



Efecto de la L-arginina sobre la dimetilarginina asimétrica y el óxido nítrico en la aterosclerosis

Effect of L-arginine on asymmetric dimethylarginine and nitric oxide in atherosclerosis

LETICIA FIGUEIRA^{*,***1}, JULIO CÉSAR GONZÁLEZ^{*,***2}

Resumen

El endotelio juega un papel importante en el mantenimiento de la estructura y tono vascular. El óxido nítrico (NO) es uno de los principales mediadores vasoactivos derivados del endotelio y es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina (L-Arg). La dimetilarginina asimétrica (ADMA) es un inhibidor competitivo de la sintasa de óxido nítrico (NOS); por lo que inhibe la formación de NO. Esta molécula se le ha implicado como un factor de riesgo para la disfunción endotelial. En el presente estudio se evaluó el efecto de la administración oral de L-Arg sobre los niveles séricos de ADMA, NO y los productos de peroxidación lipídica (TBARS) y la formación de ateromas en conejos alimentados con una dieta enriquecida con colesterol. Para ello, 40 conejos machos Nueva Zelanda fueron divididos en cuatro grupos durante 12 semanas: Grupo 1 (control): Conejarina. Grupo 2: Conejarina suplementada con 0,5% p/p de colesterol. Grupo 3 (control L-Arg): Conejarina y L-Arg (1,5%, vía oral en el agua). Grupo 4: Conejarina suplementada con 0,5% colesterol y L-Arg. Se realizaron determinaciones séricas de colesterol y sus fracciones, ADMA, NO y TBARS al inicio y final del estudio (12ma semana de experimentación). Al final del estudio todos los conejos de cada grupo fueron sacrificados y se realizó estudio histológico de su aorta. Los resultados demuestran que a las 12 semanas, la dieta enriquecida con colesterol aumentó significativamente los niveles séricos de ADMA y TBARS y disminuyó los de NO ($p<0,005$). La L-Arg revirtió significativamente los cambios de las concentraciones séricas de ADMA y NO inducidas por la dieta enriquecida con colesterol ($p<0,0050$), pero no afectó significativamente los incrementos de TBARS. El tratamiento con L-Arg no tuvo mucho efecto sobre el grado de ateromas. En conclusión, la ADMA, NO y TBARS son marcadores séricos no invasivos de aterosclerosis; sugiriendo el papel del estrés oxidativo y la disfunción endotelial en la fisiopatología de esta enfermedad. Asimismo, la suplementación con L-Arg, puede ser útil para disminuir los niveles de ADMA y aumentar los de NO, posiblemente mejorando la disfunción endotelial.

Palabras clave: L-arginina, dimetilarginina asimétrica, óxido nítrico, sintasa de óxido nítrico, estrés oxidativo, disfunción endotelial, aterosclerosis

Abstract

The endothelium plays a crucial role in maintaining vascular tone and structure. One of the major endothelium-derived vasoactive mediators is nitric oxide (NO), which is synthesized from the amino acid L-arginine (L-Arg). Asymmetric dimethylarginine (ADMA) is an endogenous competitive inhibitor of NO synthase (NOS). ADMA inhibits vascular NO production. This molecule has been implicated as a risk factor for endothelial dysfunction. We evaluated the effect of L-Arg on serum levels of ADMA, NO and thiobarbituric acid-reactive lipid peroxidation products (TBARS) and atherosclerosis lesion formation in rabbits fed with a cholesterol diet. 40 New Zealand white male rabbits were randomly divided into four groups that received for 12 weeks: Group 1 (control): Standard diet (commercial rabbit food). Group 2: Cholesterol diet (0.5% cholesterol). Group 3 (control L-Arg): Standard diet (commercial rabbit food) and L-Arg (1.5% in drinking water). Group 4: Cholesterol diet (0.5% cholesterol) and L-Arg (1.5% in drinking water). Blood samples of overnight-fasted rabbits were collected on the basal and final experiment (twelfth week), and the concentration of lipid profile, ADMA, NO, and TBARS was determined. All animals were sacrificed on the twelfth week, and the aorta was dissected for histological studies. Our findings demonstrate that in 12 weeks, the cholesterol-enriched diet significantly increased serum levels of ADMA and TBARS and decreased NO ($p<0.005$). L-Arg significantly reversed the changes in serum concentrations of ADMA and NO induced by the cholesterol-enriched diet ($p<0.0050$) but did not significantly affect the increases in TBARS. L-Arg treatment had little effect on the degree of atherosclerotic lesions. These results support that serum ADMA, NO, and TBARS levels are markers of atherosclerosis, suggesting a role for oxidative stress and endothelial dysfunction in atherosclerosis. Likewise, oral supplementation of L-Arg may be useful in decreasing ADMA and increasing NO levels, possibly improving endothelial dysfunction.

Keywords: L-arginine, Asymmetric dimethylarginine, nitric oxide, nitric oxide synthase, oxidative stress, endothelial dysfunction, atherosclerosis

*Laboratorio de Investigación y Postgrado de la Escuela de Bioanálisis (LIPEB), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Carabobo, Venezuela. **Laboratorio Clínico Dra. Leticia Figueira, Carabobo – Venezuela, ***Laboratorio Clínico Julio César González. Carabobo, Venezuela. Correspondencia: figueiraleticia@gmail.com

Orcid: [1'0000-0003-3865-5355](https://orcid.org/0000-0003-3865-5355)
[2'0000-0003-1980-5848](https://orcid.org/0000-0003-1980-5848)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2025.88.1-2.10](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2025.88.1-2.10)
Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff
Recepción: 30/05/2025
Aprobación: 05/06/2025
Rev. Fac. Farmacia 88(1): 98-115. 2025

Introducción

El endotelio juega una función importante en el mantenimiento del tono y estructura vascular. Uno de los principales mediadores vasoactivos derivados del endotelio es el óxido nítrico (NO); el cual es un radical libre involucrado en la regulación de diversos procesos biológicos como la relajación y proliferación de las células de músculo liso, angiogénesis, respuesta inmunológica, secreción de insulina, señalización y comunicación celular, apoptosis, inflamación, en la fisiopatología de enfermedades cardiovasculares (CDV), diabetes y estrés oxidativo (Newsholme y col., 2009). El NO es sintetizado a partir del aminoácido semi-esencial L-arginina (L-Arg) en una reacción oxidativa que consume oxígeno molecular y equivalentes reductores en la forma de NADPH. El producto de la reacción es NO, NADP⁺ y citrulina. La enzima involucrada en la síntesis del NO es la sintasa del NO (NOS), de la cual se han descrito tres isoenzimas, la neuronal o tipo 1 (nNOS), la inducible (iNOS) y la endotelial (eNOS) (Das y col., 2011).

La disminución en la producción de NO puede ocasionar disfunción endotelial, disminución del flujo sanguíneo, del transporte de la glucosa, resistencia a la insulina, hipertensión y diabetes; de hecho, diversos estudios han reportado que la producción de NO se ve disminuida en diversas enfermedades CDV y metabólicas occasionando importantes alteraciones fisiológicas (Krause y col., 2012).

Entre los mecanismos que subyace la baja producción y biodisponibilidad del NO en las enfermedades CDV y metabólicas, destaca la disminución de los niveles sanguíneos de insulina, el incremento en

la producción de angiotensina II (Ang II), la hiperhomocisteinemia, el incremento de los niveles de la dimetilarginina asimétrica (ADMA) y los bajos niveles plasmáticos de L-Arg (Newsholme y col., 2009); por lo tanto, la suplementación con L-Arg es considerada como una terapia potencial para el tratamiento de las enfermedades CDV y metabólicas al restaurar los niveles de NO (Rodrigues-Krause y col., 2018).

Se ha descrito que el NO juega un papel crucial en el sistema vascular y en el corazón; pues en la vasculatura coronaria, participa en la vasodilatación, disminuye la expresión y producción de moléculas de adhesión celular, la agregación plaquetaria, proliferación vascular y angiogénesis (Poeggeler y col., 2023). En los cardiomiositos, las acciones del NO son más complejas, pues pueden inducir diferentes efectos, y en ocasiones opuestos en la función cardiaca, como la activación de la apoptosis y mejoría de la función ventricular izquierda (Visser y col., 2010).

