

# La Dimetilarginina Asimétrica (ADMA) Sérica como Marcador de Aterosclerosis en Conejos Expuestos a Dieta Hiperlipidémica

Leticia Figueira,<sup>1,2</sup> Julio C González,<sup>1,2,3</sup> Milagros Mercado,<sup>1</sup> Jessica Hernández,<sup>1</sup> Aldo Reigosa<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Investigación del Postgrado de la Escuela de Bioanálisis (LIPEB). <sup>2</sup>Departamento de Morfopsiopatología, Escuela de Bioanálisis. <sup>3</sup>Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas (CIMBUC); Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela.

Correspondencia: [figueiraleticia@gmail.com](mailto:figueiraleticia@gmail.com)

## Resumen

La dimetilarginina asimétrica (ADMA) es un inhibidor de la sintasa de óxido nítrico (NOS) que ha sido asociada con disfunción endotelial y enfermedad cardiovascular. El objetivo del presente estudio fue determinar las concentraciones séricas del ADMA y su relación con la formación de ateromas en conejos. Para ello, se estudiaron 30 conejos machos Nueva Zelanda: Grupo 1: dieta conejarina y vegetales; Grupo 2: dieta huevo y conejarina. El tiempo experimental fue de doce semanas. Se determinó el perfil lipídico por métodos enzimáticos y la ADMA por ELISA en las semanas 0, 6 y 12 de administración de las dietas. Al final del estudio se realizó el estudio histológico de la aorta de los conejos. Los resultados revelaron que la ADMA se elevó en el grupo 2 en la semana 6 y al final del estudio ( $p < 0,05$ ). En cuanto a los ateromas se evidenciaron lesiones en los conejos del grupo 2. En conclusión, se encontró que la ADMA es un marcador tisular de aterosclerosis de acuerdo con nuestras condiciones experimentales.

**PALABRAS CLAVE:** ADMA, Aterosclerosis, NOS, Disfunción endotelial.

## Abstract

### SERUM ASYMMETRIC DIMETHYLARGININE (ADMA) AS ATHEROSCLEROSIS MARKER IN RABBITS EXPOSED TO A HYPERLIPIDIC DIET

The asymmetric dimethylarginine (ADMA) is an inhibitor of nitric oxide synthase (NOS) and a mediator of endothelial dysfunction and cardiovascular disease. The objective of the present study was to determine serum concentration ADMA and its relationship with aortic lesions development in rabbits. Thirty male New Zealand rabbits, divided into two similar groups were used in this study: Group 1: fed with a commercial rabbit food (Conejarina) and vegetables, Group 2: fed with eggs and Conejarina. The experiment lasted 12 weeks and the lipid profile was assayed by enzymatic methods, ADMA was assayed by ELISA at weeks 0, 6 and 12. A histological study of rabbits aorta was done. Results revealed that in group 2, ADMA showed increased levels at week 6 and 12 of the study ( $p < 0.05$ ). Regarding atheroma development, group 2 presented arterial lesions. In conclusion, ADMA can be considered as a marker of atherosclerosis according to our experimental results.

**KEY WORDS:** ADMA, Atherosclerosis, NOS, Endothelial dysfunction.

## Introducción

La aterosclerosis es una enfermedad inmuno-inflamatoria crónica caracterizada por una compleja interacción entre células inflamatorias, depósito de lípidos, proliferación de células de músculo liso vascular, disfunción endotelial y remodelado de la matriz extracelular.<sup>1,2</sup>

La disfunción endotelial es considerada como un marcador temprano de la aterosclerosis, que precede a las evidencias angiográficas de la placa aterosclerótica,<sup>3</sup> y que está caracterizada por el cambio de las funciones del endotelio a un estado pro-inflamatorio, pro-trombótico y por una pérdida parcial o completa del equilibrio entre los factores vasodilatadores y vasoconstrictores.<sup>4-6</sup>

Uno de los principales contribuyentes a la disfunción endotelial es la disminución de la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO), falla en su señalización e incremento en la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS).<sup>7</sup>

El NO es un poderoso vasodilatador, esencial en la regulación del tono vascular y presión sanguínea, además contribuye a la regulación de la hemostasia, adhesión plaquetaria y leucocitaria, así como en la proliferación de las células de músculo liso vascular.<sup>7</sup> En el endotelio, el NO es sintetizado por la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), la cual utiliza la L-Arginina como sustrato.<sup>7</sup>

