



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO
***PAPEL DE LA ARGINASA EN LA
PATOLOGÍA CARDIOVASCULAR***

Autor: Sara Salamanca Postigo
Tutor: Dra. Belén Climent Flórez
Convocatoria: Julio 2016

ÍNDICE

	<u>Página</u>
Resumen.....	3
Introducción.....	3
- El Endotelio Vascular.....	3
- ¿Qué es la arginasa?	4
- Relación entre la arginasa y el óxido nítrico....	7
<u>Objetivos.....</u>	8
<u>Material y método.....</u>	9
<u>Discusión y resultados.....</u>	9
- Arginasa y aterosclerosis.....	9
- Arginasa y DM	10
- Arginasa, isquemia/reperfusión.....	12
<u>Perspectivas farmacoterapéuticas.....</u>	14
<u>Conclusiones.....</u>	15
<u>Bibliografía.....</u>	16

Resumen

La arginasa es una enzima relevante en la patología cardiovascular ya que compite con la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) por la L-arginina, sustrato común. La eNOS utiliza la L-arginina para producir óxido nítrico (NO), gas, sintetizado por las células endoteliales, de gran importancia por su acción vasodilatadora, acción antiagregante y que además inhibe la activación leucocitaria (**Guyton and Hall.,2005**). El óxido nítrico en el endotelio es liberado por diversos estímulos, tales como el estrés de rozamiento cuando la sangre circula a través de las arterias y arteriolas, la acetilcolina, la bradicinina, los nucleótidos de adenina o la histamina (**Arellano.,2013**). El endotelio tiene un papel de gran relevancia en la regulación, mantenimiento y control de las funciones cardiovasculares, siendo vital su correcto funcionamiento, sin embargo, una elevada expresión de la arginasa conlleva a una disminución en los niveles de NO dando lugar a disfunción endotelial. Se ha demostrado que, en patologías cardiovasculares como la aterosclerosis, isquemia de miocardio hay una disminución de la concentración de NO, consecuencia del aumento de la actividad de la arginasa, y por tanto disfunción endotelial.

Introducción y antecedentes

1. El endotelio vascular

El endotelio vascular está formado por células endoteliales que forman parte junto con las células musculares lisas de la pared vascular. Las células endoteliales desempeñan cuatro funciones principales: *controlar el tono del músculo liso, actividad antitrombótica-anticoagulante, acción barrera para los componentes plasmáticos y secreción de factores inhibidores del crecimiento* (**Arellano.,2013**).

El endotelio posee la capacidad de liberar sustancias tanto vasodilatadoras como constrictoras, modulando así el tono del músculo liso. Las principales sustancias vasodilatadoras son el óxido nítrico, anteriormente nombrado, y la prostaciclina (PGI_2), mientras que las sustancias vasoconstrictoras son la endotelina 1, el tromboxano A2 y la angiotensina II.

El NO se produce mayormente por la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) utilizando como sustrato la L-arginina para llevar a cabo esta síntesis (**Chen et al.,2008**), para ello,

la NOS requiere de la presencia de varios cofactores incluyendo la tetrahidrobiopterina (BH_4), flavina adenina dinucleótido, flavina mononucleótido, calmodulina y protoporfirina IX (Alderton *et al.*,2001). Tres genes codifican las isoenzimas de la NOS que catalizan la síntesis de NO: 1) NOS neural (nNOS): encargada de producir NO tanto a nivel del sistema nervioso central como periférico teniendo por tanto un papel importante en la comunicación celular, 2) NOS inducida por citoquinas (iNOS): su expresión/presencia es mínima en condiciones fisiológicas, expresándose durante la infección, inflamación crónica, tumores y en la fase aguda de la reparación tisular así como valores citotóxicos de superóxidos y NO, ambos importantes en la eliminación de patógenos. 3) NOS endotelial (eNOS): Encargada de la función vascular. Estas tres isoformas son sintetizadas como monómeros y necesitan formar dímeros para unirse a la (BH_4) y al sustrato, L-arginina, y así poder catalizar la producción de NO. Estas isoenzimas sintetizadas como monómeros generan radicales O_2^- en lugar de NO dando lugar al desacoplamiento de la NOS (Forstermann *et al.*,2006).

2. ¿Qué es la arginasa?

La arginasa es una metaloenzima cuyo cofactor es el manganeso. Tiene sus orígenes en las primeras formas de vida. Se encuentra tanto en bacterias como levaduras, plantas, invertebrados y vertebrados.

Existen dos isoformas, *arginasa I* y *arginasa II*. La *arginasa I* está formada por 322 aminoácidos, es una enzima citosólica localizada principalmente en el hígado cuyo papel principal es la eliminación del nitrógeno formado en el ciclo de la urea. La *arginasa II* está formada por 354 aminoácidos, es una enzima mitocondrial localizada tanto en riñón como en próstata y en el tracto gastrointestinal. Su papel está aún sin definir.