La producción de NO puede verse alterada por inhibidores de la NOS, como la ADMA, un análogo de la L-Arg; inhibidor competitivo de la NOS. En este sentido, este compuesto ha sido señalado como un nuevo marcador de riesgo cardiovascular y disfunción endotelial (Mortensen y col., 2024); encontrándose niveles elevados de esta molécula en pacientes con enfermedades CDV con respecto a sujetos aparentemente sanos; siendo un marcador de mal pronóstico en estos pacientes (Vilcea y col., 2024). Estudios longitudinales revelan que la ADMA predice la morbi-mortalidad CDV tanto en pacientes con infarto al miocardio como accidente cerebrovascular (Aslan, 2011; Konya y

col., 2014); en efecto, concentraciones elevadas de ADMA causan alteración en la síntesis de NO, lo cual conlleva disfunción endotelial y aterogénesis (Konya y col., 2015; Dowsett y col., 2020). Asimismo, se ha descrito que la infusión de ADMA tanto en ratas como en humanos, aumenta la presión arterial sistólica de manera dosis dependiente, reduce los niveles de nitritos/nitratos y de guanosina monofosfato cíclico (GMPc), el principal segundo mensajero del NO (Kielstein y col., 2004; De Gennaro y col., 2007); por lo tanto, estudios *in vivo* e *in vitro* demuestran que la ADMA ejerce poderosos efectos sobre la función endotelial, reduciendo la integridad de la barrera, e incrementando la producción de especies reactivas de oxígeno (EROS) y marcadores inflamatorios, muchos de estos efectos son mediados mediante la inhibición de la producción de NO; lo cual sugiere los efectos proaterogénicos de esta molécula (Dowsett y col., 2020).

La ADMA puede ser excretada por los riñones o metabolizada por la enzima dimetilarginina dimetilaminohidrolasa (DDAH). Dado que la ADMA inhibe la producción de NO al competir con la arginina por la unión de la NOS, la cantidad neta de producción de NO podría indicarse por la relación entre el sustrato y el inhibidor, la relación arginina/ADMA. Por lo tanto, el efecto perjudicial de la ADMA podría inhibirse al aumentar la concentración de arginina o la concentración de sus precursores, citrulina y glutamina, lo que aumentaría la relación arginina/ADMA y, por consiguiente, podría revertir la inhibición competitiva de la NOS por la ADMA (Visser y col., 2010). Por lo tanto, la suplementación con L-Arg podría constituir una terapia potencial para el tratamiento de enfermedades CDV y metabólicas al

disminuir la disfunción endotelial, al reducir la ADMA y mejorar la producción de NO por parte de la eNOS; sin embargo, su eficacia no está del todo clara debido al empleo de diferentes fuentes de L-Arg, diferentes regímenes de dosificación y a la población estudiada (Rodrigues-Krause y col., 2018). Es por ello que, en el presente estudio se evaluó el efecto de la administración oral de L-Arg sobre los niveles séricos de ADMA, NO y TBARS y la formación de ateromas en conejos alimentados con una dieta enriquecida con colesterol.

Materiales y Métodos

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Se emplearon 40 conejos machos de la raza Nueva Zelanda de 12 semanas de edad con un peso entre 1.200 a 1.300 gramos, provenientes del Bioterio del Instituto de Higiene “Rafael Rangel” (Caracas, Venezuela). Los animales fueron mantenidos en jaulas a temperatura ambiente ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$) con ciclos de 12 horas luz/oscuridad. Después de una semana de ambientación en el Bioterio Experimental de la Universidad de Carabobo (Valencia, Venezuela), los conejos fueron divididos aleatoriamente en cuatro grupos de 10 conejos cada uno, organizados de la siguiente manera: Grupo 1 (Control): Los cuales fueron alimentados diariamente con conejarina comercial (Protinal, Venezuela). Grupo 2 (Colesterol): Alimentados diariamente con conejarina comercial suplementada con 0,5% p/p de colesterol. Grupo 3 (Control-L-Arg): Alimentados diariamente con conejarina comercial y suplementados con L-Arg (1,5%, vía oral en el agua). Grupo 4 (Colesterol-L-Arg):

Alimentados diariamente con conejarina comercial suplementada con 0,5% p/p de colesterol y L-Arg (1,5%, vía oral en el agua).

Todos los conejos consumieron agua a libre demanda. El periodo experimental tuvo una duración de doce semanas. Los conejos fueron pesados antes, durante y después de la experimentación. Los experimentos fueron aprobados por el comité de Bioética, y siguieron las buenas prácticas para el manejo de animales de laboratorio del National Institute of Health (NIH Publications No. 8023, 1978).

ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS ALIMENTOS

Conejarina comercial (Protinal, Venezuela). 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%.

Dieta hipercolesterolemica. La administración de colesterol mediante el enriquecimiento de una dieta estándar se realizó de acuerdo con el método descrito en los modelos animales de aterosclerosis inducida por la dieta (Rasmussen y col., 2007); la cual se preparó disolviendo el colesterol en etil-éter y etanol absoluto, y cubriendo con esta mezcla los granos de la conejarina en una relación de 0,5 g de colesterol por cada 100 g de alimento y se dejó secar hasta la evaporación completa de los solventes por 24 horas.

Procedimiento experimental. Determinaciones bioquímicas. Las muestras de sangre fueron extraídas por punción intracardiaca a todos los conejos previo ayuno de 14 horas al inicio (semana 0) y final del estudio (12ma semana), utilizando tubos sin anticoagulante. Posteriormente, las muestras previamente mantenidas en frío se centrifugaron a 3.000 rpm durante 15 minutos y el suero obtenido fue conservado en congelación a -70°C hasta el momento del procesamiento. Se realizaron determinaciones séricas de colesterol total (CT) por método enzimáticos (Wiener Lab, Argentina). La determinación del colesterol asociado a las lipoproteínas de alta densidad (c-HDL) y asociado a las lipoproteínas de baja densidad (c-LDL) se realizaron por precipitación y posterior determinación enzimática (Wiener Lab, Argentina). Las concentraciones séricas de ADMA fueron determinadas por ensayo inmunoenzimático (NeoBiolab, Cambridge, Massachusetts, USA). El NO sérico fue determinado indirectamente mediante la determinación de los niveles de nitritos/nitratos usando la reacción de Griess (Green y col., 1982). Para ello, 50 µL de reactivo de Griess fueron añadidos a 50 µL de suero, incubado por 10 minutos a temperatura ambiente y la absorbancia fue medida a 570 nm. Los resultados obtenidos fueron referidos a un patrón de nitrito de sodio y expresado en µM. Las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) fueron evaluadas por un método colorimétrico, el cual consistió en evaluar el efecto de las EROS sobre los lípidos, que resulta en la producción de varias sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico y que pueden ser cuantificadas mediante espectrofotometría (Ohkawa y col., 1979).

Sacrificio de los animales. Preparación de tejidos y tipificación histológica de las lesiones ateroscleróticas. Al final del estudio se sacrificó por dislocación cervical a todos los conejos de cada grupo. Se procedió a realizar la autopsia de dichos animales, extrayendo la arteria aorta para ser examinada. Las muestras de tejido extraídas fueron fijadas en formaldehído al 10 % en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 24 horas y procesadas según la técnica de rutina y posteriormente teñidas con hematoxilina – eosina, para luego ser observados por microscopía de luz. Las lesiones fueron tipificadas de acuerdo con la clasificación de la American Heart Association, la cual considera como lesiones tipo I, aquellas iniciales constituidas por células espumosas sub-endoteliales aisladas; las lesiones tipo II constituidas principalmente por un cúmulo de lípidos intracelulares; las lesiones tipo III son intermedias o pre-ateromas, caracterizadas por cúmulos de lípidos intracelulares y dispersos lípidos extracelulares; las lesiones tipo IV son los ateromas, representan lesiones avanzadas, y están constituidas por lípidos intracelulares y por una gran cantidad de lípidos extracelulares; las lesiones tipo V contienen tejido conectivo fibroso y en ocasiones se encuentran calcificaciones y las lesiones tipo VI son las placas complicadas (fisura, trombos, hematomas) (Stary y col., 1995).

Análisis de los datos

Se calculó el promedio y la desviación estándar para las variables estudiadas. Se realizó las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Jarque-Bera. Se empleó el análisis de Kruskall-Wallis con análisis post hoc mediante la prueba de U- de Mann-Whitney sobre cada par de grupos. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$. Se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5.

RESULTADOS

PERFIL LIPÍDICO DE LOS CONEJOS

En la Tabla I se resume las concentraciones de los lípidos séricos de los conejos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones basales de colesterol (CT) y sus fracciones entre los grupos de conejos en estudio. El CT y sus fracciones en el grupo 1 y 3 permanecieron sin cambios significativos a lo largo del estudio. Sin embargo, se apreció que la dieta rica en colesterol aumentó significativamente la concentración de CT y sus fracciones (grupo 2) con respecto a sus respectivos controles (grupo 1) ($p < 0,0001$). El tratamiento con L-Arg no fue capaz de revertir los incrementos inducidos por la dieta enriquecida con colesterol en las concentraciones séricas de CT y sus fracciones (grupos 4) si se compara con su control y el valor basal (grupos 1 y 3) ($p < 0,0001$).