La producción de NO constituye el principal contribuidor a la relajación dependiente del endotelio en las grandes arterias, incluyendo las coronarias, mesentéri-

cas, pulmonares y cerebrales; de hecho, su importancia fisiológica ha sido comprobada por la evidencia de que los inhibidores de la NOS ocasionan vasoconstricción en la mayoría de los lechos vasculares y un incremento en la presión arterial sistémica, tanto en humanos como en animales.<sup>8</sup> En este sentido, la dimetilarginina asimétrica (ADMA), un inhibidor competitivo endógeno de la NOS ha sido asociado con disfunción endotelial y enfermedad cardiovascular.<sup>9</sup>

La ADMA es un aminoácido de origen intracelular, encontrado de manera natural en plasma, orina, tejidos y células,<sup>10</sup> el cual es sintetizado cuando los residuos de la arginina en las proteínas nucleares son metilados por acción de la arginina metiltransferasa (PRMT), la cual está ampliamente distribuida en el organismo. La ADMA inhibe las tres isoformas de NOS, y puede además desacoplar la enzima, generando anión superóxido; por lo cual se ha considerado a la ADMA como un indicador de disfunción endotelial y un importante factor de riesgo cardiovascular;<sup>11</sup> de hecho, se ha descrito en pacientes con enfermedad coronaria establecida, que los niveles séricos de ADMA se asocian con la progresión angiográfica de la enfermedad,<sup>12</sup> y predice la mortalidad cardiovascular en dichos pacientes.<sup>9</sup> Por lo tanto, tomando en cuenta que la ADMA es un marcador de disfunción endotelial<sup>13</sup> y que sus concentraciones elevadas están asociadas con una incrementada mortalidad e incidencia de eventos cardiovasculares;<sup>14</sup> en el presente trabajo se determinó la concentración sérica de ADMA y su relación con la formación de ateromas en conejos macho Nueva Zelanda expuestos a una dieta hiperlipidémica.

## Materiales y Métodos

### Muestra y diseño experimental

Se utilizaron 30 conejos machos de raza Nueva Zelanda de 12 semanas de edad con un peso entre 1,1–1,3 kg, provenientes del bioterio del Instituto de Higiene Rafael Rangel (Caracas, Venezuela). Después de una semana de ambientación en el bioterio experimental de la Universidad de Carabobo (UC) (Valencia, Venezuela), los conejos fueron divididos aleatoriamente en 2 grupos de 15 conejos. Cada conejo fue alimentado diariamente de la siguiente manera: **Grupo 1 (control):** 150 gramos de zanahoria y lechuga, 150 gramos de Conejarina® (Protinal, Venezuela). **Grupo 2:** Un huevo hervido y 150 gramos de Conejarina. Todos los conejos consumieron agua a libre demanda. El periodo experimental tuvo una duración de doce semanas.

Todos los conejos fueron pesados antes, durante y después de la experimentación. Los procedimientos de cuidado de los animales fueron llevados a cabo de acuerdo a la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio.<sup>15</sup> El experimento fue realizado rigurosamente según las

normas éticas del bioterio central de la UC. Estos animales estuvieron bajo vigilancia del personal del bioterio a lo largo del estudio.

### Análisis químico de los alimentos

#### Conejarina G granulada marca Protinal

**Composición.** Maíz, sorgo, afrechillo de trigo, harinas de maíz, ajonjolí, algodón, girasol y soya, concha de arroz, bagacillo de caña, pasto deshidratado, melaza, grasa estabilizada, carbonato y fosfato de calcio, sal, minerales "trazas" (cobalto, cobre, hierro, manganeso, yodo y zinc) suplementos de las vitaminas A, B2, B12, C, D3, E, ácido pantoténico y niacina, antioxidante, suplemento antibiótico y anticoccidial. Proteína cruda 12%, grasa cruda 1%, fibra cruda 20%, extracto libre de nitrógeno 42%.

**Huevo.**<sup>16</sup> Cada huevo contiene aproximadamente 300 mg de colesterol en su yema. El porcentaje de colesterol en cada ración de alimento para el grupo 2 fue de 0,12%.

**Determinaciones bioquímicas:** Las muestras de sangre fueron extraídas por punción intracardiaca a todos los conejos, previo ayuno de 14 horas en las semanas 0, 6 y 12 de alimentación. Las muestras de suero fueron conservadas en congelación a -70°C hasta el momento del procesamiento. Se realizaron determinaciones séricas de colesterol y triglicéridos por métodos enzimáticos colorimétricos directos (Wiener Lab, Argentina). El análisis del colesterol unido a las lipoproteínas de alta densidad (c-HDL) y el colesterol unido a las lipoproteínas de baja densidad (c-LDL) se efectuó por extracción y posterior determinación enzimática (Wiener Lab, Argentina). Las concentraciones séricas de ADMA fueron determinadas por ELISA (Elabscience Biotechnology, China).

