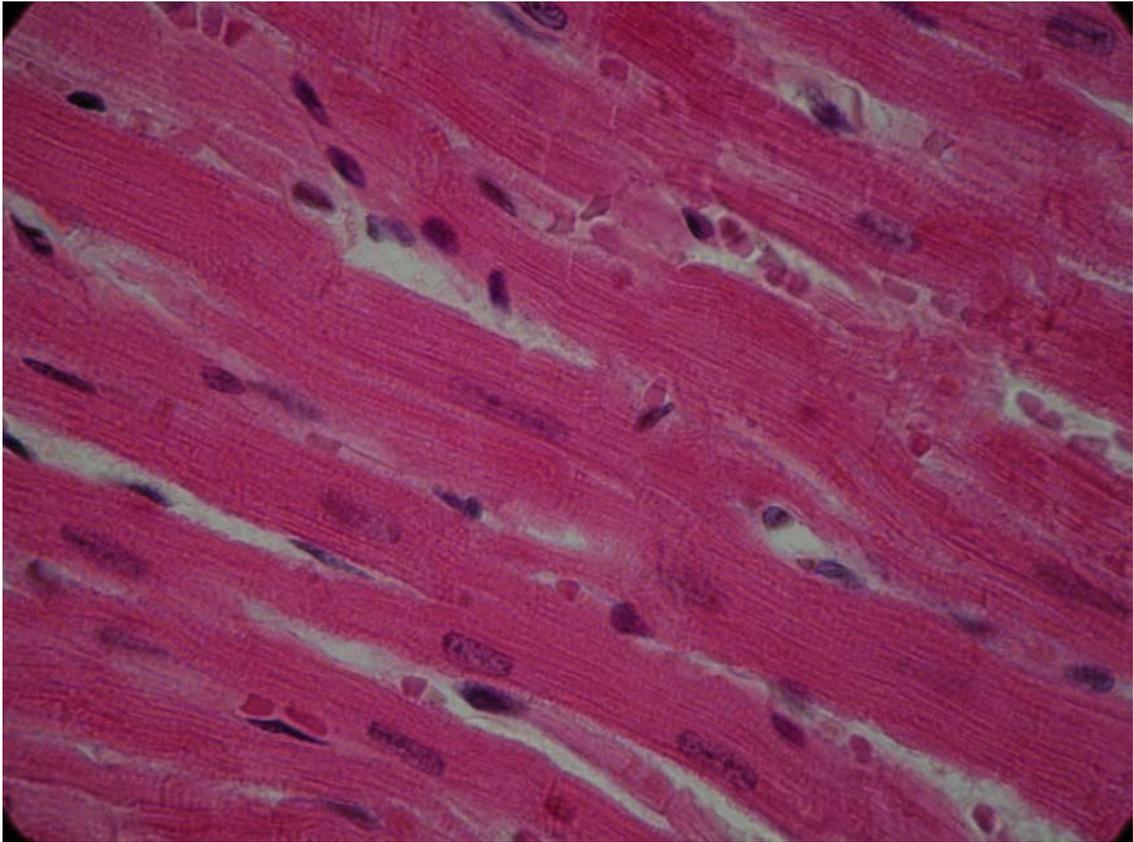


Figura 9: Corte histológico do ventrículo esquerdo de um coração representativo do grupo Controle. Na fotografia observam-se fibras cardíacas preservadas da parede ventricular esquerda.

Coloração: Hematoxilina-Eosina, aumento de 1000x.

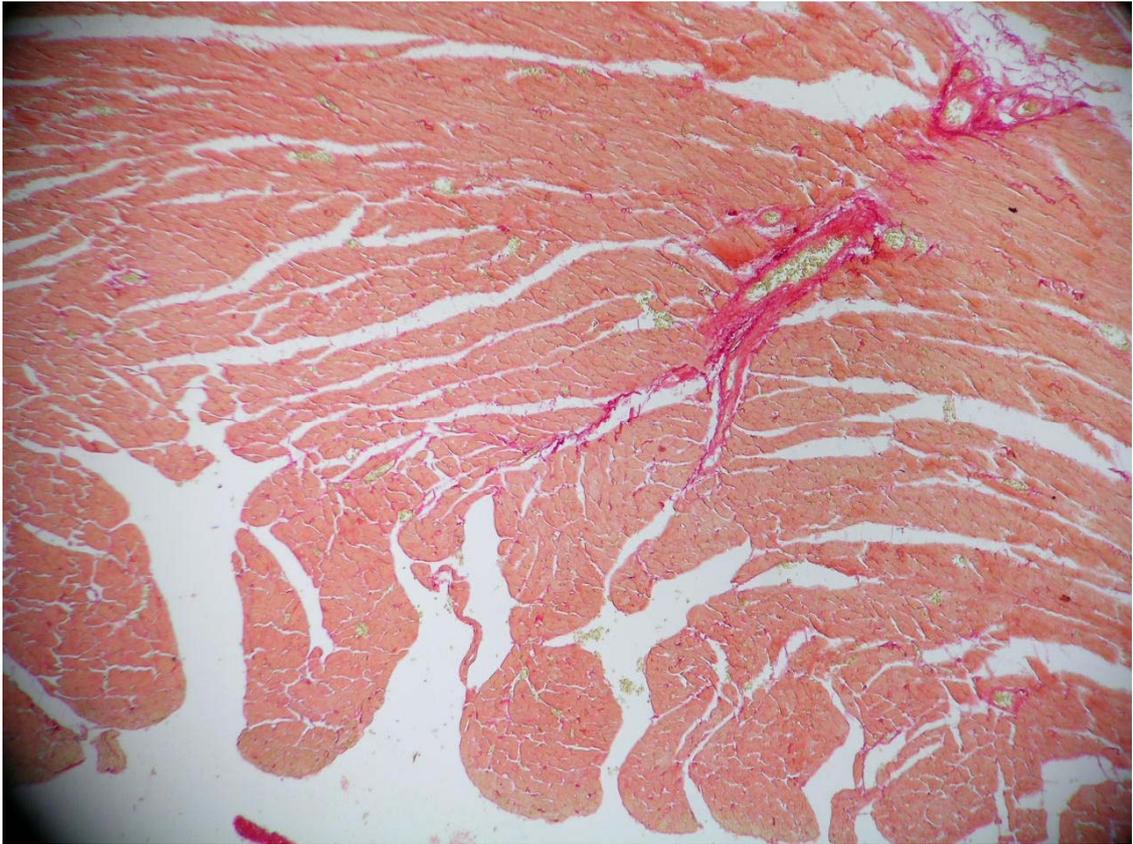


Figura 10: Corte histológico do ventrículo esquerdo de um coração representativo do grupo Controle. Na fotografia observam-se a luz ventricular e fibras cardíacas preservadas da parede ventricular esquerda.

Coloração: Picro Sírius Red, aumento 40x.

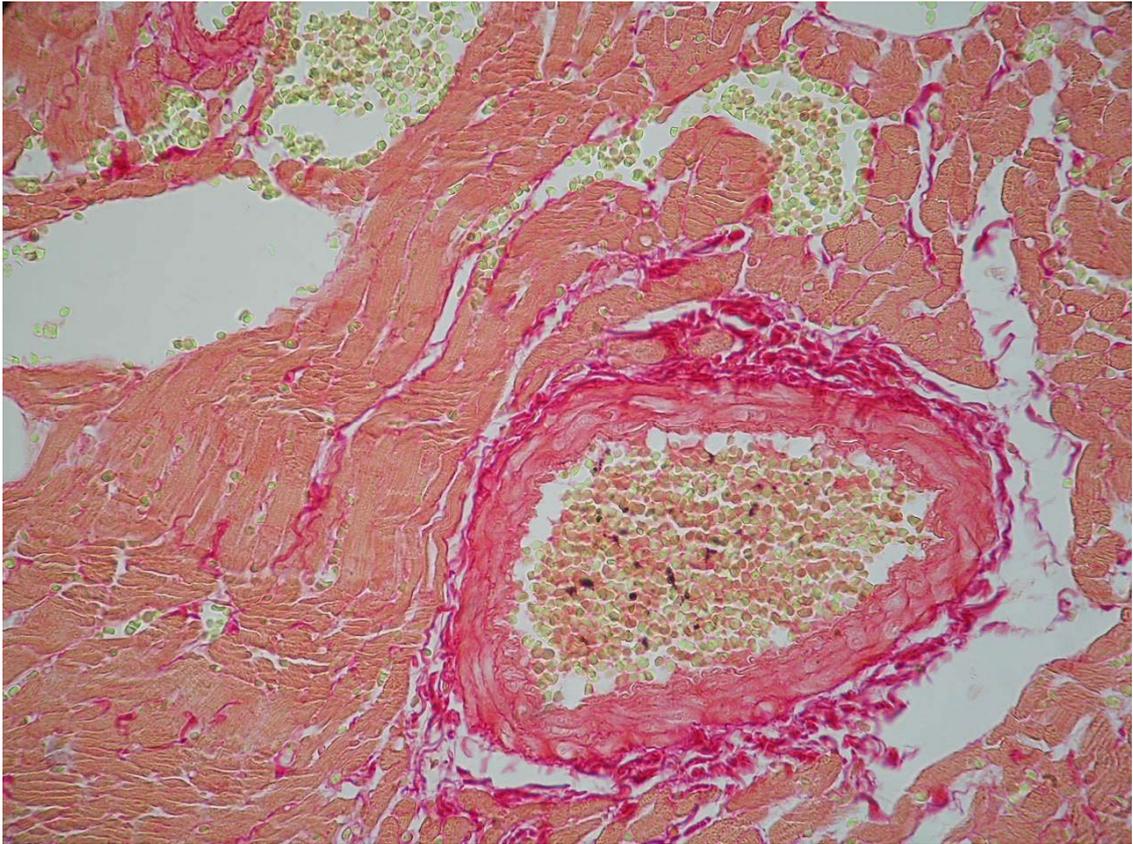


Figura 11: Corte histológico do ventrículo esquerdo de um coração representativo do grupo Controle. Na fotografia observam-se fibras cardíacas preservadas e artéria vaso dilatada preenchida por hemáceas.