CONCENTRACIONES SÉRICAS DE ADMA, NO Y TBARS

Como se puede apreciar en las Figuras 1, 2 y 3, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones séricas basales de ADMA, NO y TBARS entre los grupos de conejos sujetos a estudio. De igual manera, los resultados demuestran que al final del estudio, la dieta enriquecida con colesterol aumentó significativamente los niveles séricos de ADMA y TBARS y disminuyó los de NO (grupo 2) ($p < 0,005$) cuando se comparan con su control (grupo 1). El tratamiento con L-Arg no afectó los niveles basales de ADMA, TBARS y NO (grupo 3) pero fue capaz de revertir significativamente los cambios de las concentraciones séricas de ADMA y NO inducidas por la dieta enriquecida

Tabla I.
Lípidos séricos de los conejos sujetos a estudio

	CT (mg/dL)	c-LDL (mg/dL)	c-HDL (mg/dL)
Basal			
Grupo 1	73 ± 20	38 ± 11	29 ± 12
Grupo 2	67 ± 25	39 ± 10	31 ± 11
Grupo 3	75 ± 19	41 ± 9	32 ± 10
Grupo 4	70 ± 22	37 ± 13	31 ± 10
12ma semana			
Grupo 1	82 ± 22	42 ± 14	34 ± 12
Grupo 2	1204 ± 243*	901 ± 141*	77 ± 40*
Grupo 3	79 ± 21	40 ± 12	35 ± 10
Grupo 4	1098 ± 220#	891 ± 172#	81 ± 44#
Valores p			
Grupo 1	0,9655	0,9462	0,9208
Grupo 2	0,0001	0,0001	0,0001
Grupo 3	0,9735	0,9846	0,9607
Grupo 4	0,0001	0,0001	0,0001

Los resultados fueron expresados como la media ± desviación estándar de la media. Significativo p<0,05. * = Comparación con respecto al grupo 1. # = Comparación con respecto al grupo 3. p= Comparación con respecto al basal

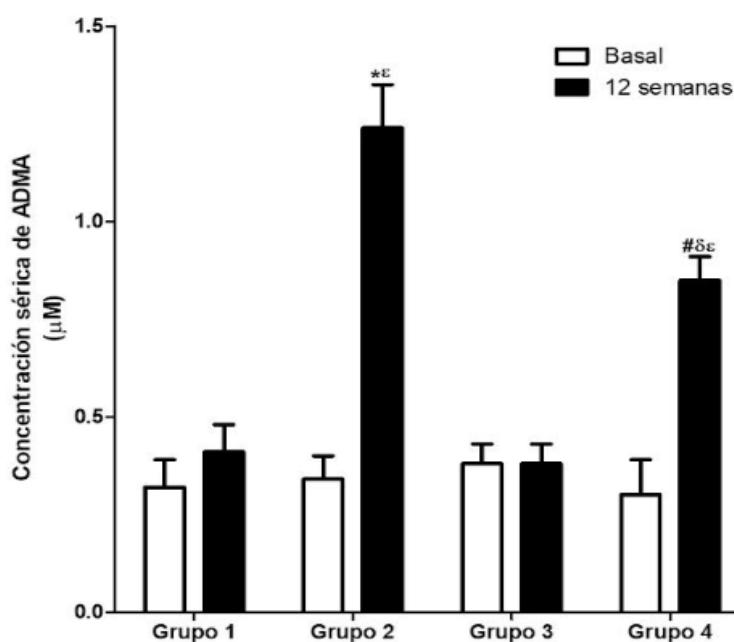


Figura 1. Efecto de la L-Arg sobre las concentraciones séricas de ADMA en los conejos sujetos a experimentación al inicio y final del estudio. Los resultados fueron expresados como la media ± desviación estándar de la media (n=10). *p<0,0050 vs. grupo control (Grupo 1). #p<0,0050 vs. control L-Arg (Grupo 3). ^p<0,005 vs. Grupo 2. ^p<0,0001 vs. su respectivo valor basal

con colesterol (p<0,0050), sin afectar significativamente los incrementos séricos de TBARS (grupo 4) (p<0,0050).

ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LA AORTA

En la Tabla II se presenta la distribución de los conejos según el máximo grado de ateroma encontrado en los cortes de aorta, evidenciando que ningún conejo de los grupos 1 y 3 presentaron lesiones ateroscleróticas. Por su parte, los conejos del grupo 2 y 4 tratados con dieta enriquecida con colesterol presentaron lesiones de grado intermedio y avanzado al finalizar el estudio (Figura 4). El tratamiento con L-Arg no afectó la formación de ateromas inducido por la dieta enriquecida con colesterol encontrado en los cortes de aorta (grupo 4).

Discusión

El endotelio es un revestimiento continuo dentro de los vasos sanguíneos, el cual juega un papel importante en la homeostasis vascular mediante la regulación del tono vascular, de la proliferación de células de músculo liso, la adhesión de células inmunes y la inflamación vascular; a través de la producción de factores bioactivos; entre los que incluyen sustancias relajantes derivadas del endotelio como las prostaglandinas y el NO; así como factores constrictores derivados del endotelio como la Ang II y la endotelina-1 (Wang y He, 2024). Por lo tanto, el endotelio vascular constituye una interfaz dinámicamente cambiante, cuyas propiedades estructurales y funcionales responden a una variedad de estímulos, tanto

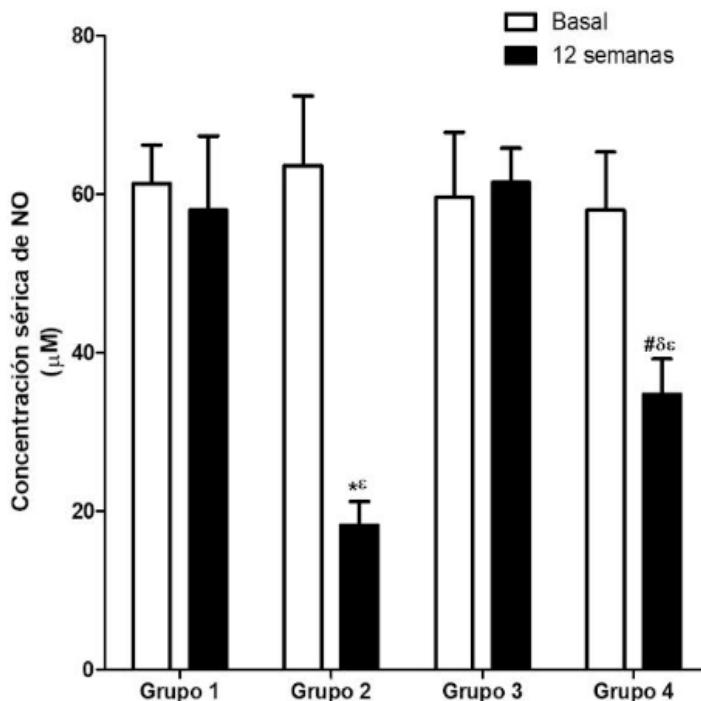


Figura 2. Efecto de la L-Arg sobre las concentraciones séricas de NO en los conejos sujetos a experimentación al inicio y final del estudio. Los resultados fueron expresados como la media ± desviación estándar de la media (n=10). *p<0,0050 vs. grupo control (Grupo 1). #p<0,0050 vs. control L-Arg (Grupo 3). †p<0,005 vs. Grupo 2. ‡p<0,0001 vs. su respectivo valor basal

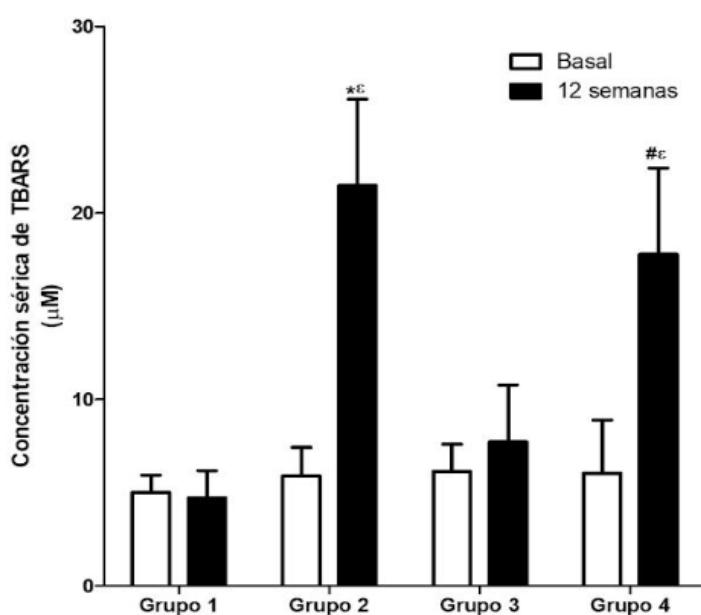


Figura 3. Efecto de la L-Arg sobre las concentraciones séricas de TBARS en los conejos sujetos a experimentación al inicio y final del estudio. Los resultados fueron expresados como la media ± desviación estándar de la media (n=10). *p<0,0050 vs. grupo control (Grupo 1). #p<0,0050 vs. control L-Arg (Grupo 3). †p<0,0001 vs. su respectivo valor basal

locales como sistémicos, y que su modulación fenotípica a un estado disfuncional puede constituir un factor de riesgo importante para enfermedades vasculares como la aterosclerosis (Gimbrone y col., 2013).