La arginasa hidroliza a la *L-arginina* en *urea* y *L-ornitina*. La *L-arginina* es un aminoácido semiesencial obtenido del recambio/reciclaje de proteínas, pero en ocasiones necesario en la dieta. La *arginasa I* participa en el último paso del ciclo de la urea. La *ornitina* pasa a *L-citrulina* mediante la acción de la enzima *ornitina transcarbamilasa (OTC)* y la *carbamil fosfato sintasa 1 (CPS-1)*. Por otra parte, la *ornitina* por acción de la *ornitina descarboxilasa (ODC)* se transforma en poliaminas tales como, la putrescina, espermidina y espermina. Las poliaminas son importantes en el crecimiento celular, proliferación, cicatrización, reparación tisular y desarrollo neuronal. La *ornitina*, gracias

a la acción de la *ornitina amino transferasa (OAT)* se transforma en prolina, importante en la formación del colágeno (Morris.,2009).

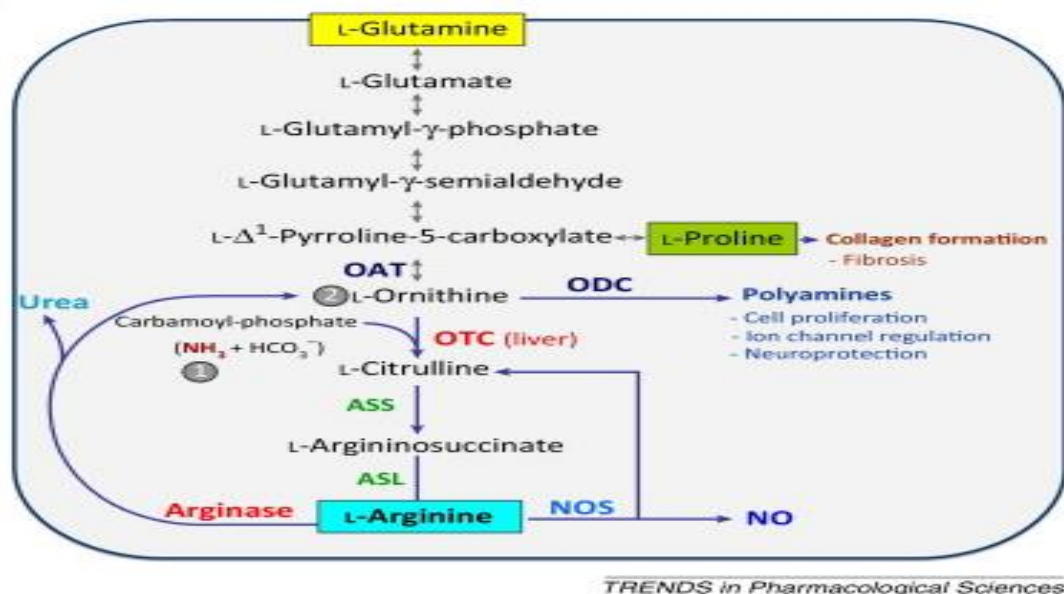


Figura 1: Síntesis de L-arginina desde L-Glutamina. Fuente: *TRENDS in Pharmacological Sciences*.

Es importante la actividad de la arginasa puesto que un aumento de la misma originaría una disminución de la biodisponibilidad del NO dando lugar a disfunción endotelial debido a la competición por el sustrato que presentan la eNOS y la arginasa (Pernow and Jung.,2013).

Además de estar elevada la actividad de la arginasa, disminuida la biodisponibilidad de NO y de L-arginina también tenemos elevados niveles de L-ornitina, relevante en la hiperplasia del músculo vascular liso, fibrosis y estenosis.

La expresión de la arginasa es consecuencia de varios factores pro-inflamatorios tales como los lipopolisacáridos, factor de necrosis tumoral (TNF)- α , e interferón- γ (Durante et al.,2007). Así mismo, las interleucinas 4, 10 y 13 (IL-4, IL-10 e IL-13) inducen la expresión de la arginasa en macrófagos exclusivamente (Munder et al.,2009).

Otros factores adicionales responsables de la expresión de la arginasa son: Lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDL) (Ryoo et al.,2006), altos niveles de glucosa, la trombina, la angiotensina II, la hipoxia, así como las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno entre las que se encuentran los peróxidos de hidrógeno y nitrógeno derivados de la eNOS y la NAPDH oxidasa.

Además, podemos encontrar vías de señalización intracelular activadas por proteína kinasas tales como la vía **C/RhoA/Rho kinasa (ROCK)** (Chandra *et al.*,2009), **proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK)**, **tirosina kinasas (TK)** (Toque *et al.*,2009) y **adenosina monofosfato cíclico proteína kinasas A (AMPKAc)**.