Coloração: Picro Sírius Red, aumento 100x

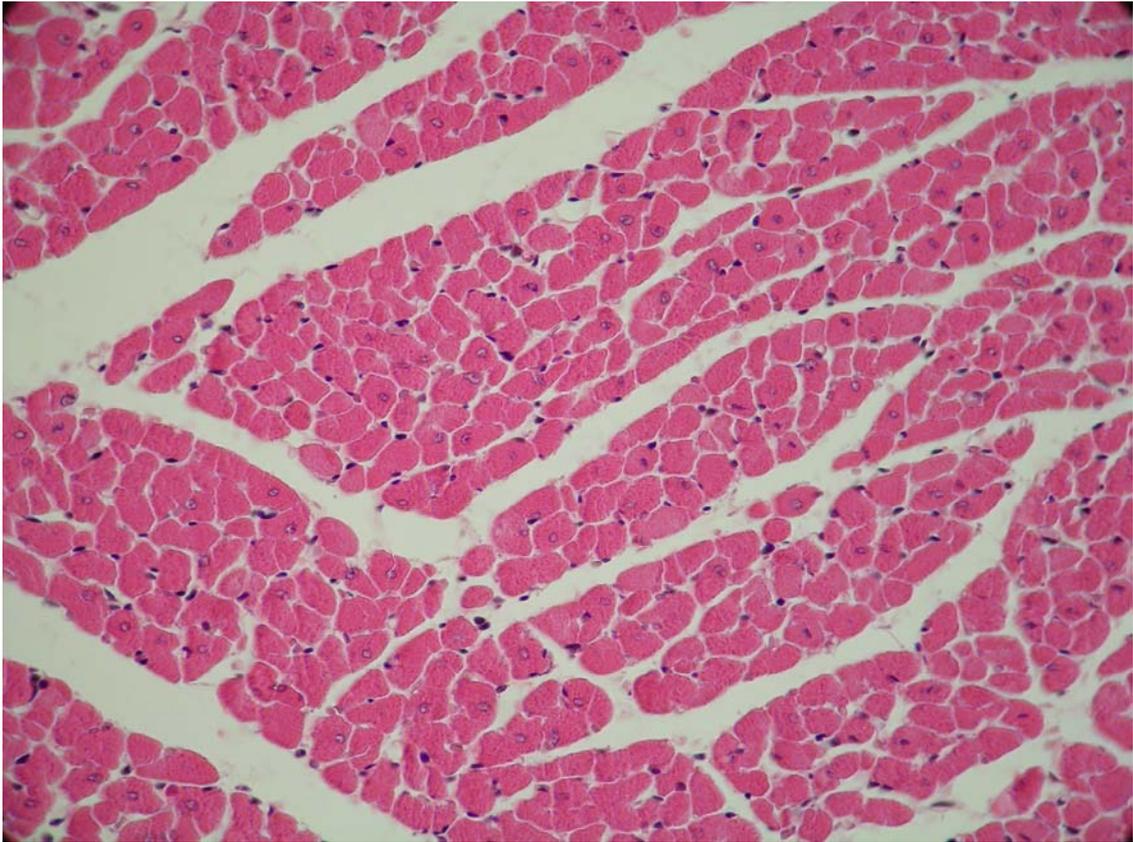


Figura 12: Corte histológico do ventrículo esquerdo de um coração representativo do grupo L-NAME. Na fotografia observam-se fibras cardíacas com maior número de células mononucleares.

Coloração: Hematoxilina-Eosina, aumento 400x.

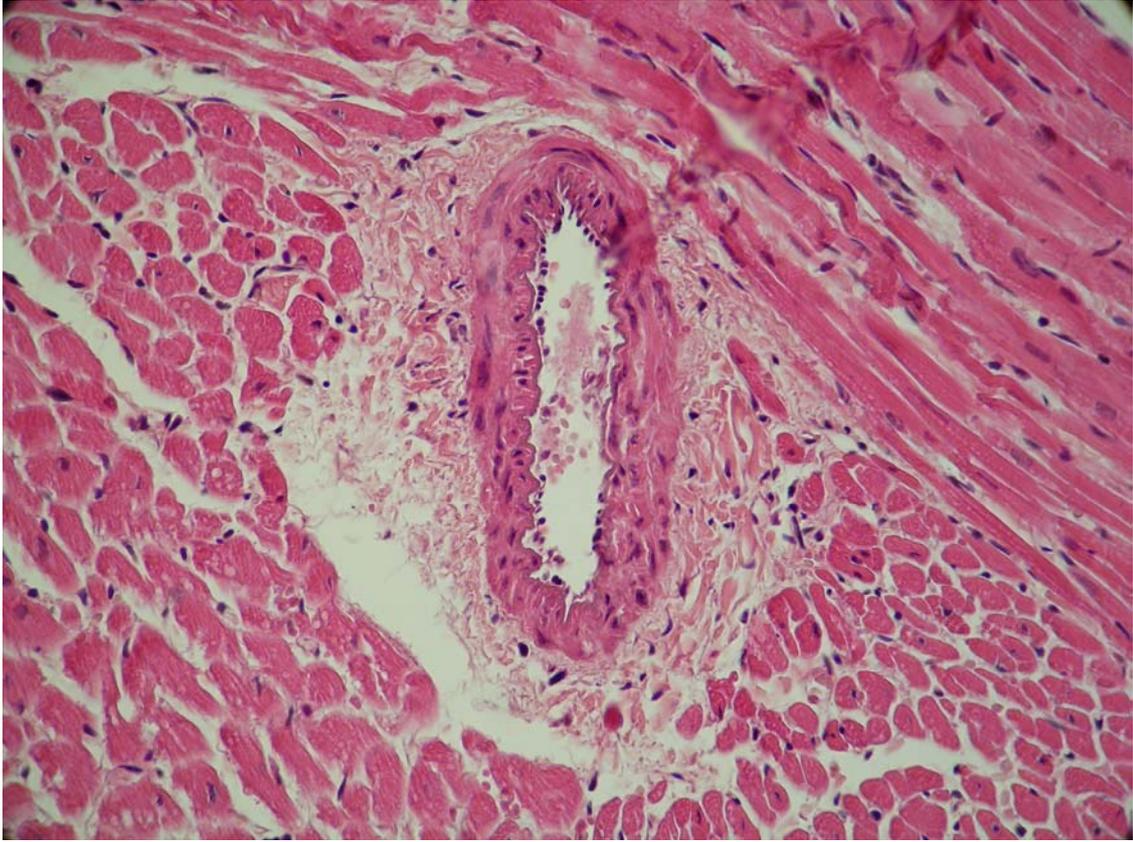


Figura 13: Corte histológico do ventrículo esquerdo de um coração representativo do grupo L-NAME. Na fotografia observam-se artéria com vasoconstricção e extravasamento de células inflamatórias e ausência de hemácias na luz do vaso. Coloração: Hematoxilina-Eosina, aumento 400x.

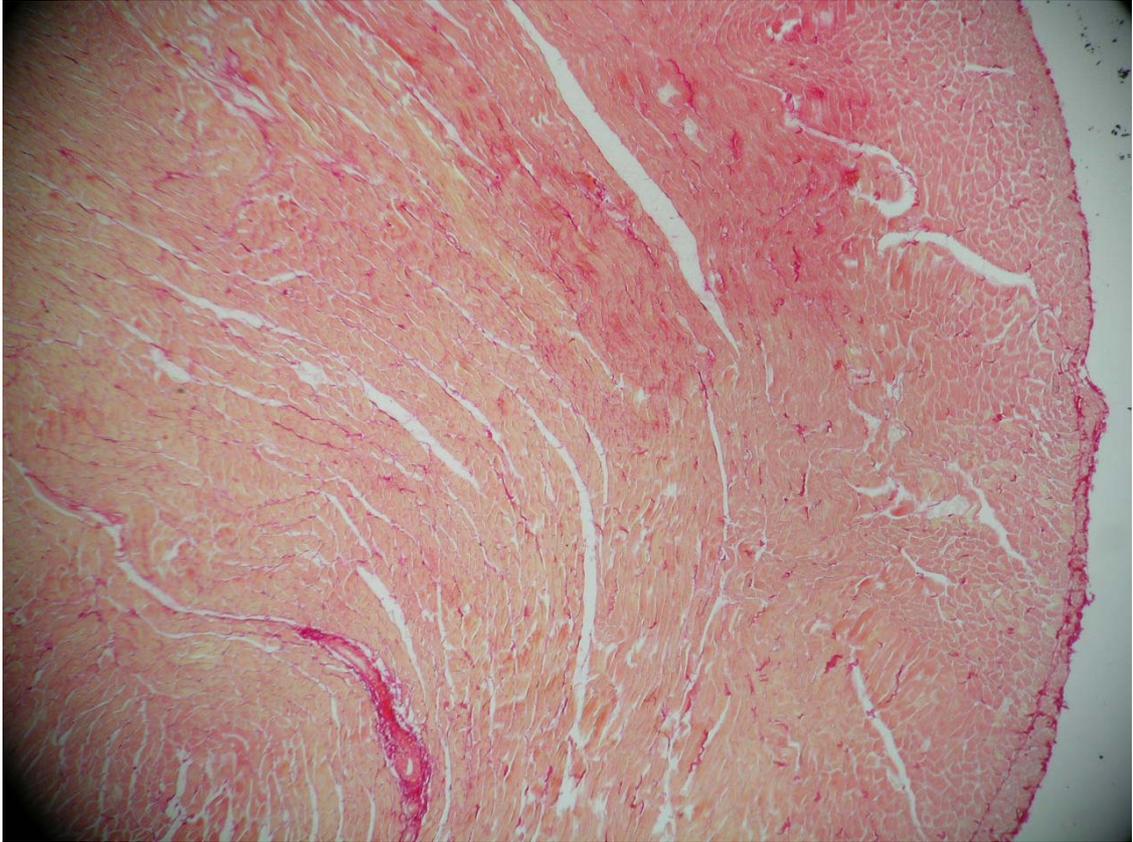


Figura 14: Corte histológico do ventrículo esquerdo de um coração representativo do grupo L-NAME. Na fotografia observa-se o epicárdio e uma vasta área de remodelamento decorrente da substituição de miocardiócitos destruídos.