La disfunción endotelial está caracterizada por un desbalance entre la producción de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras; y se ha postulado que es el paso inicial en la patogénesis de la aterosclerosis y las enfermedades CDV; de hecho la falla en la vasodilatación dependiente del endotelio es una característica común encontrada en la vasculatura de pacientes con enfermedades CDV; y la mejoría de la función endotelial podría prevenir el desarrollo y progresión de la aterosclerosis, lo cual resulta en una disminución de los eventos cardíacos (Higashi y col., 2009; Cao y col., 2024).

El NO es un radical libre gaseoso caracterizado por su alta actividad y fácil difusión, sintetizado por tres subtipos distintos de enzimas NOS (Solomonson y col., 2003; Poeggeler y col., 2023; Wang y He, 2024). El NO es una molécula de señalización que tiene efectos cardioprotectores y antiaterogénicos; pues previene la adhesión y agregación celular y de plaquetas en el endotelio de los vasos sanguíneos (Ignarro y Napoli, 2004). Es un poderoso inhibidor de la proliferación de células de músculo liso, es un antioxidante que produce efectos antiinflamatorios, y puede prevenir la oxidación de las LDL y por lo tanto retrasar la progresión de la aterosclerosis; es más, la deficiencia

Tabla II.

Distribución de los conejos según el máximo grado de ateroma encontrado en los cortes de aorta. Datos presentados como n (%)

Grupo	Sin ateroma	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	Tipo V
1	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (40%)	6 (60%)	0 (0%)
3	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
4	0 (0%)	0 (0%)	1 (10%)	5 (50%)	4 (40%)	0 (0%)

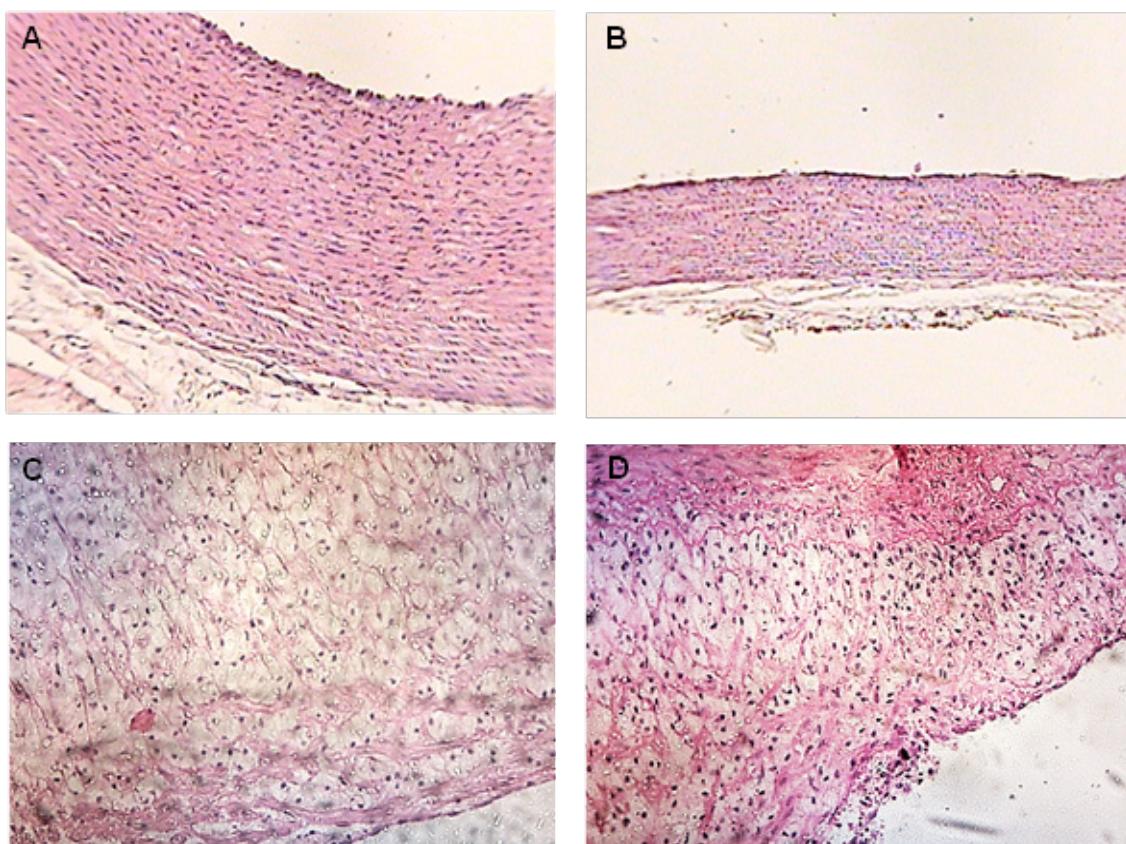


Figura 4. Cortes histológicos de las aortas de los conejos al final del estudio. Sin lesiones (Panel A) de un conejo perteneciente al grupo 1. Aorta normal (Panel B) de un conejo perteneciente al grupo 3. 10X. Lesión tipo IV (Panel C) de un conejo perteneciente al grupo 2. Lesión tipo IV (Panel D) de un conejo perteneciente al grupo 4. Se observa en la íntima arterial lípidos intracelulares y extracelulares en mayor extensión. Tinción hematoxilina – eosina. 50X.

de NO generalmente está asociada con el aumento en la expresión de genes sensibles a la oxidación (Ignarro y col., 2001).

Se ha descrito que la disminución de la biodisponibilidad del NO, puede ser producto de la reducción en su producción y/o incremento en su degradación, y constituye uno de los mecanismos más importantes que induce la disfunción endotelial, pues un desbalance entre los vasodilatadores dependientes del endotelio (especialmente el NO) y las EROS (estrés oxidativo), está involucrado en la disfunción endotelial a través de la inactivación del NO (Higashi y col., 2009; Poeggeler y col., 2023). En efecto, estudios *in vitro*, han demostrado que las LDL oxidadas (LDLox) impiden la estimulación de la síntesis del GMPc inducido por NO, probablemente mediante la acción de lípidos oxidados, abundantes en estas lipoproteínas (Chin y col., 1992). Aparte de estos efectos, donde parece estar incrementada la degradación del NO, se ha observado que a concentraciones elevadas de LDLox se puede inhibir la expresión de la eNOS endotelial y la síntesis de NO en células endoteliales en cultivo *in vitro* (Liao y col., 1995). También se ha puesto de manifiesto una reducción de la expresión de la eNOS en vasos sanguíneos de humanos y animales hipercolesterolémicos (Hernández-Perera y col., 1998).

Por otra parte, la síntesis del NO puede ser inhibida por la ADMA, la cual es un análogo endógeno de la L-Arg sustituido con guanidina, y es un inhibidor competitivo de la NOS (Poeggeler y col., 2023). Además de inhibir la formación de NO, la ADMA puede desacoplar a la NOS, lo cual lleva a la generación de superóxido. En este sentido, la evidencia sugiere que la ADMA puede

contribuir al estrés oxidativo al desacoplar la eNOS a través del agotamiento de la tetrahidrobiopteterina (BH4), lo cual resulta en un cambio en la producción de NO a anión superóxido (Antoniades y col., 2009; Franceschelli y col., 2013), por lo que se ha descrito una fuerte asociación entre el estrés oxidativo, el incremento de la ADMA endotelial y la producción de superóxido mediada por la NOS; por lo tanto la ADMA ha destacado como un marcador de enfermedad CDV y de mortalidad en pacientes con enfermedad arterial coronaria (Appel y col., 2020; Papageorgiou y col., 2023). Se ha postulado que en la población en general, las concentraciones elevadas de ADMA predicen la mortalidad de manera independiente a otros factores de riesgo CDV (Böger y col., 2009), pues es capaz de inhibir la NOS y al transportador de aminoácido catiónicos, participando en la disfunción endotelial y en la generación de estrés oxidativo microvascular, los cuales son importantes mediadores de las enfermedades CDV y la aterosclerosis (Teerlink y col., 2009).