Así mismo, factores de transcripción también se encargan de la regulación de la expresión de la arginasa, es el caso de STAT-6 (traductor de señal y activación de la transcripción), C/EBP β , PU1 y PPAR γ y PPAR δ (Munder *et al.*,2009).

La Arginasa I experimenta una S-nitrosilación postraduccional que estabiliza el trímero de arginasa. Este efecto se observa en las células endoteliales y se cree que puede ser mediado por el NO producido por la isoforma iNOS (Santhanam *et al* 2007).

Se puede afirmar por tanto que la actividad de la arginasa puede ser modulada independientemente de los cambios que experimente en sus propios niveles (Pernow and Jung.,2013).

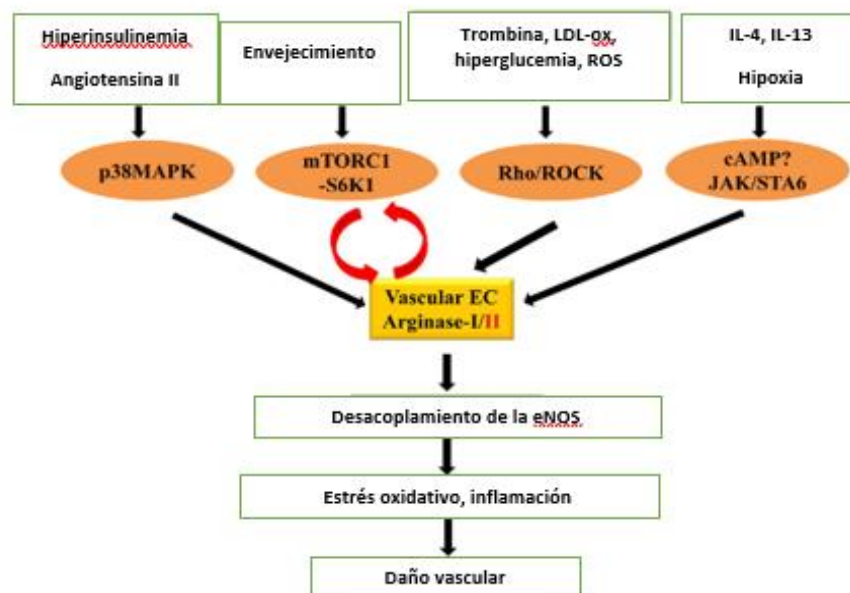


Figura 2: Mecanismos implicados en la regulación de la expresión/actividad de la arginasa. Fuente: *Frontiers in immunology* (modificada).

3. Relación entre la Arginasa y NO

Tanto la arginasa como la eNOS comparten la L-arginina como sustrato, por tanto, un aumento de la actividad de la arginasa conlleva a un mayor consumo de L-arginina necesaria para la producción de NO mediante la eNOS dando lugar a disfunción endotelial **(Pernow and Jung.,2013)**.

La regulación de la arginasa es de gran relevancia ya que la disminución de arginina para la producción de NO lleva consigo una disminución de NO, contribuyendo así a la disfunción endotelial con la consiguiente alteración vascular. Un factor importante que contribuye a la aparición de la disfunción endotelial es el denominado “desacoplamiento” de la eNOS. Esta situación tiene lugar cuando esta enzima produce superóxidos en lugar de NO como consecuencia de una deficiencia de sustrato y/o cofactor. **(Forstermann et al.,2012)**. Cuando esto sucede, la NOS produce una menor cantidad de NO y utiliza mayor cantidad de oxígeno molecular para formar superóxido, este, reaccionará rápidamente con cualquier molécula de NO para dar lugar a la formación de peróxinitrito **(Katusic, et al.,2009)**.

Los superóxidos son moléculas reactivas de oxígeno (ROS), tales como el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y óxido nítrico (NO), moléculas de señalización responsables de la regulación de funciones vasculares tales como la relajación vascular, respuestas inflamatorias o proliferación celular. Estas moléculas se producen de manera espaciada y temporal en condiciones normales, pues son importantes en la regulación de la homeostasis de funciones vasculares. Altas concentraciones de superóxidos dan lugar al estrés oxidativo y el consiguiente daño celular, por lo que es importante regular sus niveles