Coloração: Picro Sírius Red, aumento 40x.

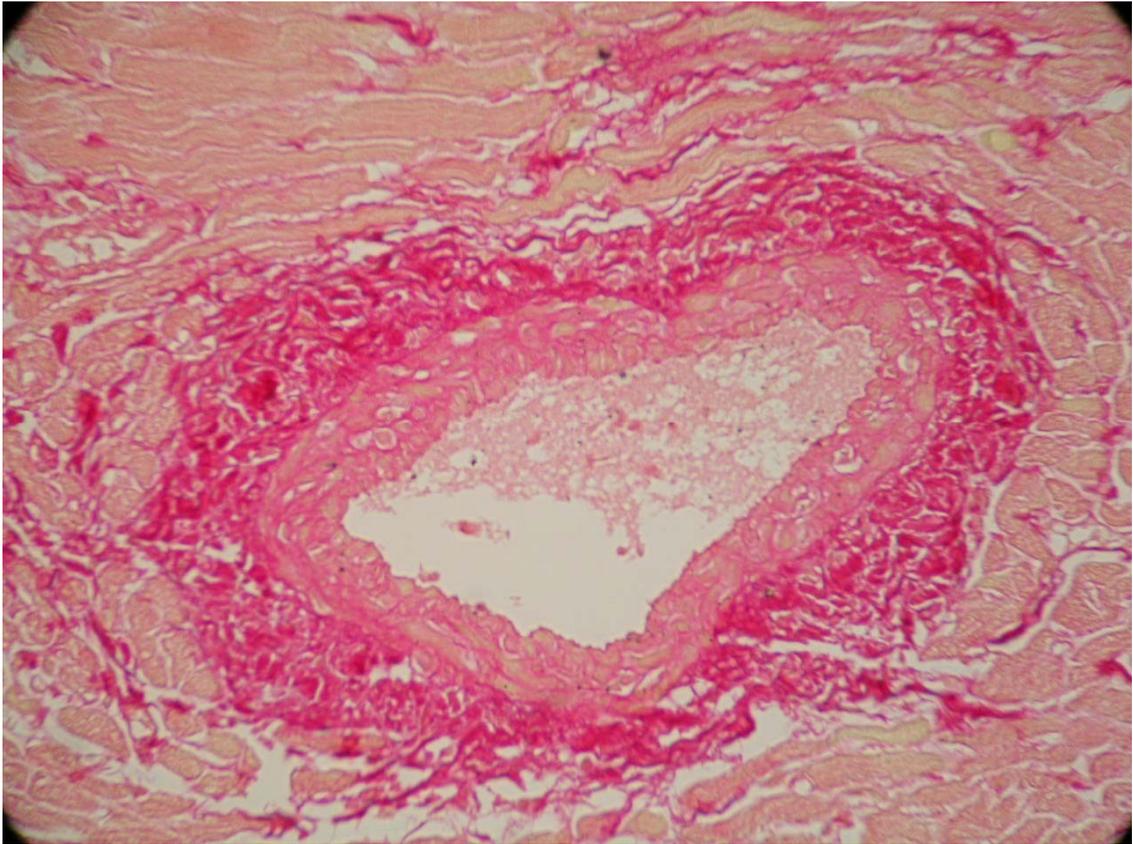


Figura 15: Corte histológico do ventrículo esquerdo de um coração representativo do grupo L-NAME. Na fotografia observa-se uma arteríola vasocontraída com uma diminuição de hemácia em sua luz e uma área de remodelamento ao redor do vaso. Coloração: Picro Sírius Red, aumento 400x.

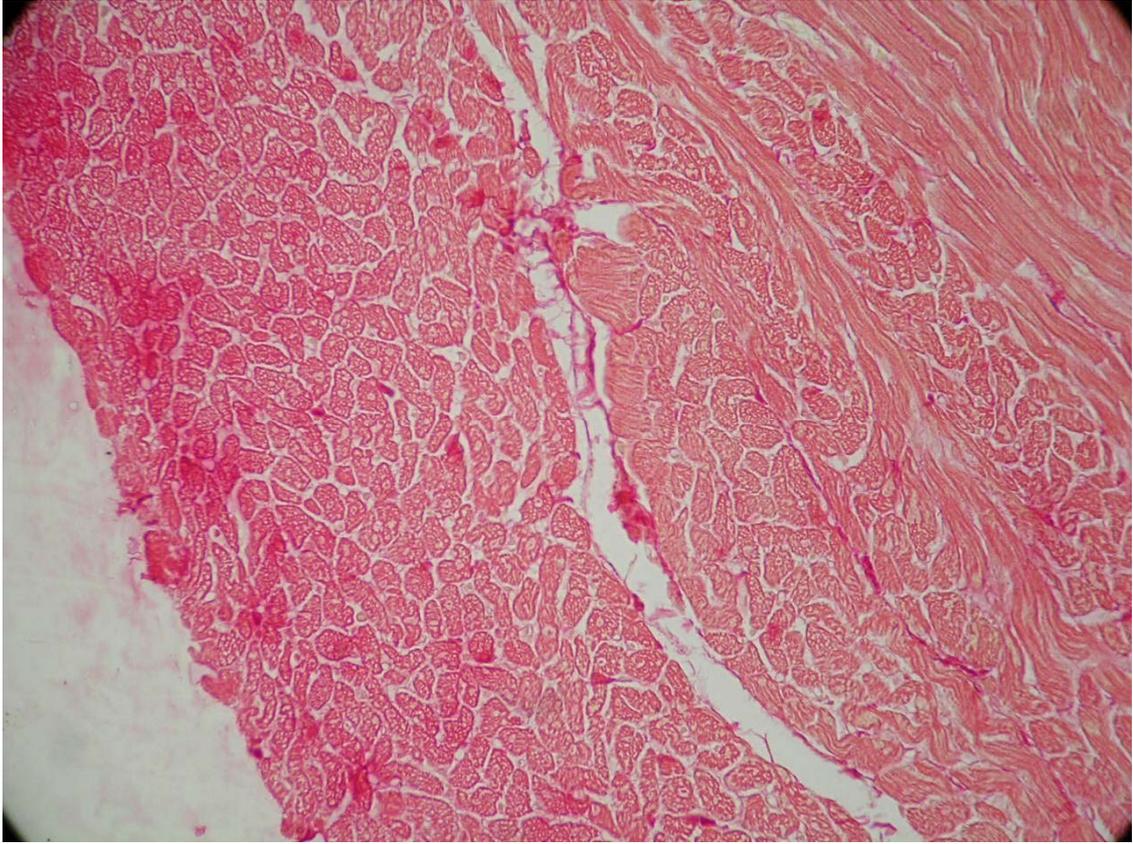


Figura 16: Corte histológico do ventrículo esquerdo de um coração representativo do grupo L-NAME. Na figura observa-se uma extensa área de remodelamento intersticial. Coloração: Picro Sírius Red, aumento 100x.