En el presente estudio se encontró que la administración de una dieta enriquecida con colesterol ocasionó un aumento en las concentraciones séricas de ADMA, TBARS y disminución de los niveles de NO, lo cual estuvo acompañado por un incremento en los lípidos séricos y de la presencia de lesiones ateroscleróticas, apoyando la existencia de un estado oxidativo y de disfunción endotelial en la aterosclerosis, sugiriendo la importancia de la disfunción endotelial y estrés oxidativo en la aterogénesis, tal y como se ha reportado previamente (González y col., 2008; Figueira y González, 2008; 2018; 2020; 2022, 2023, 2024). De hecho, diversos estudios, han demostrado una

fuerte relación entre el espesor íntima - media aumentado y las concentraciones séricas de ADMA (Kobayashi y col., 2004; Furuki y col., 2007). Asimismo, estudios prospectivos, demuestran que la ADMA es un predictor de enfermedad arterial coronaria (Furuki y col., 2008) y de mortalidad en pacientes con infarto al miocardio (Zeller y col., 2008). A nivel experimental, se ha descrito que la administración de ADMA a ratones C57BL/6J ocasionó lesiones ateroscleróticas (Xiao y col., 2007) e indujo fibrosis perivascular y engrosamiento de la íntima en la microvasculatura coronaria (Suda y col., 2004). De igual manera, el tratamiento con ADMA en ratones ApoE deficientes fue capaz de ocasionar un aumento en las lesiones ateroscleróticas en la aorta (Xiao y col., 2007). Aún más, se ha descrito que la sobreexpresión de la DDAH1, también conocida como dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 1, en modelos de lesión de arteria femoral, fue capaz de mejorar la reparación endotelial, suprimir la formación de la neoíntima y reducir la infiltración de leucocitos (Konishi y col., 2007), lo cual sugiere que el aumento de los niveles de ADMA podría impactar sobre la aterogénesis mediante la inhibición de los procesos de reparación vascular.

Dada la asociación entre la ADMA y la disfunción endotelial, diversos estudios han investigado los mecanismos por el cual la ADMA puede afectar la formación de lesiones ateroscleróticas; donde se evidencia que esta molécula puede mediar la aterogénesis a través de la reducción de la función de la barrera endotelial, la alteración de la señalización del factor nuclear kappa B (NF- κ B), un factor de transcripción importante en la activación pro-inflamatoria del endotelio; y mediante la reorganización de las fibras de actina,

acelerando la senescencia de las células endoteliales, promoviendo la inflamación endotelial (Dowsett y col., 2020). De igual manera, la evidencia indica que tanto la ADMA como las EROS alteran la señalización del NO, lo que sugiere que podrían interactuar para causar o reforzar el deterioro y la enfermedad vascular (Sydow y col., 2003; Wilcox, 2012). En este sentido, Antoniades y col. (2009) demostraron que los niveles elevados de ADMA sérica se correlacionan de manera positiva con la producción de superóxido, tanto en venas safenas como arterias mamarias internas de pacientes con enfermedad de las arterias coronarias, y los niveles sistémicos de EROS predicen eventos CDV (Vassalle y col., 2012). Por otra parte, se ha descrito que la ADMA puede incrementar la formación de células espumosas, pues el LDL-c aumenta la generación de ADMA (Böger y col., 2000), y éste incrementa la captación de LDL_x, sugiriendo un ciclo de retroalimentación positiva, donde las concentraciones de ADMA impulsan la formación de células espumosas (Dowsett y col., 2020). Por consiguiente, la ADMA tiene profundos efectos sobre la función endotelial y la atherosclerosis, reduciendo la integridad endotelial, mientras que incrementa la producción de marcadores inflamatorios y EROS, favoreciendo la atherosclerosis. Por lo tanto, nuestros hallazgos ratifican que la determinación de la ADMA, NO y TBARS constituyen marcadores no invasivos y valiosos de la atherosclerosis, lo cual sugiere que la oxidación y la disfunción arterial juegan un papel relevante en la fisiopatología de esta enfermedad.

La evidencia experimental y clínica demuestra que la suplementación con L-Arg podría constituir una terapia potencial para el tratamiento de enfermedades CDV y

metabólicas. En este sentido, la disfunción de la vía endotelial de la L-Arg-NO, es un mecanismo común por el cual varios factores de riesgo CDV median sus efectos nocivos sobre la pared vascular, entre ellos se encuentran la hipercolesterolemia, la hipertensión, el tabaquismo, la diabetes mellitus, la hiperhomocisteinemia y la inflamación vascular (Böger, 2004).

Diferentes estudios experimentales apoyan los efectos beneficiosos de la suplementación de L-Arg en las enfermedades CDV; en este sentido, la administración oral de este aminoácido en ratas Dahl sal-sensibles ha demostrado prevenir el aumento de la presión arterial inducido por una dieta alta en sal (Chen y col., 1993; Zhou y col., 2001). Sin embargo, este efecto preventivo no se observa en ratas que ya han sido expuestas durante 3 semanas a una dieta alta en sal (Chen y col., 1993), lo cual sugiere que la L-Arg es capaz de prevenir y contrarrestar la hipertensión cuando está en las primeras etapas, ya que cuando las ratas han sido pre-expuestas a una dieta alta en sal durante 3 semanas, su sistema cardiovascular puede haber sufrido cambios estructurales y funcionales, lo que dificulta que la L-Arg tenga el mismo efecto preventivo.

Por otra parte, la evidencia clínica muestra que la suplementación oral aguda de L-Arg mejora la dilatación dependiente del endotelio de la arteria braquial en pacientes con hipertensión esencial (Lekakis y col., 2002), y su administración endovenosa (500 mg/Kg por 30 min) fue capaz de reducir la presión arterial en pacientes sensible e insensibles a la sal (Higashi y col., 1996). En contraste, en un meta-análisis de ensayo controlado y aleatorio, la suplementación

con L-arginina (9 g/día por vía oral) no demostró mejoría sobre los resultados clínicos (mortalidad por todas las causas, reinfarto de miocardio, reanimación exitosa, shock/edema pulmonar, isquemia miocárdica recurrente y hospitalización por insuficiencia cardíaca) en pacientes con infarto agudo de miocardio (Sun y col., 2009), ni mejoría en los niveles séricos de NO y ADMA en pacientes con enfermedad CDV y metabólica (Rodrigues-Krause y col., 2018). Por otra parte, en otro meta – análisis se observó que la L-Arg (4 a 24 g/día) fue efectiva, en comparación al placebo, en disminuir la presión arterial sistólica y diastólica en 5,39 mmHg y 2,66 mmHg, respectivamente (Dong y col., 2011); lo cual sugiere que dichas diferencias sobre la eficacia de la L-Arg podrían ser debidas a la dosis, esquema de tratamiento y características y patologías de la población estudiada.

Por otra parte, algunos estudios experimentales en animales y humanos han demostrado que la administración oral de L-Arg retrasa el proceso aterogénico (Böger y col., 1998; Ignarro y Napoli, 2004); y la coadministración de antioxidantes con L-Arg incrementa dicha respuesta antiaterosclerótica (Ignarro y Napoli, 2004). El mecanismo de acción de la L-Arg es incrementar la producción de NO, mientras que los antioxidantes actúan protegiendo el NO recién formado de la destrucción por EROS. Por lo tanto, la L-Arg es considerada como una terapia prometedora para el tratamiento de enfermedades CDV y metabólicas, mediante la normalización de los niveles de NO y de otros metabolitos; sin embargo, la variabilidad metodológica en las poblaciones estudiadas y las intervenciones limitan la interpretación de la eficacia de la suplementación con L-Arg en diferentes

biomarcadores CDV o de enfermedad metabólica (Rodrigues-Krause y col., 2018).