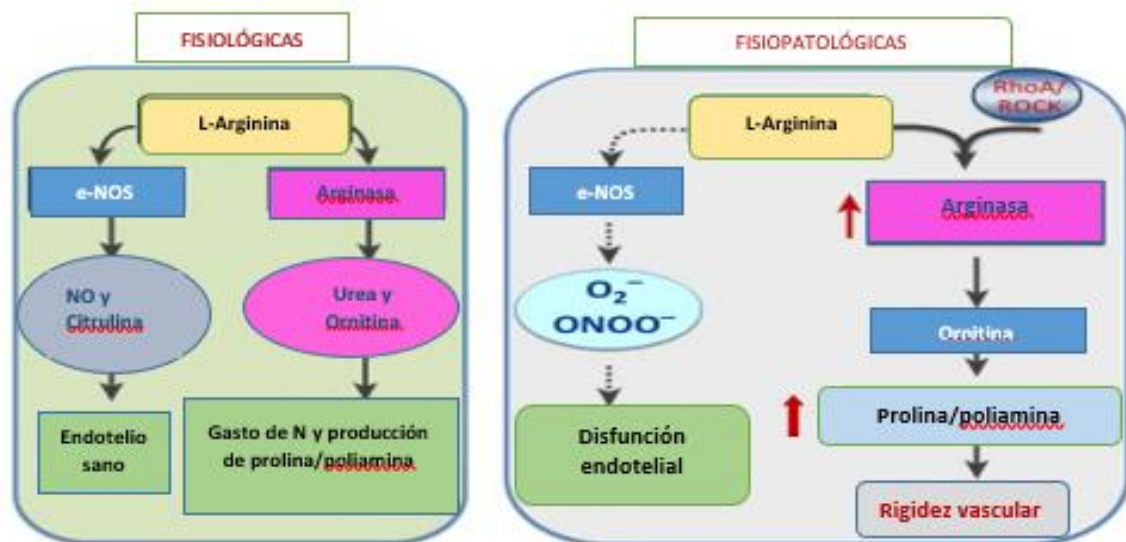


Figura 3: Actividad de la eNOS y arginasa en condiciones fisiológicas y patológicas

Fuente: *TRENDS in Pharmacological Sciences*. (modificada).

El estrés oxidativo se caracteriza por un aumento de la producción de moléculas oxidantes o moléculas oxígeno reactivas, tanto radicales como no radicales, que van a ocasionar daño a nivel del DNA, lípidos y proteínas, dando lugar a daño celular o incluso muerte celular.

El desacoplamiento de la eNOS es una fuente importante de especies reactivas de oxígeno en condiciones patológicas. Estas especies oxidantes contribuyen a la disfunción endotelial, por tanto, una inhibición de la arginasa daría lugar a un aumento de la biodisponibilidad del NO reduciendo los niveles de superóxidos y por tanto aumentando la función endotelial (Romero *et al.*,2008; Kim *et al.*,2009).

Objetivos

El objetivo de este trabajo es hacer una revisión bibliográfica sobre el estado actual del papel de la arginasa en las diferentes patologías cardiovasculares en particular el papel de la arginasa en la aterosclerosis, diabetes mellitus y la isquemia/reperfusión (I/R) por ser patologías de elevada incidencia en la población.

Material y métodos

Se ha realizado una revisión bibliográfica descriptiva en bases de datos científicas como Pubmed. Además, se utilizó como consulta el libro **Guyton y Hall 10ª Edición y Sisinio de Castro 7ª Edición.**

Resultados y discusión

Tal y como se ha mencionado anteriormente el aumento de la expresión de la arginasa conlleva una disminución del NO y en consecuencia contribuye a la aparición de disfunción endotelial, de este modo. La disfunción endotelial es un factor común en un gran número de patologías cardiovasculares, entre las que se encuentra la hipertensión, aterosclerosis, en la isquemia/reperfusión y la diabetes mellitus entre otras. En la presente revisión bibliográfica se va a estudiar el papel de la arginasa en aterosclerosis, diabetes y en isquemia/reperfusión.

1. Arginasa y aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad de las arterias grandes e intermedias en la que se produce la formación de lesiones grasas denominadas placas ateromatosas en las paredes de las arterias. Comienza con el depósito de cristales de colesterol para dar paso a placas de mayor tamaño. Estos depósitos van a reducir la luz del vaso además de reducir el flujo sanguíneo llegando a obstruir el vaso (**Guyton and Hall.,2005**).

Un evento temprano en la aterosclerosis es el daño en la función endotelial vascular causando anomalías en la pared de la arteria contribuyendo a la formación de la placa de ateroma (**Bonetti et al.,2003**).

Un indicio de acumulación indica que los LDL oxidados están involucrados en la aterosclerosis (**Ryoo et al.,2006**). En un estudio con ratones modificados genéticamente, llevado a cabo por (**Ming et al 2004**), se observa también un aumento de la actividad y expresión de la arginasa, y se cree que los LDL oxidados parecen ser los responsables de esta elevación gracias a la acción del receptor de LDL oxidados 1 (**LOX-1**) y la activación de la vía de señalización Rho quinasa (**ROCK**). Por otro lado, la activación de la arginasa II mediante LOX-1 da lugar al desacoplamiento de eNOS y disminución de los niveles

de NO. Además, la inhibición de LOX-1 y la vía ROCK atenúan la actividad de la arginasa en células endoteliales.