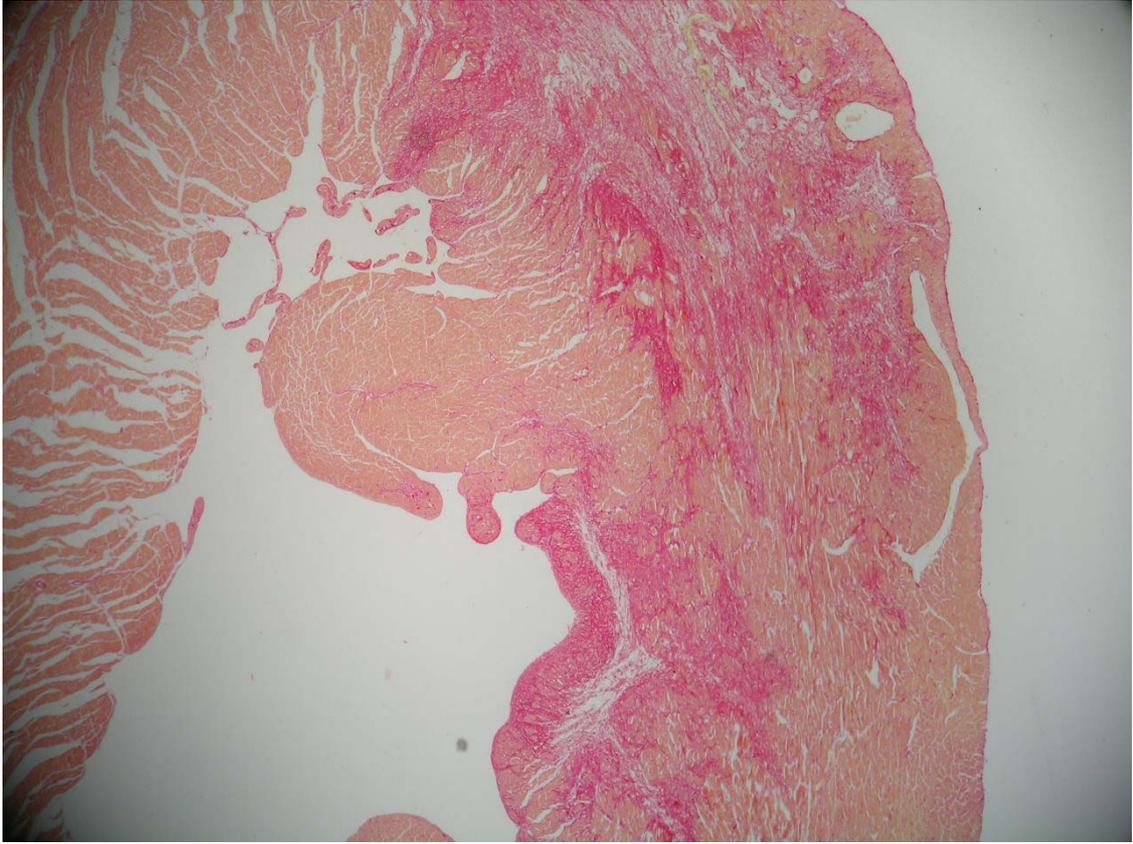


Figura 17: Corte histológico do ventrículo esquerdo de um coração representativo do grupo L-NAME+L-Arginina 10mg. Na fotografia observa-se a luz ventricular, focos mais intensos de fibras colágenas e fibras cardíacas preservadas.

Coloração: Picro Sírius red, aumento 40x.

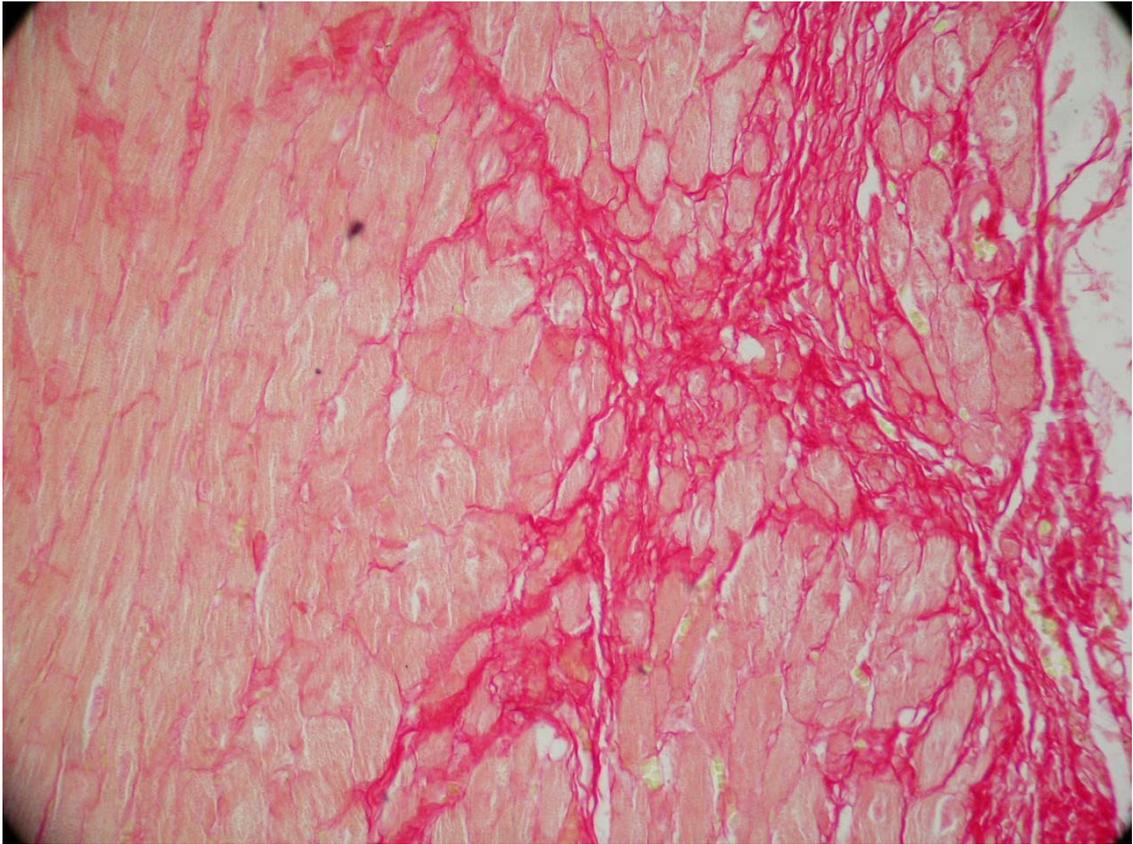


Figura 18: Corte histológico do ventrículo esquerdo de um coração representativo do grupo L-NAME+L-Arginina 100mg. Na fotografia observa-se, focos mais intensos de fibras colágenas.

Coloração: Picro Sírius red, aumento 400x.

RESULTADOS DA ESPECTROSCOPIA FT-RAMAN - LEVB

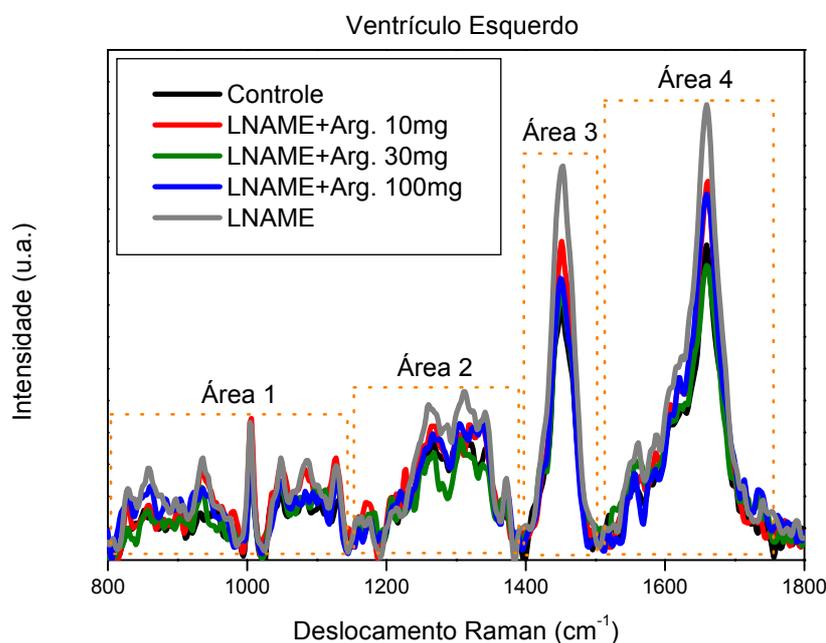


Figura 19 Médias dos espectros FT-Raman do ventrículo esquerdo de músculo cardíaco de rato dos grupos Controle, L.NAME+Arg. 10mg, L.NAME+Arg. 30mg, L.NAME+Arg. 100mg e L.NAME sem tratamento. Divisão das Áreas dos espectros Raman: Área 1 (800-1150 cm^{-1}), Área 2 (1150-1380 cm^{-1}), Área 3 (1380-1520 cm^{-1}), Área 4 (1520-1800 cm^{-1}).

Quadro 3: Modos Vibracionais e Biomoléculas relacionadas aos picos/áreas dos espectros FT-Raman de músculo cardíaco de rato.

Áreas	1. Modos Vibracionais	Biomoléculas
1	$\nu(\text{C—C}), \delta(\text{CCH}), \text{Anel Aromático}, (\text{O—P—O})$	Prolina, Tirosina, Ácidos Nucléicos
	$\nu(\text{C—C}), \alpha\text{-helix}, (\text{O—P—O})$	Prolina, Valina, Hidroxiprolina, Ácidos Nucléicos
	$\nu_s(\text{C—C}), \text{Anel Aromático}, (\text{C—CH}_3)$	Fenilalanina
2	$\nu(\text{C—C})$ ou $\nu(\text{C—O}), (\text{—CH OH})$	Fosfolipídios, Carboidratos
	$\nu(\text{CN}), \delta(\text{NH}), \text{Amida III}, \alpha\text{-helix}, (\text{=C—H})$	Colágeno, Triptofano, Lipídios
	$\delta(\text{CH}_2), (\delta\text{CH}_3)$	Colágeno, Fosfolipídios, Triglicérides
3	$\delta(\text{CH}_2), \delta(\text{CH}_3), (\text{O—P—O})$	Colágeno, Fosfolipídios, Desoxirribose, Carboidratos
4	$\nu(\text{C=O}), \text{Amida I}, \alpha\text{-helix}, (\text{C=C})$	Colágeno, Elastina, Lipídios
	$\nu(\text{C=O})$	Fosfolipídios

Quadro 4: Relação entre as áreas A1, A2, A3 e A4 dos espectros FT-Raman de tecido muscular cardíaco.