En el presente estudio, y bajo nuestras condiciones experimentales, se demostró que la administración oral de L-Arg (1,5%, vía oral en el agua) durante 12 semanas, no afectó los niveles basales de ADMA, TBARS y NO, pero fue capaz de revertir significativamente los cambios de las concentraciones séricas de ADMA y NO inducidas por la dieta enriquecida con colesterol, sin afectar significativamente los incrementos séricos de TBARS. En efecto, la administración de L-Arg redujo las concentraciones séricas incrementadas de ADMA, y aumentó los niveles reducidos de NO en los conejos alimentados con una dieta enriquecida con colesterol. Estos hallazgos sugieren que la L-Arg tendría efectos protectores sobre el endotelio, posiblemente restaurando los niveles de NO y ADMA, tal y como se ha descrito en otros estudios (Boger y col., 1995; Clarkson y col., 1996; Boger y col., 1997). En este sentido, Napoli y col. (2004) encontraron que la administración crónica de L-Arg a ratones deficientes de los receptores de LDL produjo un marcado aumento en la expresión de la eNOS. Asimismo, Lee y col. (2020), encontraron que el extracto de la raíz de *Arctium lappa*, planta rica en L-Arg, fue capaz de suprimir la adhesión de monocitos al endotelio vascular inducida por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) mediante la supresión de la señalización de NF- κ B en células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC). Por otra parte, en un modelo murino de aterosclerosis, este extracto inhibió la infiltración de monocitos inducida por TNF- α en el endotelio vascular y la expresión de genes que codifican para citoquinas inflamatorias entre las que ese incluyen la interleucina 1-beta (IL-1 β),

interleucina-6 (IL-6), TNF- α y proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1 (MCP-1) en la aorta de ratones; evidenciándose que la L-Arg es un componente importante de este extracto, y que el mismo fue capaz de inhibir la adhesión de monocitos *in vitro* inducida por TNF- α en células HUVEC (Lee y col., 2020). Por otra parte, Brinkmann y col. (2015), encontraron que la suplementación combinada de arginina (1,5% en 1g de alimento/Kg peso corporal) y estatinas en conejos homocigotos con hiperlipemia hereditaria Watanabe, durante 8 semanas, ocasionó una alta relación arginina/ADMA, y menores lesiones ateroscleróticas en la aorta, lo cual sugiere la eficacia combinada de la L-Arg y la estatina en la aterosclerosis.

Por lo tanto, parte de los efectos beneficiosos de la terapia de la L-Arg encontrados en el presente estudio, se deban probablemente al incremento en la producción de NO; pues existe una mayor disponibilidad de sustrato (L-Arg) para la eNOS, que puede superar la inhibición del ADMA sobre la eNOS (Sydow y col., 2003). De hecho, se ha demostrado que la ADMA directamente afecta a la integridad y función de la vasculatura, dañando las uniones gap, induciendo la migración de células de músculo liso, la formación de células espumosas y la apoptosis de células endoteliales y de músculo liso (Chen y col., 2012). Asimismo, se ha descrito que la ADMA, no sólo inhibe la NOS, también inhibe al transportador de aminoácidos catiónico 1 (CAT1), el cual es el transportador que facilita la captación de Arg y ADMA en las células endoteliales; sin embargo, a concentraciones fisiológicas, la ADMA no puede afectar a dicho transportador; pero, elevadas concentraciones de Arg pueden inhibir la captación de ADMA mediada por CAT1 (Clarkson y col., 1996).

El mantenimiento de niveles elevados de Arg en plasma puede ser problemático debido a su catabolismo por la arginasa; de hecho, se ha descrito que la efectividad de la terapia con Arg podría reducirse en varias enfermedades CDV en los cuales la expresión y actividad de esta enzima intestinal y citosólica están aumentadas. En contraste con la Arg, la citrulina, no es metabolizada en el intestino, ni en hígado, y no induce la arginasa tisular, inclusive inhibe su actividad (Visser y col., 2010). Por otra parte, se ha descrito que el reciclaje de la L-citrulina a L-Arg está localizado en las cavéolas y puede representar la principal fuente para la disponibilidad de la L-Arg (Solomonson y col., 2003). La disponibilidad de la L-Arg citosólica para eNOS puede estar limitada por la captación en las cavéolas; por lo que la administración de un exceso de L-Arg puede crear suficiente gradiente de concentración para que haya más L-Arg disponible para la eNOS. Además, la L-citrulina, el segundo producto de reacción de la NOS, induce relajación dependiente del endotelio en aorta de ratas, acompañado de un incremento en el nitrato tisular y GMPC (Raghavan y Dikshit, 2001), posiblemente debido a que la L-citrulina es convertida en L-Arg en las células endoteliales, siendo el reciclaje de la Arg una fuente importante de este aminoácido para mantener la producción de NO en las células endoteliales, especialmente en situaciones cuando este aminoácido se vuelve limitante, como posiblemente ocurre en la aterosclerosis (Sydow y col., 2003).

A pesar de que en la presente investigación se evidenció una diminución en los niveles de ADMA, y aumento del NO por el tratamiento con L-Arg, este aminoácido no produjo cambios en los niveles de TBARS y generó poco efecto en el grado de las lesiones ateroscleróticas

(no hubo reversión a lesiones iniciales o su ausencia). Esto sugiere que, bajo nuestras condiciones experimentales, la L-Arg *per se* no tiene propiedades antioxidantes, o que la dosis de este aminoácido no haya sido la adecuada para dicha acción. En este sentido, algunos estudios han encontrado respuesta antioxidant cuando la Arg es coadministrada con un antioxidante, o cuando se administra con la citrulina, precursor de la Arg, pues se ha descrito que el reciclaje de L-citrulina a L-Arg en las células endoteliales podría ser el principal mecanismo para mantener la disponibilidad de la L-Arg para la producción de NO por parte de la eNOS (Solomonson y col., 2003). Así, Hayashi y col., en 2005, encontraron que la administración de L-Arg, L-citrulina y/o antioxidantes (vitamina C y E) durante 12 semanas en conejos alimentados con una dieta enriquecida con colesterol, ocasionó una mejoría en la vasorelajación dependiente del endotelio, del flujo sanguíneo, regresión de lesiones ateroscleróticas, disminución en la producción de anión superóxido y de la expresión de genes sensibles a la oxidación, lo cual estuvo asociada con el incremento de la expresión de la eNOS aórtica y de los niveles de NO y GMPC, lo cual indica que la suplementación con sustancias que potencian la producción de NO, como la L-Arg, L-citrulina y antioxidantes puede contrarrestar el estrés oxidativo y revertir la progresión de la aterosclerosis, por lo que, el posible mecanismo antiaterogénico de la suplementación combinada de la L-Arg con la citrulina y antioxidantes se deba al incremento de la producción de NO mediante el aumento en la expresión de la eNOS, y a un aumento en la disponibilidad del sustrato (L-Arg) para la eNOS. Asimismo, Morita y col. (2013), encontraron que la administración oral de L-citrulina (800 mg/día) en pacientes con angina vaso-

espástica, durante 8 semanas, ocasionó una disminución significativa de los niveles de ADMA, de LDLox y del receptor tipo 1 de LDLox similar a lectina (LOX-1); y un aumento de la relación L-Arg/ADMA y de los niveles de NO con respecto a sus valores basales; lo que sugiere que la suplementación con L-citrulina, mejora la disfunción endotelial, probablemente potenciando las reacciones dependientes de NO y disminuyendo el estrés oxidativo. Asimismo, Reule y col., 2017, encontraron que la administración durante 4 semanas de Arg y vitaminas (pycnogenol, vitamina B6 y B12 y ácido fólico) en sujetos hipertensos y con hiperhomocisteinemia, mejoró la función endotelial, la presión arterial y los niveles de homocisteína con respecto al grupo placebo.

Por lo tanto, la L-Arg promueve efectos beneficiosos mediante funciones mediadas por el endotelio, como el aumento de la vasodilatación, disminución de la agregación plaquetaria, y la reducción de la adhesión de monocito al endotelio vascular; sin embargo, la eficacia del mismo parece estar relacionada con la presencia de patología (aumento de concentraciones ADMA), y el estadio de la misma (más efectivo en las primeras fases de la enfermedad CDV y metabólica) cuando los cambios funcionales aún son reversibles, mientras que los cambios ateroscleróticos estructurales de la pared vascular pueden ser menos sensibles a la L-Arg. Por lo tanto, la L-arginina tiene un papel como agente nutracéutico en la modificación del deterioro funcional y en la prevención de enfermedades vasculares, pero no como terapia para revertir la aterosclerosis manifiesta (Böger, 2007).

En conclusión, bajo nuestras condiciones experimentales y de acuerdo con los

resultados obtenidos, nuestros hallazgos refuerzan que la ADMA y el NO son marcadores de disfunción endotelial que se encuentran alterados en la aterosclerosis (aumento y reducción, respectivamente); y que su determinación podría ser una herramienta útil en el seguimiento y pronóstico de esta patología. Asimismo, se demostró que la suplementación con L-Arg podría ser útil para disminuir los niveles de ADMA y aumentar los de NO, posiblemente mejorando la disfunción endotelial.

Conflictos de interés

Los autores declaran que no existe conflicto de interés.