#### Preparación de tejidos y tipificación histológica de las lesiones ateroscleróticas.

Los conejos fueron sacrificados por dislocación cervical, posteriormente se procedió a realizar la autopsia de dichos animales, extrayendo la aorta para ser examinada. Las muestras de tejido extraídas, fueron fijadas en formaldehído al 10% en PBS durante 24 horas y procesadas según la técnica de rutina, posteriormente teñidas con hematoxilina-eosina,<sup>17</sup> para luego ser observados por microscopía óptica. Las lesiones fueron tipificadas de acuerdo a la clasificación de la American Heart Association.<sup>18</sup>

**Análisis de los Datos:** Se calculó promedio y desviación estándar para las variables estudiadas. Se realizó la prueba de normalidad de Shapiro. Se empleó la correlación de Pearson para relacionar el perfil lipídico con los niveles de ADMA. Se utilizó el análisis de Wilcoxon Rank Sum y Friedman para comparar los valores de las variables sujetas a estudio, y una tabla de asociación para clasificar el grado de ateroma. Se consideró significativo  $p < 0,05$ . Se utilizó el programa Statistix versión.<sup>8</sup>

### Resultados

No se observó diferencia significativa en los pesos iniciales entre los grupos de conejos. A lo largo del estudio hubo un incremento significativo en el peso de los conejos del grupo 2 con respecto al grupo 1, y con respecto a sus pesos basales ( $p < 0,05$ ). Asimismo, se observó que el incremento del peso fue mayor en el grupo 2 (Datos no mostrados). No se observó diferencia significativa en las concentraciones séricas basales de colesterol total, c-HDL, c-LDL y triglicéridos entre los grupos de conejos sujetos a estudio. En las semanas 6a y 12a de estudio, se apreció un aumento significativo en la concentración de lípidos en el grupo 2 respecto del grupo 1 y respecto de sus valores basales ( $p < 0,001$ ). El perfil lipídico en el grupo 1 permaneció sin cambios significativos a lo largo del tiempo experimental (Tabla 1).

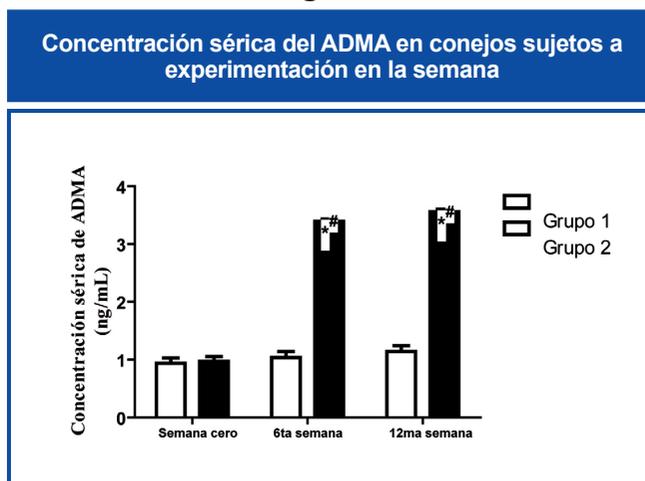
**Tabla 1**

Valores promedio y desviación estándar del perfil lipídico en los grupos de conejos sujetos a estudio en el tiempo de experimentación		
Variables (mg/dL)	Grupo 1	Grupo 2
<b>INICIO DEL ESTUDIO</b>		
Colesterol	72 ± 16	72 + 15
C-HDL	29 + 9	30 + 9
C-LDL	40 + 7	38 + 8
Triglicéridos	63 + 10	58 + 9
<b>SEXTA SEMANA</b>		
Colesterol	71 + 19	691 + 121*#
C-HDL	30 + 5	52 + 10*#
C-LDL	39 + 8	562 + 123*#
Triglicéridos	68 + 12	143 + 18*#
<b>DUODÉCIMA SEMANA</b>		
Colesterol	73 + 14	828 + 152*#
C-HDL	29 + 8	72 + 13*#
C-LDL	40 + 7	639 + 149*#
Triglicéridos	66 + 10	187 + 20*#

\*Comparación con respecto al control, Wilcoxon Rank Sum. Significativo  $p < 0,001$ . # Comparación de cada grupo con respecto a sus valores basales, análisis de Friedman, significativo  $p < 0,0001$ . Grupo 1=dieta Conejarina. Grupo 2= dieta Conejarina + huevo.