Varios estudios corroboran el aumento de la expresión de la arginasa en modelos experimentales de aterosclerosis como el llevado a cabo por Ming y colaboradores, donde se muestra que en ratones modificados genéticamente donde ha sido inactivado el gen para la *apolipoproteína E* (*knockout apoE^{-/-}*) alimentados con una dieta rica en colesterol, se producía una elevación significativa de la actividad de la arginasa en la aorta, en comparación con los ratones controles de la misma edad. (Ming *et al.*, 2004). Asimismo, se cree que este efecto debe ser mediado a través de la arginasa II ya que esta isoforma es la predominante en estos ratones. En el estudio mencionado anteriormente, también se demostró que en células endoteliales la actividad de la arginasa era controlada por la vía de señalización RhoA/ROCK. Por otro lado, la actividad de la arginasa era inhibida por el inhibidor de la HMG-CoA reductasa, una estatina, la **fluvastatina**, pues esta inhibía la vía RhoA (Laufs *et al.*, 2010).

Se puede concluir que existe una relación entre la arginasa y la aterosclerosis tras la observación de la reducción de los valores de actividad de la arginasa tras extracción del endotelio corroborando así la contribución de las células endoteliales (Ryoo *et al.*, 2008).

2. Arginasa y Diabetes

La diabetes mellitus es un síndrome donde se alteran el metabolismo de los hidratos de carbono, grasas y proteínas, bien por falta de secreción de insulina o por disminución de la sensibilidad tisular a esta hormona. Se conocen dos tipos de diabetes mellitus:

- a) Diabetes de tipo I, o diabetes mellitus insulino dependiente, caracterizada por una falta de secreción de insulina.
- b) Diabetes de tipo II o diabetes mellitus no insulino dependiente en la cual hay una menor sensibilidad de los tejidos efectores a las acciones metabólicas de la insulina, conocida como resistencia a la insulina.

En la diabetes la mayoría de las células exceptuando las del encéfalo no absorben ni utilizan de modo eficiente la glucosa obteniendo por tanto un aumento de la glucemia, un descenso progresivo de la utilización celular de la glucosa y por consiguiente un aumento de la utilización de las grasas y proteínas (Guyton and Hall., 2005).

La diabetes se caracteriza por desencadenar disfunciones macro y microvasculares. Este daño vascular está asociado fuertemente al estrés oxidativo e inflamación (**Creager et al.,2003**) ambos relacionados con un aumento en la actividad y expresión de la arginasa.

Se ha descrito que niveles altos de glucosa elevan la actividad de la arginasa en células endoteliales coronarias y se cree que este efecto es dependiente de las Rho quinasas (**Yao et al.,2013**). Curiosamente por otra parte, niveles altos de glucosa también elevan la producción de superóxido vía NOS. Ambas observaciones sugieren que la elevada actividad de la arginasa inducida por valores elevados de glucosa resulta en una producción elevada de superóxido vía NOS, posiblemente ligada a una deficiente disponibilidad de L-arginina desencadenando en el desacoplamiento de la NOS (**Romero et al.,2008**).

En estudios clínicos, la actividad de la arginasa en plasma se ha encontrado elevada en pacientes con diabetes mellitus tipo II en comparación con sujetos control sanos y correlacionada positivamente con los niveles plasmáticos de glucosa en ayunas y hemoglobina glicosilada HbA1c (**Kashyap et al.,2008**). Estos resultados sugieren que los niveles de glucosa también son responsables de la estimulación de la actividad de la arginasa *in vivo* como se describe en células endoteliales aisladas citadas anteriormente. Además, los niveles de arginasa plasmáticos se asocian también con marcadores de estrés oxidativo y HbA1c (**Ogino et al.,2011**).

Los últimos datos apoyan la tesis de que la arginasa debe jugar un papel importante contribuyendo a generar disfunción vascular en humanos con diabetes. Las arteriolas coronarias obtenidas de pacientes diabéticos mostraron que la relajación *in vitro* dependiente de endotelio estaba reducida, junto con un incremento en la expresión de arginasa I en células endoteliales (**Beleznai et al.,2011**).