Referencias Bibliográficas

- Antoniades C, Shirodaria C, Leeson P, Antonopoulos A, Warrick N, Van-Assche T, Cunningham C, Tousoulis D, Pillai R, Ratnatunga C, Stefanidis C, Channon KM. 2009. Association of plasma asymmetrical dimethylarginine (ADMA) with elevated vascular superoxide production and endothelial nitric oxide synthase uncoupling: implications for endothelial function in human atherosclerosis. *Eur Heart J* 30(9):1142-50.
- Appel D, Böger R, Windolph J, Heinze G, Goetz AE, Hannemann J. 2020. Asymmetric dimethylarginine predicts perioperative cardiovascular complications in patients undergoing medium-to-high risk non-cardiac surgery. *J Int Med Res* 48(8):300060520940450.
- Aslan D. 2011. Biomarkers for diabetic complications: The results of several clinical studies. *J Med Biochem* 30: 207-21.
- Boger R, Bode-Boger S, Brandes R, Phivthong-Ngam L, Böhme M, Nafe R, Mügge A, Frölich J. 1997. Dietary L-arginine reduces the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits: Comparison with lovastatin. *Circulation* 96:1282-90.
- Boger R, Bode-Boger S, Mugge A, Kienke S, Brandes R, Dwenger A, Frölich J. 1995. Supplementation of hypercholesterolaemic rabbits with L-arginine reduces the vascular release of superoxide anions and restores NO production. *Atherosclerosis* 117:273-84.

- Böger R. 2007. The Pharmacodynamics of L-Arginine. *J Nutr* 137: 1650S-5S.
- Böger RH, Bode-Böger SM, Kienke S, Stan AC, Nafe R, Frölich JC. 1998. Dietary L-arginine decreases myointimal cell proliferation and vascular monocyte accumulation in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 136(1):67-77.
- Böger RH, Sullivan LM, Schwedhelm E, Wang TJ, Maas R, Benjamin EJ, Schulze F, Xanthakis V, Benndorf RA, Vasan RS. 2009. Plasma asymmetric dimethylarginine and incidence of cardiovascular disease and death in the community. *Circulation* 119(12):1592-600.
- Böger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, Tsikas D, Bode-Böger SM. 2000. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res* 87(2):99-105.
- Böger RH. 2004. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor. *J Nutr* 134(10 Suppl):2842S-2847S.
- Brinkmann SJ, Wörner EA, Buijs N, Richir M, Cynober L, van Leeuwen PA, Couderc R. 2015. The Arginine/ADMA ratio is related to the prevention of atherosclerotic plaques in hypercholesterolemic rabbits when giving a combined therapy with atorvastatin and arginine. *Int J Mol Sci* 16(6):12230-42.
- Cao X, Wu VWY, Han Y, Hong H, Wu Y, Kong APS, Lui KO, Tian XY. 2024. Role of argininosuccinate synthase 1 -dependent L-arginine biosynthesis in the protective effect of endothelial Sirtuin 3 against atherosclerosis. *Adv Sci (Weinh)* 11(12):e2307256.
- Chen PY, St John PL, Kirk KA, Abrahamson DR, Sanders PW. 1993. Hypertensive nephrosclerosis in the Dahl/Rapp rat. Initial sites of injury and effect of dietary L-arginine supplementation. *Lab Invest* 68(2):174-84.
- Chen S, Li N, Deb-Chatterji M, Dong Q, Kielstein J, Weissenborn K, Worthmann H. 2012. Asymmetric dimethylarginine as a marker and mediator in ischemic stroke. *Int J Mol Sci* 13:15983-6004.
- Chin JH, Azhar S, Hoffman BB. 1992. Inactivation of endothelial derived relaxing factor by oxidized lipoproteins. *J Clin Invest* 89: 10-18.
- Clarkson P, Adams M, Powe A, Donald A, McCredie R, Robinson J, McCarthy S, Keech A, Celermajer D, Deanfield J. 1996. Oral L-arginine improves endothelium-dependent dilation in hypercholesterolemic young adults. *J Clin Investig* 97:1989-94.
- Das UN, Repossi G, Dain A, Eynard AR. 2011. L-arginine, NO and asymmetrical dimethylarginine in hypertension and type 2 diabetes. *Front Biosci (Landmark Ed)* 16(1):13-20.
- De Gennaro Colonna V, Bonomo S, Ferrario P, Bianchi M, Berti M, Guazzi M, Manfredi B, Muller EE, Berti F, Rossoni G. 2007. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) induces vascular endothelium impairment and aggravates post-ischemic ventricular dysfunction in rats. *Eur J Pharmacol* 557: 178-85.
- Dong JY, Qin LQ, Zhang Z, Zhao Y, Wang J, Arigoni F, Zhang W. 2011. Effect of oral L-arginine supplementation on blood pressure: a meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *Am Heart J* 162(6):959-65.
- Dowsett L, Higgins E, Alanazi S, Alshuwayer NA, Leiper FC, Leiper J. 2020. ADMA: A Key Player in the Relationship between Vascular Dysfunction and Inflammation in Atherosclerosis. *J Clin Med* 9(9):3026.
- Figueira L, González J. 2008. Efecto del extracto de *Pinus maritime*, Vitamina C y E, sobre la concentración sérica de LDLox, PCR, Selectina-E, IL-6 y formación de ateromas en conejos con dieta hiperlipidémica. *Informe Médico* 10 (10): 593-607.
- Figueira L, González J. 2018. Efecto del resveratrol sobre las concentraciones séricas del factor de crecimiento endotelial vascular durante la atherosclerosis. *Clin Investig Arterioscler* 30(5):209-216.
- Figueira L, González J. 2020. Efecto del resveratrol sobre quimioquinas séricas en la atherosclerosis. *Rev Fac Farm UCV* 83(1,2):7-23.
- Figueira L, González J. 2022. Efecto antiinflamatorio y antioxidante del resveratrol en la atherosclerosis. Papel de la molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria 1. *Rev Fac Farma UCV* 85(1,2): 51-66.
- Figueira L, González J. 2023. Papel del receptor de lipoproteína de baja densidad oxidado tipo lectina-1 como marcador sérico de atherosclerosis. *Rev Fac Farmacia* 86 (1,2):93-105.
- Figueira L, González J. 2024. La dimetilarginina asimétrica y el óxido nítrico en la atherosclerosis. Su papel como marcador sérico de la atherosclerosis. *Rev Fac Farm* 87(1,2): 50-61.
- Franceschelli S, Ferrone A, Pesce M, Riccioni G, Speranza L. 2013. Biological functional relevance of asymmetric dimethylarginine

- (ADMA) in cardiovascular disease. *Int J Mol Sci* 14(12):24412-21.
- Furuki K, Adachi H, Enomoto M, Otsuka M, Fukami A, Kumagae S, Matsuoka H, Nanjo Y, Kakuma T, Imaizumi T. 2008. Plasma level of asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a predictor of carotid intima-media thickness progression: Six-Year prospective study using carotid ultrasonography. *Hypertens Res* 31:1185-9.
- Furuki K, Adachi H, Matsuoka H, Enomoto M, Satoh A, Hino A, Hirai Y, Imaizumi T. 2007. Plasma levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA) are related to intima-media thickness of the carotid artery: An epidemiological study. *Atherosclerosis* 191:206-10.
- Gimbrone MA Jr, García-Cerdeña G. 2013. Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol* 22(1):9-15.
- González J, Figueira L, Reigosa A. 2008. Selectina-E, VCAM-1, FNT- α , IL-6, PCR y Fibrinógeno plasmático como marcadores de inflamación en la aterosclerosis, en conejos machos Nueva Zelanda, expuestos a una dieta hiperlipidémica. *Salus* 12 (2): 50-57.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. 1982. Analysis of nitrate, nitrite and (15N) nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131-138.
- Hayashi T, Juliet PA, Matsui-Hirai H, Miyazaki A, Fukatsu A, Funami J, Iguchi A, Ignarro LJ. 2005. L-Citrulline and L-arginine supplementation retards the progression of high-cholesterol-diet-induced atherosclerosis in rabbits. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(38):13681-6.
- Hernández-Perera O, Lamas S. 1998. Disfunción endotelial en la aterosclerosis: Papel protector de las estatinas. *Nefrología* XVIII (1):100-11.
- Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. 2009. Endothelial Function and Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Circ J* 73: 411-418.
- Higashi Y, Oshima T, Watanabe M, Matsuura H, Kajiyama G. 1996. Renal response to L-arginine in salt-sensitive patients with essential hypertension. *Hypertension* 27(3 Pt 2):643-8.
- Ignarro L, Napoli C. 2004. Novel features of nitric oxide, endothelial nitric oxide synthase, and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 6(4):281-7.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wei LH, Bauer PM, Wu G, del Soldato P. 2001. Role of the arginine-nitric oxide pathway in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 27:98(7):4202-8.
- Kielstein JT, Impraim B, Simmel S, Bode-Böger SM, Tsikas D, Fröhlich JC, Hooper MM, Haller H, Fliser D. 2004. Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation* 109: 172-7.
- Kobayashi K, Akishita M, Yu W, Hashimoto M, Ohni M, Toba K. 2004. Interrelationship between non-invasive measurements of atherosclerosis: Flow-mediated dilation of brachial artery, carotid intima-media thickness and pulse wave velocity. *Atherosclerosis* 173:13-8.
- Konishi H, Sydow K, Cooke JP. 2007. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase promotes endothelial repair after vascular injury. *J Am Coll Cardiol* 49(10):1099-105.
- Konya H, Miuchi M, Satani K, Matsutani S, Tsunoda T, Yano Y, Katsuno T, Hamaguchi T, Miyagawa J, Namba M. 2014. Hepatocyte growth factor, a biomarker of macroangiopathy in diabetes mellitus. *World J Diabetes* 5:678-688.
- Konya H, Miuchi M, Satani K, Matsutani S, Yano Y, Tsunoda T, Ikawa T, Matsuo T, Ochi F, Kusunoki Y, Tokuda M, Katsuno T, Hamaguchi T, Miyagawa J, Namba M. 2015. Asymmetric dimethylarginine, a biomarker of cardiovascular complications in diabetes mellitus. *World J Exp Med* 5(2):110-9.
- Krause M, Rodrigues-Krause J, O'Hagan C, De Vito G, Boreham C, Susta D, Newsholme P, Murphy C. 2012. Differential nitric oxide levels in the blood and skeletal muscle of type 2 diabetic subjects may be consequences of adiposity: a preliminary study. *Metabolism* 61(11):1528-37.
- Lee J, Ha SJ, Park J, Kim YH, Lee NH, Kim YE, Hong YS, Song KM. 2020. *Arctium lappa* root extract containing L-arginine prevents TNF- α -induced early atherosclerosis *in vitro* and *in vivo*. *Nutr Res* 77:85-96.
- Lekakis JP, Papathanassiou S, Papaioannou TG, Papamichael CM, Zakopoulos N, Kotsis V, Dagre AG, Stamatelopoulos K, Protogerou A, Stamatelopoulos SF. 2002. Oral L-arginine improves endothelial dysfunction in patients with essential hypertension. *Int J Cardiol* 86(2-3):317-23.
- Liao J, Shin W, Lee W, Clark S. 1995. Oxidized LDL decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 270: 319-24.
- Morita M, Sakurada M, Watanabe F, Yamasaki T, Doi H, Ezaki H, Morishita K, Miyakex T. 2013. Effects of Oral L-Citrulline Supplementation on Lipoprotein Oxidation and Endothelial Dysfunction in Humans with Vasospastic Angina.