En cuanto a las concentraciones séricas del ADMA, no se observaron diferencias significativas entre los grupos sujetos a estudio en la condición basal. Dicho marcador en el grupo 1 permaneció sin cambios a lo largo del experimento. Por otra parte, en la semana 6a y al final del experimento, la concentración sérica de ADMA aumentó en el grupo 2 con respecto al grupo 1 y con respecto a sus valores basales ( $p < 0,05$ ) (Figura 1).

**Figura 1**



0, 6a y 12a. Los resultados fueron expresados como la media + error estándar de la media. (N=15). \* $p < 0,001$  vs. Control (Grupo 1). # $p < 0,0001$  vs. su valor basal.

No se observó asociación significativa entre las variables sujetas a estudio en los diferentes grupos de conejos en las distintas semanas de experimentación.

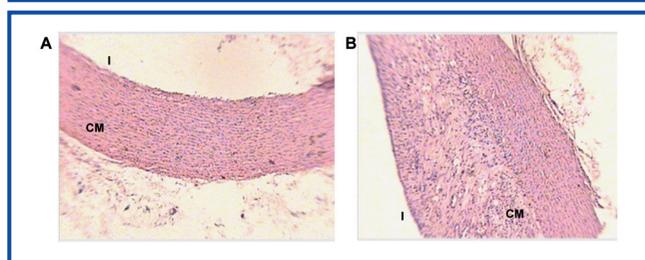
En cuanto a los cortes histológicos de las aortas, ningún animal en el grupo 1 evidenció lesiones ateroscleróticas. En el grupo 2 se aprecia que todos los conejos tenían lesiones ateroscleróticas (Tabla 2) de grado variable (Figura 2).

**Tabla 2**

Distribución de los conejos según el máximo grado de ateroma encontrado en los cortes de aorta				
Grupo	Sin ateroma	Tipo I	Tipo II	Tipo III
Grupo 1	15	-	-	-
Grupo 2	-	1	4	10

**Figura 2**

Corte histológico de la aorta de un conejo del grupo 1 (Panel A) y del grupo 2 (Panel B). El panel A muestra una arteria normal sin lesión. El Panel B muestra una lesión tipo III, observando en la íntima arterial (I) cúmulo de células espumosas con lípidos intracelulares y extracelulares. Capa media (CM). Tinción hematoxilina-eosina. Magnificación: 50X.



## Discusión

Los mecanismos celulares y moleculares que subyacen la aterogénesis indican que el endotelio vascular desempeña un papel crucial en los cambios funcionales de la pared vascular.<sup>4</sup> Uno de los principales mediadores liberados por las células endoteliales sanas es el NO; ya que este se encuentra involucrado en un gran número de procesos de regulación en el sistema cardiovascular, pues es un poderoso vasodilatador e inhibidor de la adhesión de monocitos y leucocitos al endotelio vascular. Se ha descrito que la disminución de la biodisponibilidad del NO ocasiona la migración de células inflamatorias en la pared vascular, uno de los principales eventos de la aterosclerosis;<sup>2-5</sup> al respecto, se ha evidenciado en modelos experimentales de aterosclerosis, como en los ratones deficientes de apo-E, que la inhibición de la producción del NO endotelial acelera la formación de lesiones en la aorta y arterias coronarias.<sup>4</sup>

La disfunción endotelial se manifiesta como disminución en la biodisponibilidad del NO derivado del endotelio, lo cual incrementa el riesgo de eventos cardiovasculares adversos. Una de las causas de la disfunción endotelial es la elevación de los niveles séricos del inhibidor endógeno de la NOS, la ADMA,<sup>19</sup> el cual es un producto del metabolismo de las proteínas que contienen residuos metilados de Arginina, y cuyos niveles en suero se han encontrado elevados en pacientes con riesgo de enfermedad cardiovascular.<sup>14,19,20</sup> En pacientes aparentemente sanos, se ha descrito que la infusión de ADMA ocasiona un incremento en la rigidez arterial, reducción del flujo sanguíneo cerebral, incremento en la resistencia vascular periférica y reducción del flujo sanguíneo renal;<sup>21-23</sup> por lo cual, las evidencias clínicas sugieren que el ADMA sérico puede constituir un novedoso factor de riesgo cardiovascular.<sup>24,25</sup>

El presente estudio se enfocó en evaluar a la ADMA sérica como un posible marcador de aterosclerosis en conejos, donde se observó que al inicio del experimento todos los conejos eran semejantes en relación a su bioquímica sanguínea, pues no se evidenciaron diferencias significativas en las variables estudiadas. Asimismo, el marcador estudiado permaneció sin cambio a lo largo del experimento en los conejos del grupo 1, lo cual sugiere la ausencia de disfunción endotelial en este grupo de estudio durante todo el experimento. Se pudo observar que la dieta suministrada al grupo 2 fue hiperlipidémica; pues se apreció incremento en la concentración del perfil lipídico a partir de la 6ta semana de experimentación, tal y como se ha encontrado en otros estudios.<sup>26-30</sup>