Podemos concluir que una inhibición de la arginasa mejora notablemente la vasodilatación dependiente del endotelio tras los datos obtenidos en un estudio *in vivo* llevado a cabo en el antebrazo de pacientes con diabetes tipo 2 y enfermedad coronaria que así lo demuestran. Por el contrario, esto no afecta al grupo control, con pacientes sano. Esta observación indica un rol fundamental en la contribución a la función endotelial de la arginasa en pacientes diabéticos (**Shemyakin et al.,2012**)

3. *Arginasa en isquemia y reperfusión*

La causa más común de muerte en el mundo occidental es la cardiopatía isquémica, que es consecuencia de un flujo coronario insuficiente. La causa más frecuente de esta disminución de flujo es la aterosclerosis que ocasiona una oclusión coronaria aguda, siendo esta frecuente en personas con cardiopatía aterosclerótica coronaria. Tras una oclusión coronaria aguda el flujo sanguíneo cesa en los vasos coronarios situados más allá de la oclusión. Esa zona que carece de flujo se denomina zona infartada (**Guyton and Hall.,2005**). Después del comienzo del infarto puede restaurarse el flujo sanguíneo, proceso esencial para prevenir daño tisular irreversible. La restauración del flujo se denomina reperfusión. Una rápida restauración del flujo sanguíneo por intervención percutánea miocárdica (PCI) o terapia trombolítica, reduce el riesgo y tamaño del infarto. La reperfusión es necesaria para minimizar el daño tisular, sin embargo, puede resultar en una inflamación tanto local como sistémica, respuesta que puede agrandar el daño tisular. El daño celular después de la reperfusión recibe el nombre de daño por isquemia-reperfusión y se caracteriza por la producción de especies oxidantes, activación de la vía del complemento, adhesión de las células leucocito-endoteliales, agregación plaquetaria, aumento de la permeabilidad microvascular y disminución de la relajación vascular dependiente del endotelio. La reperfusión presenta diferentes manifestaciones clínicas como necrosis del miocardio o arritmias, entre otras.

La reperfusión miocárdica es por tanto un “arma de doble filo” en la patogenia del infarto agudo de miocardio ya que por un lado disminuye la intensidad de la necrosis con respecto a situaciones en las que no tiene lugar este mecanismo. Sin embargo, la generación de radicales libres y otros mediadores ocasiona una mayor lesión que si este fenómeno no tuviera lugar, lo que se pone evidencia en estudios de cardioprotección (**Arellano et al.,2013**).

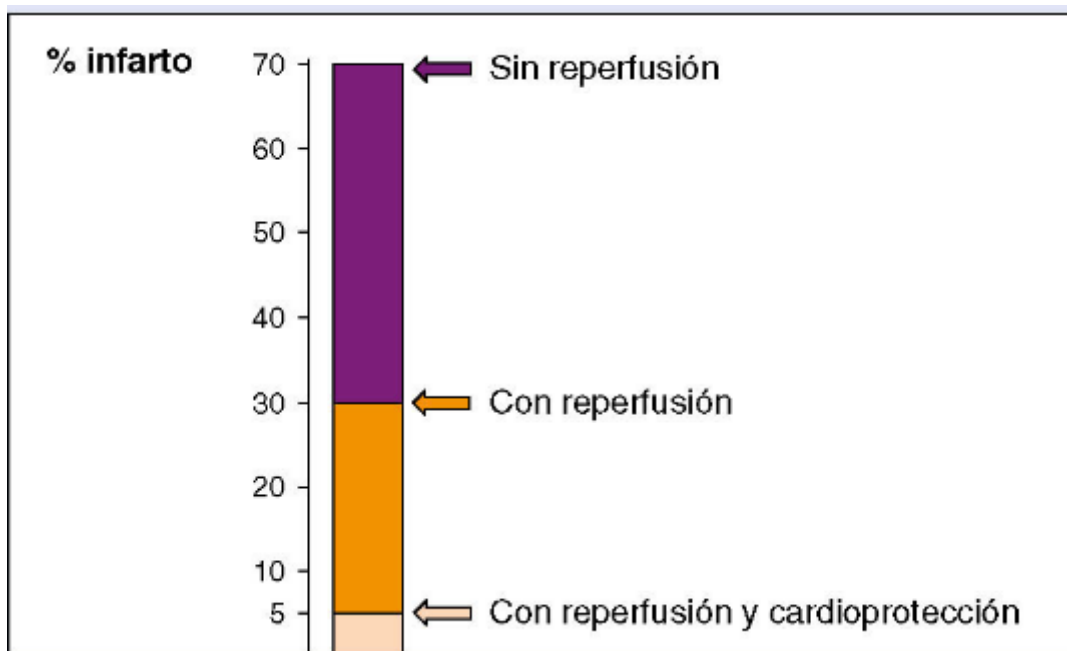


Figura 3: Comparación de tamaño de infarto con reperfusión, con reperfusión y cardioprotección y sin reperfusión. Fuente: *Manual de Patología General Sisinio de Castro*

Recientemente se ha descrito que la actividad de la arginasa era elevada en pacientes con infarto de miocardio agudo y esto estaba correlacionado con la extensión de la necrosis miocárdica. Además, en pacientes infartados era superior la actividad de la arginasa que en individuos sanos. La expresión de la arginasa siguiendo la isquemia/reperfusión (I/R) ha sido investigada en varios modelos experimentales, en los cuales se demostró que, en las células endoteliales de las arterias coronarias y células del músculo liso, estaba elevada (**Hein et al.,2003**).