Grupos Experimentais		Relação de Áreas
Ventrículo Esquerdo		
A2/A4	Controle	1,2038
	L.NAME+Arg. 10mg	1,1946
	L.NAME+Arg. 30mg	1,1836
	L.NAME+Arg. 100mg	1,1067
	L.NAME	1,0274
Ventrículo Esquerdo		
A3/A4	Controle	0,806
	L.NAME+Arg. 10mg	0,7783
	L.NAME+Arg. 30mg	0,7666
	L.NAME+Arg. 100mg	0,75843
	L.NAME	0,7209

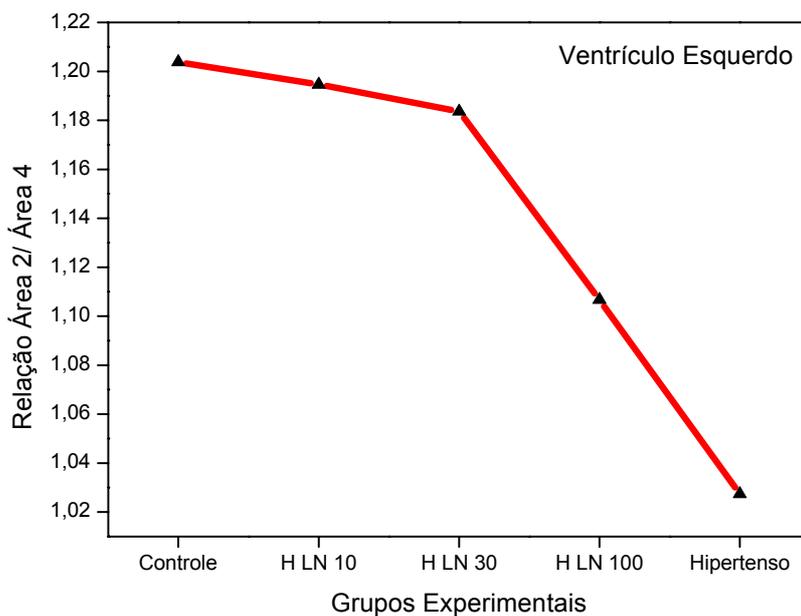


Figura 20: Relação entre A2/A4 do Ventrículo Esquerdo

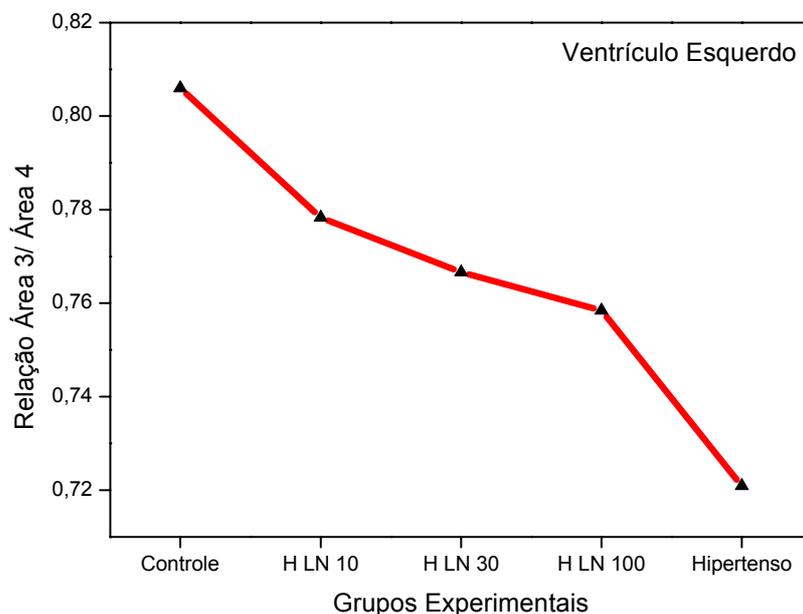


Figura 21: Relação entre A3/A4 do Ventrículo Esquerdo

As Figuras 1 mostra as médias de espectros FT-Raman de tecido muscular cardíaco de rato normal e de ratos hipertensos sem tratamento e submetidos a tratamento com Arginina, adquiridos nos deslocamentos Raman de 800-1800 cm^{-1} . Nestas figuras podemos observar as alterações de intensidades entre as bandas dos diferentes grupos de estudo. A fim de estudar o comportamento destas alterações espectrais, as médias dos espectros Raman foram calculadas e posteriormente divididas de acordo com as bandas representativas de aminoácidos (área 1), de ligações peptídicas, evidenciando a estrutura secundária do colágeno (áreas 2 e 4) e o pico de proteínas e carboidratos (área 3). O cálculo das áreas relativas propõe uma avaliação sobre o comportamento dos espectros em função do grupo estudado. Na Tabela 3 podemos observar os valores da relação entre as áreas A2, A3 e A4 dos espectros FT-Raman de tecido muscular cardíaco dos quatro grupos. Estes valores foram transformados em gráficos para uma melhor visualização de como estas bandas espectrais estão relacionadas entre si, ou seja, de como as alterações relativas das intensidades dos picos, representando as alterações bioquímicas ocorridas no tecido cardíaco, variaram em cada grupo experimental. As figuras 3, 4 representam a Relação

entre A2/A4 do Ventrículo Esquerdo, Relação entre A3/A4 do Ventrículo Esquerdo, respectivamente.

6. Discussão

Hemodinâmica

A inibição da síntese de NO com análogos da L- arginina interfere no efeito hipotensor da acetilcolina e principalmente acabando por diminuir a duração da hipotensão (AISAKA et al, 1989).

Através da descoberta na qual os inibidores da NO sintase aumentam a atividade vasoconstritora *in vitro*, pesquisadores alavancaram a hipótese na qual essa inibição poderia induzir a hipertensão *in vivo*. A verdade é que, com a administração crônica de inibidores da NO sintase, é possível a induzir um efeito pressor de longa duração que se demonstra dependente da dose. O efeito pressor, que pode ser revertido pela L-arginina, pode ser associado com uma bradicardia reflexa e foi atribuído à inibição de um mecanismo vasodilatador endógeno (AISAKA, 1989; RESS, 1989; UMANS, 1990; BAYLIZ, 1990; RESS, 1990; ZATZ, 1991; BAYLIS, 1992).

De acordo com o trabalho realizado por RIBEIRO (1992), a administração na forma oral de um análogo da L-arginina, o L-NAME em ratos Wistar por quatro a seis semanas, induz hipertensão severa e progressiva, vasoconstrição e disfunção renal e segundo Ribeiro, com uma semana de inibição, a hipertensão pode ser parcialmente revertida por suplementação de altas doses de L-arginina.

Conforme o trabalho realizado por Ribeiro em 1992, os resultados obtidos após administração de forma oral do análogo L-NAME durante quatro semanas em ratos Wistar, demonstraram o aumento dos valores pressóricos caracterizando um quadro hipertensivo. Ribeiro cita a reversão parcial da hipertensão através da suplementação de L-arginina em altas doses, na qual concordamos em parte, pois foi observado nos resultados obtidos do presente estudo que essa reversão também foi dependente da dose administrada, uma vez que observamos uma diminuição dos valores pressóricos partindo da menor dose (10mg de L-arginina), passando por (30mg de L-arginina) e por fim chegando na maior dose (100mg de L-arginina) com um efeito hipotensor maior.

A função dos nitrovasodilatadores é o de promover um efeito hipotensor *in vivo* pelo fato de diminuírem a resistência vascular que está diretamente associada com o aumento dos níveis de GMP_c circulante (PEARL, 1984).

Outro trabalho mostrando o efeito hipotensor da L-arginina foi realizado por Wang et al (1994), na qual investigaram o efeito da administração oral de L-arginina na pressão sanguínea, em alguns parâmetros metabólicos e de coagulação em 6 sujeitos saudáveis por um período de 1 semana. Os resultados indicaram que um moderado aumento da concentração da L-arginina plasmática reduz significativamente a pressão sanguínea.

Um estudo realizado por Ress (1990) associaram atividade física diária com suplementação oral de L-arginina na dose de 8gr. diárias em pacientes com doenças cardíacas crônicas e chegaram a conclusão de que tanto a atividade física regular como a utilização da L-arginina, melhoram a propriedade vasodilatadora do endotélio e a associação de ambas intervenções podem melhorar os efeitos a respeito da vasodilatação endotelial dependente.

Clarkson e col. (1996), em estudo utilizando a suplementação de forma oral da L-arginina, demonstraram que os níveis plasmáticos de L-arginina aumentaram após sua ingestão e que também ocorreu uma dilatação endotélio dependente no grupo avaliado, sugerindo mais uma vez que o óxido nítrico seria responsável pelo aumento da vasodilatação.

Conforme mencionado por Ribeiro (1992), o presente estudo também induziu um grupo de ratos Wistar tratados por quatro semanas à hipertensão utilizando o análogo da L-arginina, o L-NAME e também foi observado a instalação do quadro hipertensivo.