De igual manera, se pudo apreciar que la dieta rica en lípidos administrada a los conejos del grupo 2 fue ate-

rogénica, pues indujo lesiones ateroscleróticas de grado intermedio; por otra parte, como era de esperar, los conejos del grupo 1, no evidenciaron lesiones, pues consumieron partes iguales de conejarina y vegetales, tal y como lo hemos reportado previamente.<sup>26-30</sup>

En relación a la ADMA, en el presente estudio se pudo evidenciar un incremento en sus concentraciones séricas en el grupo 2 con respecto a su valor basal y al grupo control, lo cual podría sugerir la existencia de disfunción endotelial en este grupo de conejos bajo nuestras condiciones experimentales. En este sentido, la evidencia ha demostrado que el ADMA es un agente causal de la disfunción endotelial;<sup>23,31</sup> pues, su infusión arterial en animales de experimentación ocasiona disfunción endotelial<sup>31</sup> y vasoconstricción; por su parte, la exposición de células endoteliales al ADMA incrementa su adhesión con los monocitos.<sup>32</sup>

De igual manera, la evidencia indica que el ADMA está relacionado de manera inversa con la biodisponibilidad del NO en los vasos sanguíneos,<sup>19</sup> ya que algunos estudios han encontrado elevadas concentraciones de ADMA sérica en pacientes hipercolesterolémicos en comparación con los sujetos controles, lo cual se ha asociado con una reducida vasodilatación dependiente del endotelio,<sup>13,31,33</sup> por lo que los niveles de ADMA sérica parecen estar asociados con un incrementado riesgo cardiovascular tanto en la población general,<sup>34</sup> así como en individuos con elevado riesgo cardiovascular.<sup>35</sup> Asimismo, algunas investigaciones han indicado que el c-LDL puede incrementar la actividad y expresión de la PRMT, enzima involucrada en la síntesis de ADMA, incrementando sus niveles,<sup>36</sup> lo cual podría explicar el incremento de las concentraciones de ADMA observadas durante la hipercolesterolemia.

La disfunción endotelial juega un papel muy importante en la aterosclerosis; de hecho<sup>31,37</sup> en diversos estudios se ha encontrado que en la aterosclerosis existen defectos en la producción y acción del NO,<sup>31,38,39</sup> acompañándose además de elevados niveles séricos de ADMA, el cual es un indicador de aterosclerosis.<sup>31</sup> Por lo tanto, el incremento en las concentraciones de ADMA observadas en el grupo 2 en el presente estudio, puede ser atribuido al proceso aterosclerótico que cursaba en los conejos; por lo que el mismo puede ser considerado como un marcador de aterosclerosis. Nuestros hallazgos son apoyados por otros estudios, en los cuales se encontraron concentraciones séricas elevadas de ADMA en pacientes con aterosclerosis,<sup>12,31</sup> demostrando una correlación positiva entre los niveles de ADMA sérica y el índice de engrosamiento íntima - media.<sup>40-42</sup> Cabe destacar que en nuestro estudio, el ADMA comenzó a elevarse de manera temprana, desde la 6ta semana de experimentación, sugiriendo que el ADMA podría constituir un marcador temprano de aterosclerosis y podría tener un papel relevante en

las primeras fases de esta enfermedad; de hecho algunos estudios han descrito que durante la aterogénesis las concentraciones de ADMA se han encontrado elevadas de manera precoz, demostrando que pequeños cambios en las concentraciones a nivel del líquido extracelular se corresponden con cambios suficientemente grandes en la concentración intracelular que pueden afectar la actividad de la NOS.<sup>14,43</sup> En este sentido, la evidencia demuestra que el ADMA juega un papel muy importante en la fisiopatología de la aterosclerosis, pues induce la adhesión de monocitos a través de la activación del receptor de quimioquinas en cultivo de células de monocitos,<sup>44</sup> y está asociada con el desacoplamiento de la actividad de la eNOS que ocasiona un incremento en la producción de superóxido en los vasos sanguíneos.<sup>45</sup> Por su parte, en macrófagos activados, el ADMA incrementa la expresión de la Acetil CoA colesterol aciltransferasa (ACAT-1) y el receptor -1 tipo lectina de las LDL oxidadas (LOX-1), incrementando la captación de las LDL oxidada, asociándose con una rápida formación de células espumosas.<sup>46,47</sup> De hecho, la sobreexpresión de la enzima que metaboliza al ADMA, la dimetilarginina dimetilaminohidrolasa (DDAH), redujo los niveles séricos de ADMA, la formación de placas de ateroma y mejoró la función endotelial en un modelo de aterosclerosis murino,<sup>25,48</sup> lo cual ratifica la relevancia de la ADMA en la aterogénesis. Por lo tanto, debido a que el NO derivado del endotelio tiene efecto vasoprotector, se podría pensar que la elevación del ADMA durante largo plazo, con la consecuente inhibición de la síntesis de NO, podría contribuir a la progresión de la enfermedad vascular y a la aterosclerosis, ya que los niveles de ADMA parecen tener un valor predictivo en pacientes con aterosclerosis coronaria.<sup>49</sup>