- Immunol Endocr Metab Agents Med Chem 13(3):214-20.
- Mortensen KM, Itenov TS, Stensballe J, Hillig T, Jensen CAJ, Schønemann-Lund M, Bestle MH. 2024. Changes in nitric oxide inhibitors and mortality in critically ill patients: A cohort study. Ann Intensive Care 14(1):133.
- Napoli C, Williams-Ignarro S, De Nigris F, Lerman LO, Rossi L, Guarino C, Mansueto G, Di Tuoro F, Pignalosa O, De Rosa G, Sica V, Ignarro LJ. 2004. Long-term combined beneficial effects of physical training and metabolic treatment on atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. Proc Natl Acad Sci USA 101(23):8797-802.
- Newsholme P, Homem D, De Vito G, Murphy C, Krause M. 2009. Exercise and possible molecular mechanisms of protection from vascular disease and diabetes: the central role of ROS and nitric oxide. Clin Sci (Lond.) 118:341-9.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Rev Anal Biochem 95(2):351-8.
- Papageorgiou N, Theofilis P, Oikonomou E, Lazaros G, Sagris M, Tousoulis D. 2023. Asymmetric Dimethylarginine as a Biomarker in Coronary Artery Disease. Curr Top Med Chem 23(6):470-480.
- Poeggeler B, Singh SK, Sambamurti K, Pappolla MA. 2023. Nitric Oxide as a Determinant of Human Longevity and Health Span. Int J Mol Sci 24(19):14533.
- Raghavan SA, Dikshit M. 2001. L-citrulline mediated relaxation in the control and lipopolysaccharide-treated rat aortic rings. Eur J Pharmacol 431(1):61-9.
- Rasmussen C, Moinard C, Martin C, Tricotet V, Cynober L, Couderc R. 2007. L-arginine plus atorvastatin for prevention of atheroma formation in genetically hypercholesterolaemic rabbits. Br J Nutr 97:1083-9.
- Reule CA, Goyaerts B, Schoen C. 2017. Effects of an L-arginine-based multi-ingredient product on endothelial function in subjects with mild to moderate hypertension and hyperhomocysteinaemia - a randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. BMC Complement Altern Med 17(1):92.
- Rodrigues-Krause J, Krause M, Rocha IMGD, Umpierre D, Fayh APT. 2018. Association of L-Arginine Supplementation with Markers of Endothelial Function in Patients with Cardiovascular or Metabolic Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis. Nutrients 11(1):15.
- Solomonson LP, Flam BR, Pendleton LC, Goodwin BL, Eichler DC. 2003. The caveolar nitric oxide synthase/arginine regeneration system for NO production in endothelial cells. J Exp Biol 206(Pt 12):2083-7.
- Stary H, Chandler A, Dinsmore R, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfield M, Schwartz C, Wagner W, Wesler R. 1995. 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. Am Heart Asso. Circulation 15:1512-31.
- Suda O, Tsutsui M, Morishita T, Tasaki H, Ueno S, Nakata S, Tsujimoto T, Toyohira Y, Hayashida Y, Sasaguri Y, Ueta Y, Nakashima Y, Yanagihara N. 2004. Asymmetric dimethylarginine produces vascular lesions in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice: involvement of renin-angiotensin system and oxidative stress. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24(9):1682-8.
- Sun T, Zhou WB, Luo XP, Tang YL, Shi HM. 2009. Oral L-arginine supplementation in acute myocardial infarction therapy: a meta-analysis of randomized controlled trials. Clin Cardiol 32(11):649-52.
- Sydw K, Müntzel T. 2003. ADMA and oxidative stress. Atheroscler Suppl 4(4):41-51.
- Sydw K, Schwedhelm E, Arakawa N, Bode-Böger SM, Tsikas D, Hornig B, Frölich JC, Böger RH. 2003. ADMA and oxidative stress are responsible for endothelial dysfunction in hyperhomocyst(e)inemia: Effects of L-arginine and B vitamins. Cardiovasc Res 57(1):244-52.
- Teerlink T, Luo Z, Palm F, Wilcox CS. 2009. Cellular ADMA: regulation and action. Pharmacol Res 60(6):448-60.
- Vassalle C, Bianchi S, Bianchi F, Landi P, Battaglia D, Carpeggiani C. 2012. Oxidative stress as a predictor of cardiovascular events in coronary artery disease patients. Clin Chem Lab Med 50(8):1463-8.
- Vilcea A, Borta SM, Popești RO, Alexandra RL, Pilat L, Nica DV, Pușchiță M. 2024. High ADMA Is Associated with Worse Health Profile in Heart Failure Patients Hospitalized for Episodes of Acute Decompensation. Medicina (Kaunas) 60(5):813.
- Visser M, Paulus WJ, Vermeulen MA, Richir MC, Davids M, Wisselink W, de Mol BA, van Leeuwen PA. 2010. The role of asymmetric dimethylarginine and

- arginine in the failing heart and its vasculature. Eur J Heart Fail 12(12):1274-81.
- Wang X, He B. 2024. Endothelial dysfunction: molecular mechanisms and clinical implications. MedComm 5(8):e651.
- Wilcox CS. 2012. Asymmetric dimethylarginine and reactive oxygen species: unwelcome twin visitors to the cardiovascular and kidney disease tables. Hypertension 59(2):375-81.
- Xiao HB, Yang ZC, Jia SJ, Li NS, Jiang DJ, Zhang XH, Guo R, Zhou Z, Deng HW, Li YJ. 2007. Effect of asymmetric dimethylarginine on atherosclerosis and erythrocyte deformability in apolipoproteinE-deficient mice. Life Sci 81(1):1-7.
- Zeller M, Korandji C, Guilland JC, Sicard P, Vergely C, Lorgis L, Beer JC, Duvillard L, Lagrost AC, Moreau D, Gambert P, Cottin Y, Rochette L. 2008. Impact of asymmetric dimethylarginine on mortality after acute myocardial infarction. Arterioscler Thromb Vasc Biol 28(5):954-60.
- Zhou MS, Kosaka H, Tian RX, Abe Y, Chen QH, Yoneyama H, Yamamoto A, Zhang L. 2001. L-Arginine improves endothelial function in renal artery of hypertensive Dahl rats. J Hypertens 19(3):421-9.