En un estudio experimental con ratas **Jung y colaboradores** demostraron al inhibir la arginasa de manera sistémica se reducía el tamaño del infarto al 50% en ratas a las que se les había sometido a 30 minutos de isquemia seguido de 2 horas de reperfusión (**Jung et al.,2010**). Por otro lado, en un modelo con cerdos en el cual se había realizado una infusión intracoronaria de un inhibidor de la arginasa *N-hidroxil-nor-L-arginina (nor-NOHA)* 5 minutos antes de la reperfusión, el tamaño del infarto fue similar, reducido al 50% (**Gonon et al.,2012**). Estos efectos cardioprotectores podían ser bloqueados por inhibidores de la NOS. Curiosamente, la inhibición sistémica de la arginasa está asociada a un aumento en plasma de citrulina y una reducción en plasma de ornitina como resultado del aumento en plasma y miocardio del ratio citrulina/arginina.

En conclusión, el aumento de la expresión y actividad de la arginasa parece ser por tanto un factor fundamental que puede contribuir al daño por I/R miocárdica. No obstante, una inhibición de la arginasa desplazaría la utilización de la arginina a favor de la NOS llevando consigo un aumento de la producción de NO.

Perspectivas farmacoterapéuticas

Tal y como se ha nombrado anteriormente la inhibición de la arginasa puede tener potencialmente efectos beneficiosos en numerosas patologías cardiovasculares. Se ha probado el efecto de la inhibición de la arginasa en varios estudios obteniendo resultados positivos.

En estudios que conllevan la administración local de inhibidores de la arginasa vía microdiálisis cutánea o infusión intra-arterial se han cosechado resultados observando la función vascular en pacientes con enfermedad coronaria y diabetes tipo II (**Shemyakin et al.,2012**), fallo cardíaco (**Quitter et al.,2012**) e hipertensión. Estas observaciones sugieren que la regulación de la actividad de arginasa es importante en la enfermedad cardiovascular en humanos.

Actualmente se cuenta con varios inhibidores de la arginasa en fase experimental. Se clasifican en dos grandes grupos: ácidos borónicos y análogos de la N^{ω} -hidroxi-L-arginina (**Shade et al.,2010**). Pese a contar con estas opciones terapéuticas hay una importante limitación en el tratamiento con los inhibidores de la arginasa disponibles pues estos muestran baja o ninguna selectividad por las isoformas de la arginasa I y II. Debido a esto aún no es claro que isoforma sería la diana que presentara mayores beneficios.

Los inhibidores de la arginasa pueden presentar efectos secundarios considerando el rol fundamental de la arginasa en la detoxificación del amonio en el ciclo de la urea. Sin embargo, la actividad y expresión en el hígado es mucho mayor que en la vasculatura y por tanto improbable que dosis clínicamente relevantes de inhibidor suprimieran la arginasa hepática hasta el punto de alterar el ciclo de la urea (**Shade et al.,2010**). Este hecho se apoya por la falta de efectos tóxicos a largo plazo de la inhibición de arginasa en modelos de animales con hipertensión y aterosclerosis.

Conclusiones

Los datos disponibles sugieren claramente que el incremento de la actividad de la arginasa es de suma importancia para los muchos cambios patológicos asociados con enfermedades cardiovasculares. Los efectos parecen ser ejercidos principalmente mediante la interferencia con la biodisponibilidad del NO y limitación de las fuentes de L-arginina contribuyendo así al estrés oxidativo. La arginasa presenta un futuro prometedor a nivel farmacológico como diana con el objetivo de revertir el “fenómeno de robo de arginina”, provocando un aumento de la producción de NO y limitación del estrés oxidativo. Estos efectos de la inhibición de la arginasa tienen un gran potencial en la lucha contra la enfermedad cardiovascular. En un futuro la arginasa no solo tendrá un papel clave en el tratamiento de las condiciones cardiovasculares sino también en cáncer y enfermedad autoinmune (**Pernow and Jung,2013**).