A pesar de las numerosas evidencias clínicas que correlacionan el ADMA sérico con medidas no invasivas de la función endotelial, el mecanismo exacto por el cual el ADMA altera la biodisponibilidad del NO en los vasos sanguíneos es desconocido. La ADMA puede actuar como un inhibidor de la eNOS, alternativamente puede desacoplar la actividad de la eNOS conllevando no sólo la pérdida de la producción de NO sino al incremento en la generación de anión superóxido en el endotelio vascular. En cultivo celular, el ADMA induce la producción de radicales superóxido por las células endoteliales, sugiriendo que el ADMA tiene el potencial de afectar las vías transcripcionales redox – sensible mediante la modulación de la producción de superóxido.<sup>36,45</sup> En este sentido, en estudios previos hemos encontrado que bajo nuestras condiciones de estudio existe un incremento en los marcadores de oxidación, como la LDLox y disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes plasmáticas,<sup>26-30</sup> lo cual sugiere la existencia de un estado de estrés oxidativo en la aterosclerosis, por lo que el incremento en las concentraciones de ADMA podrían obedecer al posible

incremento del estrés oxidativo que sucede durante la aterosclerosis, ya que la PRMT, es redox – sensible, por lo que la síntesis de la ADMA se podría incrementar bajo condiciones de estrés oxidativo. Adicionalmente, la enzima responsable de su degradación, la DDAH, es redox sensible<sup>50</sup> y su actividad disminuye en estado de estrés oxidativo. Por lo tanto, el estrés oxidativo incrementa la síntesis de ADMA y disminuye su degradación; por lo que, otros estudios a nivel de la placa serían necesarios para demostrar el mecanismo de la elevación de los niveles de ADMA observados en el presente trabajo.

En conclusión, según nuestras condiciones experimentales, se sugiere que la ADMA sérica podría constituir un marcador no invasivo de disfunción endotelial y aterosclerosis.

## Referencias

1. Lim S, Park S. Role of vascular smooth muscle cell in the inflammation of atherosclerosis. *BMB Rep.* 2014;47:1-7.
2. Tarun D, Vasawala H, Somani V. Plaque regression and plaque stabilization in cardiovascular diseases. *Indian J Endocrinol Metab.* 2013; 17:983-998.
3. Davignon J, Ganz P. Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. *Circulation.* 2004;109:III-27-III-32.
4. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki J, Sakthisekaran D, Sethi G, Nishigaki I. The Vascular Endothelium and Human Diseases. *Int. J. Biol. Sci.* 2013;9:1057-1069.
5. Versari D, Daghini E, Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S. Endothelial Dysfunction as a Target for Prevention of Cardiovascular Disease. *Diabetes Care* 2009;32:S314-S321.
6. Chhabra N. Endothelial dysfunction – A predictor of atherosclerosis. *Journal of Medical Update* 2009;4:33-41.
7. Stepan J, Nyhan D, Berkowitz D. Development of novel arginase inhibitors for therapy of endothelial dysfunction. *Frontiers in Immunology Inflammation* 2013;4:1-6.
8. Vanhoutte P. Endothelial dysfunction and atherosclerosis. *European Heart Journal* 1997;18:E19-E29.
9. Pope A, Karuppiyah K, Cardounel A. Role of the PRMT-DDAH-ADMA axis in the Regulation of Endothelial Nitric Oxide Production. *Pharmacol Res.* 2009;60:461-465.
10. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet.* 1992;339:572-575.
11. Landim M, Filho A, Chagas A. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and endothelial dysfunction: implications for atherogenesis. *Clinics* 2009;64:471-478.
12. Loland K, Bleie O, Borgeraas H, Strand E, Ueland P, Svardsdal A, Nordrehaug J, Nygard N. The Association between Progression of Atherosclerosis and the Methylated Amino Acids Asymmetric Dimethylarginine and Trimethyllysine. *PLOS ONE* 2013;8:e64774-e64782.
13. Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A. ADMA: a novel risk factor for endothelial dysfunction. Its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998;98:1842-1847.
14. Anderssohn M, Schwedhelm E, Lüneburg N, Vasan R, Böger R. Asymmetric dimethylarginine as a mediator of vascular dysfunction and a marker of cardiovascular disease and mortality: an intriguing interaction with diabetes mellitus. *Diabetes & Vascular Disease Research* 2010;7: 105-118.
15. Guide for the care and use of animals. 1996. Institute of Laboratory Animal Resources. National Research Council. National Academy Press, Washington DC, USA.
16. Speziale A. El Laboratorio Clínico y la evaluación del riesgo coronario. *Rev. Mex Patol Clin* 2000;47:202-218.
17. Luna L. The Histological Staining Manual. Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 1968 Cap 1-4:11-37. Editions McGraw-Hill. New York. USA.