Foi constatado também uma reversão parcial e gradativa do quadro hipertensivo relacionado com a dose da suplementação de L-arginina, obedecendo a ordem da menor para a maior dose utilizada por via oral (10 mg, 30 mg, 100 mg) de acordo com Ribeiro em 1992

A L-arginina nos parece ter alguma relação no papel hipotensor de vasodilatação que liberam EDRF de acordo com os resultados do presente estudo. O efeito pressor pode ser revertido pela L-arginina, podendo ser associado com uma bradicardia reflexa e pode ser atribuído à inibição de um mecanismo vasodilatador endógeno que foi observado nos grupos tratados com L-arginina. Essa bradicardia reflexa se dá pelo aumento da pressão dos barorreceptores produzindo um aumento da descarga de impulsos. A vasoconstrição localizada em um vaso provoca o aumento

compensatório da liberação local do NO, relaxando-o e, desta forma, demonstrando que os mecanismos de adaptação do sistema cardiovascular contribuem, sobremaneira, para a manutenção da pressão arterial dentro de valores normais. Quando por algum motivo ocorre uma falha nessa liberação basal de NO, esta falha ou deficiência pode acarretar na elevação da pressão arterial. A administração por via oral do inibidor da NO sintase, L-NAME, utilizado no presente estudo, determinou em animais, a elevação da pressão sistêmica. Como relatado na literatura, quando a célula endotelial é estimulada, ocorre a liberação de NO, e ao atingir as fibras musculares lisas da camada média do vaso, liga-se ao grupamento heme da enzima guanilato ciclase, enzima responsável pela conversão do trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato de guanosina cíclica (GMP_c). Já o GMP_c torna-se responsável pelos efeitos e ações do NO. Com a elevação dos níveis de GMP_c acarretará uma diminuição dos níveis intracelulares de cálcio, ocorrerá uma redução da força de contração muscular, um relaxamento da musculatura e uma conseqüente vasodilatação e queda da pressão arterial.

De acordo com os resultados do presente estudo, o NO provoca variações nas propriedades contráteis, ou seja, no efeito inotrópico negativo e na frequência cardíaca, já no sistema cardiovascular o ato da liberação do NO irá atuar como mecanismo adaptativo geral, e dessa forma o endotélio responde às alterações em seu meio ambiente regulando o fluxo sanguíneo e a pressão arterial.

O duplo produto, podendo ser chamado também de MTTs (Modified Tension Time Index), é considerado como um importante parâmetro metabólico que auxilia no cálculo estimativo do consumo máximo de oxigênio do miocárdio. O duplo produto é um parâmetro que permite estabelecer uma correlação linear entre o produto da frequência cardíaca e a pressão arterial sistólica máxima (PAS_{max}), com o consumo de oxigênio do miocárdio (MARINE; GIANNICHI, 1999).

O produto da frequência e da pressão arterial sistólica, o duplo produto, é um parâmetro hemodinâmico encontrado através dos valores do produto citado acima e representa o nível de esforço do músculo cardíaco. Quanto maior os valores encontrados no duplo produto maior o consumo de oxigênio pelo miocárdio.

Na HA instalada pela administração do L-NAME, ocorre o aumento da demanda metabólica miocárdica devido ao estreitamento de microvasos. No presente estudo podemos verificar uma maior sobrecarga metabólica no grupo L-NAME

caracterizando um maior consumo de oxigênio do miocárdio na tentativa de manter as funções cardíacas, esta sobrecarga do sistema cardiovascular que é ocasionada pela HA e pela ativação de alguns fatores de crescimento, acaba por ocasionar alterações estruturais de adaptação, como o estreitamento do lúmen arteriolar, aumentando assim a resistência ao fluxo e ainda um aumento a resposta aos estímulos vasoconstritores.

Já os grupos tratados com L-NAME+L-Arginina tiveram uma menor sobrecarga no sistema cardiovascular devido a administração da L-arginina que nos parece ter alguma relação no papel hipotensor de vasodilatação que liberam EDRF, como citado anteriormente.

Os aumentos de pressão arterial e duplo produto foram revertidos pela administração concomitante de L-Arginina, de maneira dependente da dose de acordo com resultados apresentados.

Histológica

O remodelamento ventricular pode ser definido como variações moleculares, celulares e intersticiais cardíacas. O objetivo do remodelamento ventricular é o de manter as funções cardíacas estáveis a uma determinada injúria, como por exemplo a isquemia, inflamação, alterações genéticas (cardiomiopatia hipertrófica e dilatada), fatores mecânicos (sobrecarga hemodinâmica volumétrica e ou pressórica), bioquímicos (angiotensinaII, catecolaminas, endotelina I, interleucinas 1 e 6, fator de necrose tumoral, óxido nítrico, cálcio, estresse oxidativo), que podem tanto desenvolver o remodelamento cardíaco como regula-lo.

O remodelamento da estrutura do miocárdio na H.A. se dá por alteração do colágeno, devido ao crescimento de fibroblastos cardíacos, uma vez considerando que estas células contêm o código genético que é responsável por iniciar a síntese de colágeno fibrilar (WEBER, 1987), os miofibroblastos parece ter uma importante função nesta síntese de colágeno (WEBER, 1997).

O modelo experimental de H.A. com L-NAME provoca uma fibrose (perivascular e intersticial reparativa) e uma desorganização do músculo cardíaco que são muito mais intensas nas observadas no modelo renovascular (MORENO, 1996)

No presente estudo podemos observar que nos grupos L-NAME (HE) e L-NAME (Sírius Red) ocorreu um aumento do colágeno intersticial, um remodelamento geral, difuso e em todo o tecido cardíaco, ao passo que nos demais grupos tratados preventivamente com a L-Arginina pode-se notar focos mais intensos de remodelamento cardíaco misturados com áreas normais o que apresentou uma proteção parcial devido a sua administração. Não foi observado uma hipertrofia cardíaca.

Os resultados do presente estudo sugerem que as lesões miocárdicas instaladas em animais que foram submetidos ao L-NAME não são exclusivamente devido a HA, mas estão relacionados com a inibição crônica da síntese NO e a lesão do endotélio vascular.

A espectroscopia Raman é uma ferramenta poderosa para os estudo de estruturas e interações moleculares de diversos complexos biomoleculares. (TWARDOWSKI, ANZENBACHER, 1994; HANLON et al., 2000) Uma das grandes vantagens desta técnica é sua habilidade de promover informação sobre a estrutura e interações

biomoleculares em seus microambientes mantendo as estruturas tissulares intactas, de maneira não-destrutiva, sem a necessidade de preparação da amostra, desidratação, marcação ou utilização de agentes corantes nas mesmas.

O principal objetivo da aplicação da Espectroscopia FT-Raman em músculos cardíacos de ratos foi auxiliar na avaliação das alterações morfoquímicas existente entre o tecido cardíaco normal e as alterações ocorridas neste tecido pela hipertensão, bem como avaliar a possível manutenção do tecido cardíaco com o tratamento dos ratos hipertensos por diferentes concentrações de L-Arginina, e como esta auxiliou na manutenção de tecido sadio em detrimento de transformação fibrosa.

Através da espectroscopia Raman podemos avaliar a estrutura das proteínas os tecidos medidos, sendo no caso deste estudo à avaliação das fibras colágenas existentes no tecido cardíaco normal e as alterações espectrais ocorridas nos tecidos cardíacos hipertensos remodelados para um tecido fibroso com menos elasticidade em função do desgaste cardíaco nos ratos hipertensos e como a L-Arginina agiu neste processo evitando este remodelamento.

Os resultados histológicos observados no presente estudo foram melhor demonstrados pela Espectroscopia FT-Raman que revelou um aumento nos índices de colágeno, ou seja, um maior remodelamento cardíaco nos corações tratados com L-NAME.

7. Conclusão

Podemos inferir que, neste estudo o L-NAME foi capaz de induzir hipertensão e aumento significativo do Duplo produto, porém sem resultados significativos sobre os pesos cardíacos.

Os aumentos de pressão arterial e duplo produto foram revertidos pela administração concomitante de arginina, de maneira dependente da dose.

A inibição da NO-sintase foi capaz de produzir um abundante remodelamento cardíaco mas sem a hipertrofia esperada.

A L-Arginina foi capaz de impedir o remodelamento cardíaco induzido pelo L-NAME.

Podemos sugerir que a arginina pode vir a ser uma ferramenta valiosa na prevenção da hipertensão e do remodelamento cardíaco, principalmente nos casos relacionados a disfunções vasculares, e ainda, em atividades atléticas.

8. Referências Bibliográficas

ADYAMA, H.; SILVA, T. M. A.; MIRANDA, M. A.; FERREIRA, C. V. Proteínas tirosina fosfatase: propriedades, funções biológicas. **Quim Nova**, v.26, n.6, p.896-900, 2003.

ALCÂNTARA, P. **Espectroscopia Molecular**. Curso Física Moderna II. Centro de Ciências Exatas e Naturais, Departamento de Física, Universidade Federal do Pará, p.1-5, 2002.

ANGEL, S.M.; CARRABBA, M.; COONEY T.F. The utilization of diode lasers for Raman spectroscopy. *Spectrochim. Acta A. Mol Spectrosc.*, n.51, p. 1779-99, 1995.

ADAMS, I. I. R. Physiologic, pathophysiologic, and therapeutic implications for endogenous nitric oxide. **J Am Med Assoc**, v.209, p.1297-1302, 1996.

AISAKA, K.; GROSS, S.S.; GRIFFITH, O. W.; LEVI, R. L. Arginine availability determines the duration of acetylcholine – induced systemic vasodulation in vivo. **Biochem, Biophys Res. Commun**, v. 163, p. 710-717, 1989.

AISAKA, K.; GROSS, S.S.; GRIFFITH, O. W.; LEVI, R. N^G – methylarginine, an inhibitor of endothelium – derived nitric oxide synthesis, is a potent agent in the guinea pig: does nitric oxide regulate blood pressure in vivo? **Biochem Biophys Res Commun**, v. 160, p. 881-886, 1989.

ARCHER, S. Measurement of nitric oxide in biological models. **Faseb J**, v7, p.349-360, 1993.

BARBUL, A.; RETTURA, G.; LEVENSON, S. M. Wound healing and thymotropic effects of arginine: a pituitary mechanism of action. **Am J Clin Nutr**, v.37, p.786-794, 1983.

BARBUL, A.; LAZAROU, S. A.; EFRON, D. T. Arginine enhances wound healing and lymphocyte immune responses in humans. **Surgery**, v.108, p.331-337, 1990.