Bibliografía

- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthase: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 2001;**357**:593-615
- Arellano Pérez JL. Manual de Patología General.7ª Ed. Elsevier Masson.2013
- Beleznai T, Fesher A, Spielvogell, D, Landsmann SL, Bagi Z. Arginase 1 contributes to diminished coronary arteriolar dilatation in patienes with diabetes. *Am J Physiol* 2011;**300**:H777-H783
- Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;**23**:168-175.
- Chandra S, Romero M, Shatanawi A Alkilany A, Caldwell R. Oxidative species increase arginase activity in endotelial cells through the RhoA/Rho kinase pathway.*Br J Pharmacol* 2012;**165**:506-519.
- Chen J, Yang R, Buzanowski M, Cichanowicz J Cold selective catalytic reduction of nitric oxide for flue gas applications. *Industrial Eng Chem Res*. 1990;**29**:1431-1435
- Creager MA, Luscher TF, Cosentino F, Beckman JA. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: PArt I. *Circulation* 2003;**108**:1527-1532.
- Durante W, Johnson FK, Johnson RA. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007;**34**:906-911.
- Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*. 2006;**113**:1708-1714.
- Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthase: regulation and function. *Eur Heart J* 2012;**33**:829-837.
- Gonon AT, Jung C, Katz A, Westerblad H, Shemyakin A, Sjoquist PO *et al*. Local arginase inhibition during early reperfusion mediates cardioprotection via increased nitric oxide production. *PLoS One* 2012;**7**:e42038.
- Guyton A, Hall J. Tratado de Fisiología Médica. 10ª Ed. McGraw-Hill, 2005.
- Hein TW, Zhang C, Wang W, Chang CI, Thengchaisri N, Kuo L. Ischemia-reperfusion selectively impairs nitric oxide-mediated dilation in coronary arterioles: counteracting role of arginase. *FASEB J* 2003;**17**:2328-2330.
- Kashyap SR, Lara A, Zhang R, Park YM, DeFronzo RA. Insulin reduces plasma arginase activity in type 2 diabetic patiens. *Diabetes Care* 2008;**31**:134-139.
- Katusic, Z.S. *et al*. (2009) Vascular protection by tetrahydrobiopterin: progress and therapeutic prospects. *Trends Pharmacol. Sci.* **30**, 48-54.
- Kim, N.N., Cox, J.D., Baggio, R.F., Emig, F.A., Mistry, S.K, Harper, S.L., *et al* (2009). Arginase inhibition restores NOS coupling and reverses endothelial dysfunction and vascular stiffness in old rats. *J. Appl. Physiol.* **107**, 1249-1257.
- Laufs U, Liao JK. Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Trends Cardiovasc Med* 2000;**10**:143-148.

Ming XF, Barandier C, Viswambharan H, Kwak BR, Mach F, Mazzolai L *et al.* Thrombin stimulates human endothelial arginase enzymatic activity via RhoA/ROCK pathway: implications for atherosclerotic endothelial dysfunction. *Circulation* 2004;**110**:3708-3714.

Morris, S.M., Jr (2009) Recent advances in arginine metabolites: roles and regulation of the arginases. *Br.J.Pharmacol.* **157**,922-930.

Munder M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *Br J Pharmacol* 2009;**158**:638-651.

Ogino K, Takahashi N, Takigawa T, Obase Y, Wang DH. Association of serum arginase I with oxidative stress in a healthy population. *Free Radic Res* 2011;**45**:147-155.

Pernow J, Jung C. Arginase as a potential target in the treatment of cardiovascular disease: reversal of arginine steal?. *Cardiovascular Research.* 2013; **98**,334-343

Romero M.J., Platt, D.H., Tawfik, H.E., Labazi, M., El-Remessy, A.B., Bartoli, M., *et al* (2008). Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity. *Circ. Res.* **102**, 95-102.

Ryoo S, Gupta G, Benjo A, Lim HK, Camara A, Sikka G *et al.* Endothelial arginase II: a novel target for the treatment of atherosclerosis. *Circ Res* 2008;**102**:923-932.

Ryoo S, Lemmon CA, Soucy KG, Gupta G, White AR, Nyhan D *et al.* Oxidized low-density lipoprotein-dependent endothelial arginase II activation contributes to impaired nitric oxide signaling. *Circ Res* 2006;**99**:951-960.

Santhanam L, Lim HK, Miriel V, Brown T, Patel M, Balanson S *et al.* Inducible NO synthase dependent S-nitrosylation and activation of arginase 1 contribute to age-related endothelial dysfunction. *Circ Res* 2007;**101**:692-702.

Shade D, Kotthaus J, Clement B. Modulating the NO generating system from a medicinal chemistry perspective: current trends and therapeutic options in cardiovascular disease. *Pharmacol Therap* 2010;**126**:279-300.

Shemyakin A, Kovamees O, Rafnsson A, Bohm F, Svenarud P, Settergren M *et al.* Arginase inhibition improves endothelial function in patients with coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2012;**126**:2943-2950.

Toque HA, Romero MJ, Tostes RC, Shatanawi A, Chandra S, Carneiro ZN *et al.* P38 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) increases arginase activity and contributes to endothelial dysfunction in corpora cavernosa from angiotensin-II-treated mice. *J Sex Med* 2010;**7**:3857-3867.

Yao L, Chandra S, Toque HA, Bhatta A, Rojas M, Caldwell RB *et al.* Prevention of diabetes-induced arginase activation and vascular dysfunction by Rho kinase (ROCK) knockout. *Cardiovas Res* 2013;**97**:509-519.