18. Stary H, Chandler A, Dinsmore R, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfield M, Schwartz C, Wagner W, Wesler R. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the committee on vascular lesions of the council on atherosclerosis. American Heart Association. *Circulation* 1995;15:1512-1531.
19. Wilson A, Shin D, Weatherby C, Harada R, Ng M, Nair N, Kielstein J, Cooke J. Asymmetric dimethylarginine Correlates with Measures of Disease Severity, Major Adverse Cardiovascular Events and All-Cause Mortality in Patients with Peripheral Arterial Disease. *Vasc Med*. 2010; 15:267-274.
20. Böger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res* 2003;59:824-833.
21. Kielstein JT, Impraim B, Simmel S, Bode-Boger SM, Tsikas D, Frolich JC, Hoepfer MM, Haller H, Fliser D. Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation* 2004;109:172-177.
22. Kielstein JT, Donnerstag F, Gasper S, Menne J, Kielstein A, Martens-Lobenhoffer J, Scalera F, Cooke JP, Fliser D, Bode-Boger SM. ADMA increases arterial stiffness and decreases cerebral blood flow in humans. *Stroke*. 2006;37:2024-2029.
23. Antoniadou C, Demosthenous M, Tousoulis D, Antonopoulos A, Vlachopoulos C, Toutouza M, Marinou K, Bakogiannis C, Mavragani K, Lazaros G, Koumallos N, Triantafyllou C, Lympieriadis D, Koutsilieris M, Stefanadis C. Role of Asymmetrical Dimethylarginine in Inflammation-Induced Endothelial Dysfunction in Human Atherosclerosis. *Hypertension* 2011;58:93-98.
24. Antoniadou C, Van-Assche T, Shirodaria C, Diesch J, Antonopoulos A, Lee J, Cunningham C, Tousoulis D, Stefanadis C, Casadei B, Taggart D, Channon KM, Leeson P. Preoperative sCD40L Levels Predict Risk of Atrial Fibrillation After Off-Pump Coronary Artery Bypass Graft Surgery. *Circulation*. 2009;120:S170-S176.
25. Jacobi J, Maas R, Cardounel A, Arend M, Pope A, Cordasic N, Heusinger-Ribeiro J, Atzler D, Strobel J, Schwedhelm E, Boger B, Hilgers K. Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase Overexpression Ameliorates Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice by Lowering Asymmetric Dimethylarginine. *Am J Pathol* 2010;176:2559-2570.
26. González J, Figueira L, Reigosa A. Selectina-E, VCAM-1, FNT-a, IL-6, PCR y Fibrinógeno plasmático como marcadores de inflamación en la aterosclerosis, en conejos machos Nueva Zelanda, expuestos a una dieta hiperlipidémica. *Salus* 2008;12:50-57.
27. Figueira L, González J. Efecto del extracto de *Pinus maritime*, vitaminas C y E sobre la concentración sérica de LDLox, PCR, Selectina-E, IL-6 y formación de ateromas en conejos con dieta hiperlipidémica. *INFORMED* 2008;10:593-607.
28. González J, Figueira L, González D, Álvarez Á, Aguilera C, Reigosa A. Niveles plasmáticos de Mieloperoxidasa y Proteína C Reactiva en conejos machos Nueva Zelanda expuestos a una dieta hiperlipidémica. *Act Cient de la Soc Venez de Bioanal Espec*. 2007;10:86-90.
29. Figueira L, González J. Efecto de la Vitamina C, sobre la actividad de la GPx y la formación de ateromas, en conejos expuestos a dieta hiperlipidémica. Aprobado para su Publicación en *Act Cient de la Soc Venez de Bioanal Espec* 2008;11:30-36.
30. Figueira L, González J, Arias M, Reigosa A. Efectos del Pycnogenol y Vitamina E, sobre la actividad de la Glutación Peroxidasa y la formación de ateromas, en conejos expuestos a dieta hiperlipidémica. *Salus*. 2010; 14:33-42.
31. Hasanoğlu A, Okur I, Ceyda A, Biberoglu G, Oktar S, Eminoğlu F, Tümer L. The levels of asymmetric dimethylarginine, homocysteine and carotid intima-media thickness in hypercholesterolemic children. *The Turkish Journal of Pediatrics* 2011;53:522-527.
32. Boger RH, Bode-Boger SM, Tsao PS, Lin PS, Chan JR, Cooke JP. An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase regulates endothelial adhesiveness for monocytes. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36:2287-2295.