BARRACHINA, M. D.; PANES, J.; ESPLUGUES, J. V. Role of nitric oxide in gastrointestinal inflammatory and ulcerative diseases: perspective for drugs development. **Curr Pharm Des**, v.7, p.31-48, 2001.

BAYLIS, C.; HARTON, P.; ENGELS, K. Endothelium – derived relaxing factor controls renal hemodynamics in the normal rat Kidney. **J. Am. Soc. Nephrol**, v. 1, p. 875-881, 1990.

BAYLIS, C.; MITRUKA, B.; DENG, A. Chronic blockade of nitric oxide in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. **J. Clin. Invest.** v. 90, p. 278-281, 1992.

BEAUMIER, L.; CASTILLO, L.; AJAMI, A. M.; YONG, V. R. Urea cycle intermediate kinetics and nitric excretion normal and “therapeutic” intakes of arginine in humans. **Am J Physiol**, v.269, p.E884-96, 1995.

BARRON, W. M.; LINDHELMER, M. D. **Complicações médicas na gravidez.** Porto Alegre: Artes médicas, 1995,. Cap.1.

BRETT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of GMP levels in the cerebellum. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 86, p. 9030-3. 1989.

BODE-BÖGER, e col. L-arginine induces nitric oxide-dependent vasodilatation in patients with critical limb ischemia. **Circulation**. v.93, p. 85-90. 1996.

BORGES, V. C.; DUARTE, A. J. S.; WALTEBERG, D. L. **Imunonutrição: uma perspectiva.** Rio de Janeiro, Atheneu, 1990, p.380-391.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Hipertensão arterial como problema de saúde pública Controle da hipertensão arterial.** Uma proposta de interação ensino-serviço. Rio de Janeiro, p.49-65, 1993.

BRETT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 86, p. 9030-3. 1992.

BURROW, G. N.; FERRIS, T. F. **Medical Complication during Pregnancy**, 4. ed. Philadelphia, WB Saunders Company, 1995.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido Nítrico: revisão. **Acta Cir. Bra.** v. 17, n. 417-23. 2002.

CASTILLO, L.; CHAPMAN, T. E.; YU, Y. M.; AJANI, A. M.; BURKE, J. F.; YOUNG, V. R. Dietary arginine uptake by the splanchnic region in adults humans. **Am. J. Physiol.** v. 265. p. 532-539, 1993.

COLLINS, R.; MACMAHON, S., Blood pressure stroke and coronary heart disease. **Lancet**, .v.335, p.827-838, 1990.

CONGER, F. D. Endothelial regulation of vascular tone. **Hosp Pract**, v.15, p.117-26, 1994.

COOKE, J. P.; Isao, P. S. Cytoprotective effects of nitric oxide. **Circulation**, v.88, p.2451-4, 1993.

CHESTER, A. H.; O'NEIL, G. S.; MONCADA, S.; TADJKARIMI, S.; YACOUB, M. H. Low basal and stimulated release of nitric oxide in atherosclerotic epicardial coronary arteries. **Lancet**, v.336, p.897-9000, 1990.

CLARRSON, P., e col. Oral arginine improves endothelium-dependent dilation of hypercholesterolemic young adults. **J Clin Invest.** v. 97, p. 1989-1994. 1996.

DALY, J. M.; REYNOLDS, J.; SIGAL, R. K. Effect of dietary protein and amino acids on immune function. **Supplement to Critical Care Medicine**, v.18, n.2, p.586-593, 1990.

DALY, J. M.; REYNOLDS, J.; THON, A. Immune and metabolic effects of arginine in the surgical patient. **Ann Surg**, v.208, n.4, p.512-523, 1988.

DUDRICK, P. S.; SOUBA, W. W. Amino acids in surgical nutrition. **W.B. Saunders Company**, v.71, n.3, p.459-476, 1991.

DUSSE, L. M. S. Óxido nítrico (NO): o desafio de sua determinação. **Laes & Haes**. v.1, p. 176-184, 1988

FARIA, D. L. A.; SANTOS, L. G. C. A demonstração sobre o espalhamento inelástico da luz: repetindo o experimento de Raman. **Química Nova**, n.20, v.3, p.319-323, 1997.

FARREL, A. J.; BLAKE, D. R. Nitric oxide (review). **Ann Rheum Dis**, v.55, p.7-20, 1996.

FERRENDELLI, J. A. e col. Elevation of cyclic GMP levels in central nervous system by excitatory and inhibitory amino acids. **J. Neurochem.** v. 22, p. 535-40, 1974.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Ass. Méd. Brasil.** v 46, n 3, p. 265-271, 2000.

FONSECA NETO, J.; ALCOCER, P. R. C. Compressão de Imagens Médicas Utilizando a Técnica JPEG-DPCM, In: FÓRUM NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA EM SAÚDE,4., **Anais...**Curitiba, 1998. p. 411-412.

FORTE, P.; KNEALE, B. J.; MILNE, E.; CHOWIENCZYK, P. J.; JOHNSTON, A.; BENJAMIN, N.; RITTER, J. M. Evidence for a difference in nitric oxide biosynthesis between healthy women and men. **Hypertension**, v.32, p.730-734, 1998.

FÖRSTERMANN, U.; CLOSS, E. L.; POLLOCK, J. S.; NAKANE, M.; SCHAWARZ, P.; GATH, I.; KLEINERT, H. Nitric oxide synthase isozymes: characterization, purification, molecular cloning, and functions. **Hypertension**, v.23 (part 2), p.1121-1131, 1994.

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

GARTHWAITE, J. e col. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. **Eur. J. Pharmacol.** v. 172, p. 413-6. 1989.

GREEN, L. C. e col. Nitrate biosynthesis in man. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 78, p. 7764-8. 1981a.

GREEN, L. C. e col. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science.** v. 212, p. 56-8. 1981.

HIBBS, JR.; J. B. e col. L-arginine is required for the expression of the activated metabolic in target cells. **J. Immunol.** v. 138, p. 550-65.1987.

HIBBS, JR.; J. B. e col. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 157, p. 87-94. 1988.

HALON, E.B.; MANOHARAN, R.; KOO, T.W.; SHAFER, K.E.; MOTZ, J.T.
Phys. Med. Biol. v.45, n.1. 2000.

IGNARRO, L. J. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide.
Ann Ver Pharmacol Toxicol, v 30, p.535-560, 1990.

IGNARRO, L. J. Endothelium derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. **Circ. Res.** v. 61, p. 866-79. 1987.

INOUE, Y.; BRODE, B. P.; BECK, D. J.; LI, A. P. ; BLAND, K. I.; SOUBA, W. W. Arginine transport in human liver. **Ann. Surg.** v. 218, p. 350-363, 1993.

JARDIM, P. S. A. Hipertensão arterial e doenças do coração. **Alerta Hipertenso**, v.9, p.4-5, 1997.

JNC-VI - The sixth report of the Joint National Committee on detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. **Arch Intern. Med**, p.2413-2446, 1997.

KANNEL, W. B. Potency of vascular risk factors as the basis for antihypertensive therapy. **Eur. Heart J.**, v.13, p34-42, 1992.

KATSUKI, S. A. e col. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. **J. Cyclic Nucleotide Res.** v. 3, p. 23-5. 1977.

KIECHELE, F. L.; MARLINSKI, T. Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology and detection. **Am. J. Clin. Pathol.** v. 100, p. 567-75. 1993.

KNOWLES, R. G. e col. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 86, p. 5159-62. 1989.

KICHLER, F. L.; MALINSKI, T. Nitric oxide: Biochemistry, pathophysiology, and detection. **Am J Clin**, v.100, p.567-575, 1993.

KOSHLAND, J. R. The molecule of year. **Science**, v.258, p.1861, 1992.

KONTUREK, S. K.; KONTUREK, P. C. Role of nitric oxide in the digestive system. **Digestion**. v.56, p. 1-13, 1995.

KUO, P. C.; Schroeder, R. A. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. **Ann Surg**, v.221, p.220-35, 1995.

LATUFO, P. A; LOLIO, C. Amaro de. Epidemiologia da Hipertensão Arterial no Brasil. **INSOCESP CARDIOLOGIA**. v.2, cap. 37, p. 327-331; Atheneu, 1996.

LIEBSON, P. R.; GRANDITS, G.; PRINEAS, R. Echocardiographic correlates of left ventricular structure among 844 mildly hypertensive men and women in the treatment of mild hypertension study (TOMHS). **Circulation**, v.87, p.476-486, 1993.

LOSCALZO, J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. **Circ Rev**, v.88, p.756-62, 2001.

LOSCALZO, J. What we know and don't know about L-arginine and NO. **Circulation**, v.101, p.2126-2129, 2000.

LOSEKAM, A. **Hipertensão arterial induzida por eritropoetina recombinante em ratos: o efeito do ácido-acetil salicílico** 1997. [Dissertação]. Porto Alegre. Pontífica Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 1997.

LYONS, C. R. The role of nitric oxide in inflammation. **Adv Immunol**, v.60, p.323-55, 1995.

MADDEN, H. P.; BRESLIN, R. J.; WASSERKRUG, H. L. Stimulation of T cell immunity by arginine enhances survival in peritonitis. **J Surg Rev.**, v.44, p.658-663, 1988.

MEGNIEN, J. L.; SIMON, A.; LEMARIEU, M. Hypertension promotes coronary calcium deposit in asymptomatic men. **Hypertension**, v.27, p.949-954, 1996.

MESSERLI, F. H.; KETELHUT, R. Left ventricular hypertrophy: A pressure-independent cardiovascular risk factor. **J. Cardiovasc. Pharmacol**, v 22, p.57-513, 1993.