33. Boger RH. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and cardiovascular disease: insights from prospective clinical trials. *Vasc Med* 2005;10 (Suppl): S19-25.
34. Valkonen VP, Paiva H, Salonen JT, Lakka TA, Lehtimäki T, Laakso J, Laaksonen R. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet* 2001;358:2127-2128.
35. Zoccali C, Bode-Boger S, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, Malatino L, Cataliotti A, Bellanuova I, Fermo I, Frolich J, Boger R. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet* 2001;358: 2113-2117.
36. Boger R, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, Tsikas D, Bode-Boger S. LDL Cholesterol Upregulates Synthesis of Asymmetrical Dimethylarginine in Human Endothelial Cells Involvement of S-Adenosylmethionine-Dependent Methyltransferases. *Circ Res*. 2000; 87:99-105.
37. Sibal L, Agarwal S, Home P, Boger R. The Role of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease. *Current Cardiology Reviews* 2010;6:82-90.
38. Sahinarlan A, Cengel A, Biberoglu G, Hasanoglu A, Turkoglu S, Timurkaynak T. Plasma asymmetric dimethylarginine level and extent of lesion at coronary angiography. *Coron Artery Dis* 2006;17:605-609.
39. Mugge A, Hanefeld C, Boger RH. Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine and the risk of coronary heart disease: rationale and design of the multicenter CARDIAC study. *Atheroscler Suppl* 2003; 4:29-32.
40. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 1999; 99: 1141-1146.
41. Furuki K, Adachi H, Enomoto M. Plasma level of asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a predictor of carotid intima-media thickness progression: six-year prospective study using carotid ultrasonography. *Hypertens Res* 2008;31:1185-1189.
42. Maas R, Xanthakis V, Polak J, Schwedhelm E, Sullivan L, Benndorf R, Schulze F, Vasari R, Wolf P, Böger R, Seshadri S. Association of the Endogenous Nitric Oxide Synthase Inhibitor ADMA with Carotid Artery Intimal Media Thickness in the Framingham Heart Study Offspring Cohort. *Stroke*. 2009;40:2715-2719.
43. Cardounel AJ, Cui H, Samouilov A. Evidence for the pathophysiological role of endogenous methylarginines in regulation of endothelial NO production and vascular function. *J Biol Chem* 2007;282:879-887.
44. Chen M, Li Y, Yang T. ADMA induces monocyte adhesion via activation of chemokine receptors in cultured THP-1 cells. *J Cytokine* 2008; 43:149-159.
45. Antoniadou C, Shirodaria C, Leeson P, Antonopoulos A, Warrick N, Van-Assche T, Cunningham C, Tousoulis D, Pillai R, Ratnatunga C, Stefanadis C, Channon K. Association of plasma asymmetrical dimethylarginine (ADMA) with elevated vascular superoxide production and endothelial nitric oxide synthase uncoupling: implications for endothelial function in human atherosclerosis. *European Heart Journal* 2009;30: 1142-1150.
46. Smirnova IV, Kajstura M, Sawamura T. Asymmetric dimethylarginine upregulates LOX-1 in activated macrophages: role in foam cell formation. *J Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H782-H790.
47. Zhu Z, Jia J, Zhang X, Wang Y, Wang D. Asymmetric dimethylarginine upregulates the expression of ACAT-1 in THP-1 macrophage-derived foam cells. *J South Med Univ* 2010;30:2613-2618.
48. Tanaka M, Sydow K, Gunawan F, Jacobi J, Tsao PS, Robbins RC, Cooke JP. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase overexpression suppresses graft coronary artery disease. *Circulation*. 2005;112:1549-1556.
49. Schnabel R, Blankenberg S, Lubos E, Lackner KJ, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C, Jachmann N, Post F, Peetz D, Bickel C, Cambien F, Tiret L, Munzel T. Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the AtheroGene study. *Circ Res* 2005;97:e53-e59.
50. Tran CT, Leiper JM, Vallance P. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler Suppl* 2003;4:33-40.