MISSAULT, L. H.; DUPREZ, D. A.; BRANDT, A. A. Exercise performance and diastolic filling in essential hypertension. **Blood Press**, v.2, p.284-288, 1993.

MEDIRATTA, S.; FOZAILIFF, A.; FRISHMAN, W. Insulin resistance in systemic hypertension: Pharmacotherapeutic implications. **J. Clin. Pharmacol**, v.35, p.943-956, 1995.

MACMAHON, S.; RODGERS, A. The effects of blood pressure reduction in older patients: an overview of five randomized controlled trials in elderly hypertensives. **Clin. Exp. Hypertens**, v.15, p.967-978, 1993.

MACMAHON, S.; PETO, R.; LUTLER, J. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease: Part 1. Prolonged differences in blood pressure. Prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. **Lancet**, v.335, p.765-774, 1993.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; PEREIRA, L. M. M. Stereology of the myocardium in hypertensive rats under chronic inhibition of nitric oxide synthesis. **Biomed Res.** v. 8, p. 153-60. 1997.

MARINE, J. C. B.; GIANNICHI, R. S. **Avaliação e prescrição de atividade física.** 2 ed. Rio de Janeiro. P. 147. Shape. 1999.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v.43, n.2, p.109-142, 1991.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine- nitric oxide pathway. **New Engl J Med**, v.339, n.27, p2002-2012, 1993.

MOLLACE, V.; SALVEMINI D.; ANGGARD, E.; VANE, J. Nitric oxide from vascular smooth muscle cells: regulation of platelet reactivity and muscle cell guanylate cyclase. **Br J Pharmacol**, v104, p.633-638, 1991.

MORENO,H.;METZE, K.; BENTO, A. Chronic nitric oxide inhibition as a model of hypertensive heart muscle disease. **Basic Research Cardiol.** v. 91, p. 249-55. 1996.

MULROW, C. D.; CORNELL, J. A.; HERBERA, C. R. Hypertension in the elderly: Implications and generalizability of randomized trials. **JAMA**, v.272, p.1932-1938, 1994.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **Faseb J**, v6, p.3051-3064, 1992.

NUMAGUCHI, K.; EGASHIRA, K.; TAKEMOTO, M. E COL. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis cause coronary microvascular remodeling in rats. **Hypertension.** v. 26. [part 1], p. 957-62. 1995.

PALMER, R.M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v.327, p.524-526, 1987.

PALMER R. M. J.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v.333, p.664-666, 1988.

PEARL, R. G.; ROSENTHAL, M. H.; MURAD, F.; ASHTON, J. P. Aminophylline potentiates sodium nitroprusside – induced hypotension in the dog. **Anesthesiology**, v. 61, p. 712-715, 1994.

PERRY, i. j.; WHIWP, P. H.; SHAPER, A. G. Environmental factors in the development of essential hypertension. **Br. Med. Bull**, v.50, p.246-259, 1994.

REES, D. D.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Role of endothelium – derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v. 86, p. 3375-3378, 1989.

REES, D. D.; PALMER, R. M. J.; SCHUULS, R.; HODSON, H. F.; MONCADA, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthetase in vivo. **Br. J. Pharmacol**, Vo. 101, p. 146-752, 1990.

ROBERTS, W. C. Blood lipid levels and antihypertensive therapy. **Am. J. Cardiol**, v.80, p.33E-35F, 1987.

RODRIGUES, L. E. A. **Enzimologia clínica**. Rio de Janeiro: Revinter, 2001. 156p.

RAPOPORT, R. M.; MURAD, F. A. Agonist induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cyclic GMP. **Circ. Rec.**v. 52, p. 352-7. 1983.

RIBEIRO, M. O.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G.; LOVISOLO, S. M.; ZATZ, R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis: a new model of arterial hypertension. **Hypertension**, v. 20, p. 298-303, 1992.

RIERA, Andrés R. P. **Hipertensão arterial: Conceitos práticos e terapêutica**. São Paulo: Atheneu, 2000. 1p.

SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1995. 224 p.

SELLIGMAN, S.; BUYON, J. P.; ROBERT, M. D.; CLANCY, M.; YOUNG, B. K.; ABRAMSON, S. B. The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol**, v.171, n.4, p.944-948, 1994.

SCHRADER, B. et al. NIR FT Raman spectroscopy - a new tool i medical diagnosis. **J. Mol Struct.**, n.408, v.1, p.23-31, 1997.

SCHRADER, B. **Infrared and Raman Spectroscopy**. New York: VCH Publishers, 1995. Cap.4

SCHMIDT, H. H. H. W.; WALTER, U. NO at work. **Cell**. v. 78, p. 919-25. 1994.

SCHULTE, K. D. e col. Sodium nitroprussiat and other smooth muscle relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferent. **Nature**. v. 265, p. 750-1. 1977.

SCHRADER, B. **Raman/ Infrared Atlas of Organic Compounds**. Alemanha: VCH Verlagsgesellschaft, 1989. 1118p.

SCHARADER, B.; MOORE, D.S. **Laser-based molecular spectroscopy for chemical analysis: Raman scattering process, IUPAC Recommendations**. 1997. <http://www.iupac.org/reports/V/spectro/partXVIII.pdf> . Acesso em: fev.2004.

SNYDER, S. H.; BREDT, D. S. Biological roles of nitric oxide. **Scientific American**. May, p. 28-35. 1992.

SHAPIRA, S.; KADAR, T.; WEISSMAN, B. A. Dose-dependent effect of nitric oxide synthase inhibition following transient forebrain ischemia in gerbils. **Brain Rev**, v.668, p.80-84, 1994.

SOUBA ; PACITTI, A. J. How amino acids get into cells: mechanisms, models, menus, and mediators. **J. Parenter. Enteral Nutr.** v. 16, p. 569-578, 1992.

STAMLER, J.; NEATON, J.; WENTWORTH, D. Blood pressure and risk of fatal coronary heart disease. **Hypertension**, v.13, p.2-12, 1993.

STEWART, K. J. **Manual de pesquisa das diretrizes da ACSM para os testes de esforço e sua prescrição**. 4. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 286-287.

SZABÓ, C. Alterations in nitric oxide in various forms of circulatory shock. **New Horizons**. v. 3, n. 1, p. 2-32. 1995.

TWARDOWSKI, J.; ANZENBACHER, A. **Raman and IR Spectroscopy in Biology and Biochemistry**. Horwood, Chichester. 1994.

UMANS, J. G.; LINDHEIMER, M. D. BARRON, W. M. Pressor effect of endothelium – derived relaxing factor inhibition in conscious virgin and gravid rats. **Am. J. Physiol**, v. 259. p. F293-296, 1990.

VAN BUREN, C.T. Immunonutrition. **Supplement to JPEN**, v.17, n.1, 1990.

VIARO, F.; NOBRE, F.; EVORA, P. R. B. Expressão das óxido nítrico sintases na fisiopatologia das doenças cardiovasculares. **Arq Bras Cardiol**, v.75, n4, p.366-367, 2000.

VISSER, D. C. de; Van Hooft, I. M.; Van Doornen, L. J., col. Anthropometric measures, fitness and habitual physical activity in offspring of hypertensive parents. Dutch hypertension and Offspring study. **Am. J. Hypertens**, v.7, p.242-248, 1994.

WANG, D.; YANG, X. P.; LIU, Y. H. CARRETERO, O. A.; LAPOINTE, M. C. Reduction of myocardial infarct size by inhibition of inducible nitric oxide synthase. **Am J Hypertens**. v. 12, p. 174-82. 1994.

WU, G.; MORRIS, JR., S. M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochem J**, v.336, p.1-37, 1988.

WENNMALM, A. Endothelial nitric oxide and cardiovascular disease. **J Int Med**, v.235, p.317-27, 1994.

WEBER, K. T. metabolic responses of extracellular matrix in tissue repair. **Ann Med**. v. 29, p. 333-8. 1997.

WEBER, K. T.; CLARK, W. A.; JANICKI, J. S.; SHROFF, S. G. Physiological versus pathologic hypertrophy and the pressure overloaded myocardium. **J. Cardiovasc Pharmacol**. v. 10, p. 537-50. 1987.

WONG, G. K. T.; MARSDEN, P. A. Nitric oxide synthases: regulation in disease. **Nephrol Dial Transplant**, v.11, p.215-220, 1996.

ZAMIN Jr, I.; MATTOS, A. A.; PERIN, C.; RAMOS, E. Z. A importância do índice AST/ALT no diagnóstico da esteatohepatite não alcoólica. **Arq Gastroenteral**, v.39, n1, p1+-2, 2002.

ZATE, R.; DE NUCCI, G. Effect of acute nitric oxide inhibition on glomerular microcirculation. **AM. J. Physiol**, v. 261, p. F360-F366, 1991.

ZICHE, M.; Morbidelli, L. Nitric oxide and angiogenesis. **J Neurooncol**, v.50, p.139-48, 2000.

Anexo



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVAP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.º L032/2005/CEP, intitulado "*Estudo hemodinâmico e morfológico do miocárdio de ratos hipertensos. Correlação com tratamento preventivo com L-arginina*", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Rodrigo Álvaro L. Martins, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA/Junho de 1991) e segue as Normas Para a Prática Didático-Científica da Visissecção de Animais (Lei 6638 de 08/05/1979) sendo, portanto, **aprovado** por esta Comissão de Ética em Pesquisa.

Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação.

São José dos Campos, 07 de outubro de 2005.

PROF. DR. LANDULFO SILVEIRA JUNIOR
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVAP