



La dimetilarginina asimétrica y el óxido nítrico en la Aterosclerosis. Su papel como marcador sérico de la aterosclerosis

Asymmetric dimethylarginine and nitric oxide in atherosclerosis.

Role as a serum marker of atherosclerosis

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

Resumen

La dimetilarginina asimétrica (ADMA) es un inhibidor competitivo de la sintasa de óxido nítrico (NOS); por lo que inhibe la formación de óxido nítrico (NO). Esta molécula se le ha implicado como un factor de riesgo para la disfunción endotelial, la cual es relevante en la fisiopatología de la aterosclerosis. En el presente estudio se evaluó los niveles séricos de ADMA, NO y los productos de peroxidación lipídica que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) y su evolución en el tiempo en conejos alimentados con dieta enriquecida con colesterol. Para ello, 42 conejos machos Nueva Zelanda fueron divididos en dos grupos durante 12 semanas: Grupo 1 (control): Conejarina. Grupo 2: Conejarina suplementada con 0,5% p/p de colesterol. Se realizaron determinaciones séricas de colesterol y sus fracciones, ADMA, NO y TBARS al inicio, 4ta, 8va y 12ma semana de experimentación. 7 conejos de cada grupo fueron sacrificados a la 4ta, 8va y 12ma semana y se realizó estudio histológico de su aorta. Se encontró un aumento en los niveles séricos de ADMA y TBARS, y disminución del NO en el grupo 2 desde la 4ta semana de experimentación con respecto al control (Grupo 1) ($p < 0,005$); lo cual se vio acompañado de ateromas. En conclusión, la ADMA, NO y TBARS son marcadores séricos no invasivos de aterosclerosis; sugiriendo el papel del estrés oxidativo en la fisiopatología de esta enfermedad.

Palabras clave: Dimetilarginina asimétrica, óxido nítrico, sintasa de óxido nítrico, estrés oxidativo, aterosclerosis

Abstract

Asymmetric dimethylarginine (ADMA) is a competitive inhibitor of nitric oxide synthase (NOS); therefore, it inhibits the formation of nitric oxide (NO). This molecule has been implicated as a risk factor for endothelial dysfunction and is involved in atherosclerosis. We evaluated the serum levels of ADMA, NO, and thiobarbituric acid-reactive lipid peroxidation products (TBARS) during the progression and evolution of atherosclerosis and its evolution over time in rabbits fed with a cholesterol diet. 42 New Zealand white male rabbits were randomly divided into two groups that received for 12 weeks: Group 1 (control): Standard diet (commercial rabbit food). Group 2: Cholesterol diet (0.5% cholesterol). Blood samples of overnight-fasted rabbits were collected in the basal, fourth, eighth, and twelfth weeks, and the concentration of lipid profile, ADMA, NO, and TBARS were determined. Seven of the animals from each group were sacrificed on the fourth, eighth, and twelfth week, and the aorta was dissected for histological studies. Our findings demonstrated that the ADMA and TBARS levels were significantly higher, and NO levels were lower in Group 2 than in Group 1 since the 4th week ($p < 0.005$), which was accompanied by atherosclerotic lesions. These results support that serum ADMA, NO and TBARS levels are markers noninvasive of atherosclerosis. Likewise, oxidative stress is important for atherosclerosis.

Keywords: Asymmetric dimethylarginine, nitric oxide, nitric oxide synthase, oxidative stress, 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.2024.87.1-2.4](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2024.87.1-2.4)
Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 13/06/2024

Aprobación: 18/06/2024

Rev. Fac. Farmacia 87(1y2): 48-61. 2024

Introducción

La aterosclerosis es una enfermedad inmunoinflamatoria crónica caracterizada por un engrosamiento secuencial y focal de la íntima arterial, que afecta principalmente a arterias de mediano y gran calibre, y en la que están implicados varios tipos de células y lípidos (Kong y col., 2022). Este proceso se caracteriza por una interacción dinámica entre células inflamatorias, citocinas y quimioquinas en la pared arterial. La característica más resaltante de esta enfermedad es el engrosamiento de la pared arterial debido a la acumulación de lípidos y tejido conectivo en proporción variable y la concomitante reducción en el diámetro del lumen vascular (Jebari-Benslaiman y col., 2022); por lo tanto, la aterosclerosis es una enfermedad progresiva que se caracteriza por la presencia de placas fibroadiposas en la íntima arterial que puede llegar a obstruir el lumen de las arterias comprometiendo la funcionalidad circulatoria (Gusev y col., 2023).

La integridad de la barrera endotelial juega un papel importante en el mantenimiento del equilibrio entre la circulación y los tejidos; y en la homeostasis vascular. Algunos estudios han demostrado asociación entre la disfunción endotelial y la subsecuente elevación de factores endoteliales y el desarrollo e intensificación de la enfermedad de las arterias coronarias y aterosclerosis (Shao y col., 2020).

La disfunción endotelial puede definirse como un desequilibrio en la biodisponibilidad de sustancias activas de origen endotelial que predispone a la inflamación, la vasoconstricción y el incremento de la permeabilidad vascular, y que puede facilitar la aterogénesis, agregación plaquetaria y trombosis. En

las últimas décadas se ha demostrado que factores de riesgo coronario bien conocidos como el colesterol asociado a las lipoproteínas de baja densidad (c-LDL), el tabaquismo, la diabetes, la hipertensión, y otros factores como el estrés oxidativo producen disfunción endotelial (Gimbrone y col., 2016); siendo ésta el paso inicial en la patogénesis de la aterosclerosis y las enfermedades cardiovasculares (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 la progresión de la aterosclerosis, lo cual resulta en una disminución de los eventos cardíacos (Higashi y col., 2009; Batty y col., 2022).

Diversos investigadores han reportado los posibles mecanismos que intervienen en la disfunción endotelial, entre los que se incluye el incremento en agentes vasoconstrictores como la angiotensina II (Ang II), endotelina-1 y norepinefrina; inactivación del óxido nítrico (NO) por especies reactivas de oxígeno (ROS), entre otros; por lo que la evidencia sugiere la existencia de una interacción entre el estrés oxidativo y la función endotelial; ya que el incremento en la producción de ROS y la atenuación de los sistemas de defensa antioxidante podrían contribuir al daño endotelial en las enfermedades CDV (Cai y col., 2000). Por otra parte, los sistemas de defensa antioxidante tales como, la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa, degradan las ROS en la vasculatura, lo cual resulta en una inhibición en la degradación del NO (Higashi y col., 2009; Dri y col., 2023).

El NO es un poderoso vasodilatador producido por el endotelio que juega un

papel muy importante en la regulación del tono vascular, en la supresión de la proliferación de las células de músculo liso vascular, en la inhibición de la agregación plaquetaria y adhesión de los leucocitos al endotelio (Lüscher, 1990). El NO se genera en las células a través de la oxidación del aminoácido L-arginina (L-Arg) con oxígeno molecular, siendo el coproducto de esta reacción biológica la L-citrulina. Esta reacción está catalizada por un grupo de enzimas, la sintasa de NO (NOS), que requiere para su actividad múltiples cofactores, entre los que se incluyen la tetrahidrobiopterina (BH4) (Taddei y col., 2003).

Diversa evidencia ha señalado que el NO es una molécula endógena antiaterogénica, pues es capaz de inhibir la adhesividad y agregación plaquetaria, la adherencia y quimiotaxis de los monocitos y la proliferación de las células musculares lisas del vaso; procesos celulares que están intrínsecamente relacionados con el desarrollo de la aterogénesis (Creager y col., 1992, Nappi y col., 2022).

Por su parte, la dimetilarginina asimétrica (ADMA) es un análogo de la L-Arg que inhibe la síntesis del NO debido a que compite con este aminoácido por el sitio activo de la NOS. Además de inhibir la formación de NO, la ADMA puede desacoplar a la NOS lo cual lleva a la generación de superóxido. Se ha sugerido que la ADMA puede contribuir al estrés oxidativo al desacoplar la NOS endotelial (eNOS) a través del agotamiento de la 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. Sin embargo, no está claro si la incrementada producción de ROS es responsable de los niveles elevados de ADMA o si la incrementada producción de ADMA contribuye al estrés oxidativo (Ghebremariam y col., 2013).

La ADMA se le ha implicado como un factor de riesgo para la disfunción endotelial y la enfermedad coronaria pues se ha encontrado niveles elevados de ADMA en condiciones caracterizadas por disfunción endotelial como la hipertensión, hipercolesterolemia, hiperglicemia e insuficiencia renal (Franceschelli y col., 2013). Asimismo, se ha descrito que la ADMA puede inducir inflamación vascular induciendo el desarrollo de enfermedades CDV mediante la activación de la adhesión de leucocitos y la producción de citocinas (Zuccalá y col., 2005); por lo que la ADMA no es únicamente un factor de riesgo para la disfunción endotelial, sino que se comporta como un mediador proinflamatorio y oxidativo (Franceschelli y col., 2013). Sin embargo, a pesar de que está bien documentado que el NO y ADMA participa en la fisiopatología de la aterosclerosis, no está clara su evolución a lo largo del proceso aterogénico; es por ello que en el presente estudio se evaluó los niveles séricos de NO y ADMA como marcador de aterosclerosis y su evolución en el tiempo en conejos alimentados con dieta enriquecida con colesterol.

Materiales y Métodos

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Se emplearon 42 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 dos grupos de 21 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.

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 hipercolesterolémica: 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 en las semanas 0, 4^{ta}, 8^{va} y 12^{ma}, 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 ROS sobre los lípidos, que resulta en la producción de varias sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico y que pueden ser medidas por espectrofotometría (Ohkawa y col., 1979).

SACRIFICIO DE LOS ANIMALES. PREPARACIÓN DE TEJIDOS Y TIPIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LAS LESIONES ATROSCLERÓTICAS

Se sacrificaron por dislocación cervical 7 conejos de cada grupo a la 0, 4^{ta}, 8^{va} semana y al final del estudio. 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 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 estadístico 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 Kruskal-Wallis con análisis *post hoc* mediante la prueba de U- de Mann-Whitney sobre cada par de grupos. Se empleó la correlación de Spearman para relacionar el NO y ADMA con las variables del estudio. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$. Se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5.

Resultados

PERFIL LIPÍDICO DE LOS CONEJOS

Como se puede apreciar en la Tabla I, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones séricas basales de los lípidos séricos entre los grupos de conejos sujetos a estudio. El CT y sus fracciones en el grupo 1 permanecieron sin cambios significativos a lo largo del estudio. Sin embargo, en la 4^{ta}, 8^{va} y 12^{ma} semana de experimentación se observó un aumento significativo en la concentración de CT, c-HDL y c-LDL en el grupo 2 con respecto al grupo 1 ($p < 0,0001$). Para el

Tabla I.
Lípidos séricos de los conejos
sujetos a estudio

	CT (mg/dL)	c-LDL (mg/dL)	c-HDL (mg/dL)
Basal			
Grupo 1	68 ± 17	35 ± 11	30 ± 9
Grupo 2	65 ± 19	40 ± 10	36 ± 11
4^{ta} semana			
Grupo 1	70 ± 16	37 ± 13	35 ± 12
Grupo 2	295 ± 79*	240 ± 51*	59 ± 17*
8^{va} semana			
Grupo 1	75 ± 16	44 ± 10	36 ± 13
Grupo 2	801 ± 168*	681 ± 93*	76 ± 32*
12^{ma} semana			
Grupo 1	82 ± 19	47 ± 12	36 ± 11
Grupo 2	1119 ± 253*	899 ± 127*	79 ± 38*
Valores p			
Grupo 1	0,9258	0,9575	0,9725
Grupo 2	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.

ρ= Comparación con respecto a su basal.

grupo 2 las concentraciones de los lípidos variaron desde el inicio hasta el final del experimento ($p < 0,0001$).

CONCENTRACIONES SÉRICAS DE ADMA, NO Y TBARS

Como se puede apreciar en las Figuras 1-3, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles séricos basales de ADMA, NO y TBARS entre los grupos de conejos sujetos a estudio. De igual manera, dichas variables en el grupo 1 permanecieron sin cambios a lo largo del experimento; por su parte, en el grupo 2 variaron a lo largo del estudio ($p < 0,0001$). En la 4^{ta}, 8^{va} y al final del

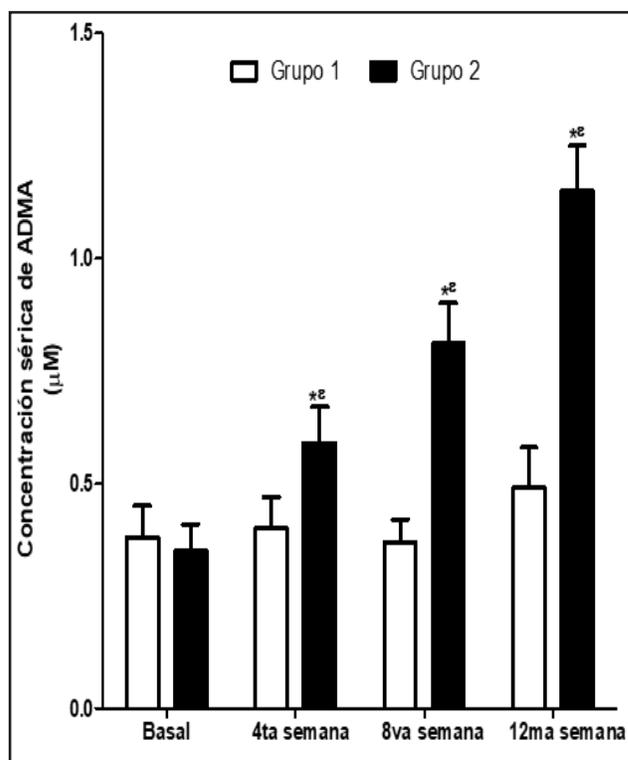


Figura 1. Concentraciones séricas de ADMA en los conejos sujetos a experimentación en la semana 0, 4^{ta}, 8^{va} y 12^{ma}. Los resultados fueron expresados como la media ± desviación estándar de la media ($n=42$ basal y 4^{ta} semana; $n=28$ en la 8^{va} semana; $n=14$ en la 12^{ma} semana). * $p < 0,005$ vs. grupo control (Grupo 1). ρ $p < 0,0001$ vs. su respectivo valor basal.

experimento las concentraciones séricas de NO disminuyeron, y las de ADMA y TBARS aumentaron en el grupo 2 con respecto al grupo 1 y con respecto a sus valores basales ($p < 0,005$).

En la Tabla II se muestra el análisis de Spearman de las correlaciones entre la concentración de ADMA, NO, TBARS y los lípidos séricos, evidenciando correlación positiva significativa entre la ADMA con TBARS y con el perfil lipídico, e inversa con el NO; y del NO con TBARS ($p < 0,0001$).

ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LA AORTA

En la Tabla III se presenta la distribución de los conejos según el máximo grado de aterosclerosis encontrado en los cortes de aorta,

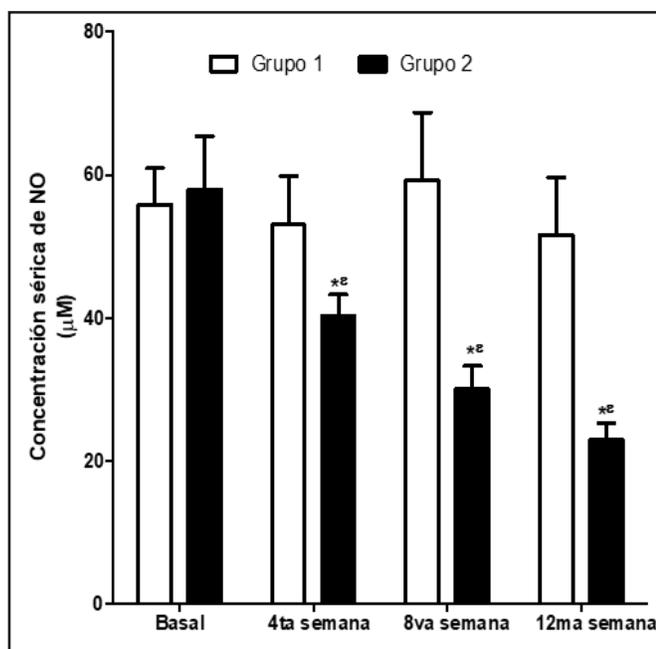


Figura 2. Concentraciones séricas de NO en los conejos sujetos a experimentación en la semana 0, 4^{ta}, 8^{va} y 12^{ma}. Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar de la media (n=42 basal y 4^{ta} semana; n=28 en la 8^{va} semana; n=14 en la 12^{ma} semana). *p<0,005 vs. grupo control (Grupo 1). **p<0,0001 vs. su respectivo valor basal.

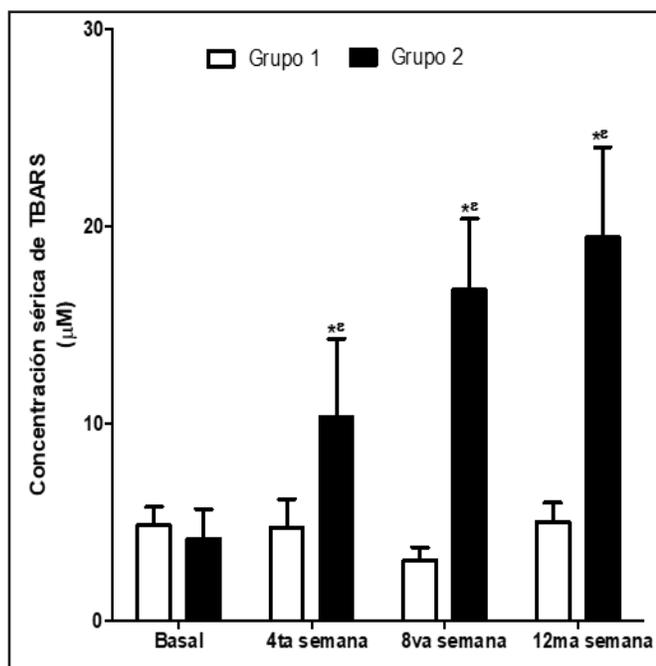


Figura 3. Concentraciones séricas de TBARS en los conejos sujetos a experimentación en la semana 0, 4^{ta}, 8^{va} y 12^{ma}. Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar de la media (n=42 basal y 4^{ta} semana; n=28 en la 8^{va} semana; n=14 en la 12^{ma} semana). *p<0,005 vs. grupo control (Grupo 1). **p<0,0001 vs. su respectivo valor basal.

evidenciando que ningún conejo del grupo 1 presentó lesiones ateroscleróticas a lo largo del estudio. Por su parte, los conejos del grupo 2 presentaron lesiones de grado intermedio y avanzado al finalizar el estudio (Figura 4).

Discusión

Durante las últimas décadas diversos estudios han examinado el papel del estrés oxidativo sobre la aterogénesis (Madamanchi y col., 2005). De acuerdo, a la teoría del estrés oxidativo, la aterosclerosis es el resultado de las modificaciones oxidativas de las LDL en la pared arterial por las ROS. La evidencia sugiere que factores de riesgo para la aterosclerosis como la hipercolesterolemia, diabetes mellitus, hipertensión arterial, tabaquismo y edad, incrementan la producción de ROS (Vogiatzi y col., 2009). Asimismo, diversos procesos son disparados por estos factores de riesgo, como la expresión de moléculas de adhesión celular, la proliferación y migración de células de músculo liso, apoptosis de las células endoteliales, oxidación de lípidos, activación de metaloproteinasas de matriz extracelular y la alteración de la actividad vasomotora (Vogiatzi y col., 2009).

Se ha demostrado ampliamente que la función endotelial se encuentra alterada desde los estadios más tempranos de la aterosclerosis; de hecho, se cree que la producción de ROS induce la disfunción endotelial, paso inicial de la aterogénesis; puesto que el estrés oxidativo conlleva la oxidación de las LDL y la expresión de genes inflamatorios redox sensibles.

Tabla II.

Análisis de la correlación de Spearman entre las concentraciones de ADMA, NO, TBARS y los lípidos séricos

	r	p
ADMA & CT	0,3726	0,0001
ADMA & c-LDL	0,3026	0,0001
ADMA & c-HDL	0,1597	0,0001
ADMA & NO	-0,6188	0,0001
ADMA & TBARS	0,5752	0,0001
NO & TBARS	-0,4265	0,0001

ADMA: Dimetilarginina asimétrica, c-HDL: Colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad, c-LDL: Colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad, CT: Colesterol total, NO: Óxido nítrico, TBARS: Productos de peroxidación lipídica que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico.

Todos estos cambios inducen la alteración en la estructura y función de las células endoteliales y contribuyen a la iniciación de la aterosclerosis (Vogiatzi col., 2009).

Las ROS median muchos efectos en la pared de los vasos sanguíneos, entre los que se incluyen la disfunción endotelial así como la migración, crecimiento y apoptosis de las células de músculo liso. Se ha observado que la producción de anión superóxido y otras ROS están incrementados en arterias en varias condiciones CDV, lo cual sugiere que el estrés oxidativo juega un papel muy importante en la fisiopatología de la aterosclerosis, hipertensión y otras enfermedades CDV (Griendling y col., 2000).

El NO es un potente vasodilatador que tiene una importante acción en el mantenimiento de la homeostasis vascular, mediante sus efectos antiaterogénicos y anti proliferativos sobre la pared vascular (Franceschelli y col., 2013). Esta molécula vasoprotectora ha sido implicada en la

Tabla III.

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
4^{ta} semana						
1	7 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
2	1 (14%)	3 (43%)	3 (43%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
8^{va} semana						
1	7 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
2	0 (0%)	0 (0%)	2 (29%)	3 (42%)	2 (29%)	0 (0%)
12^{ma} semana						
1	7 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (43%)	4 (57%)	0 (0%)

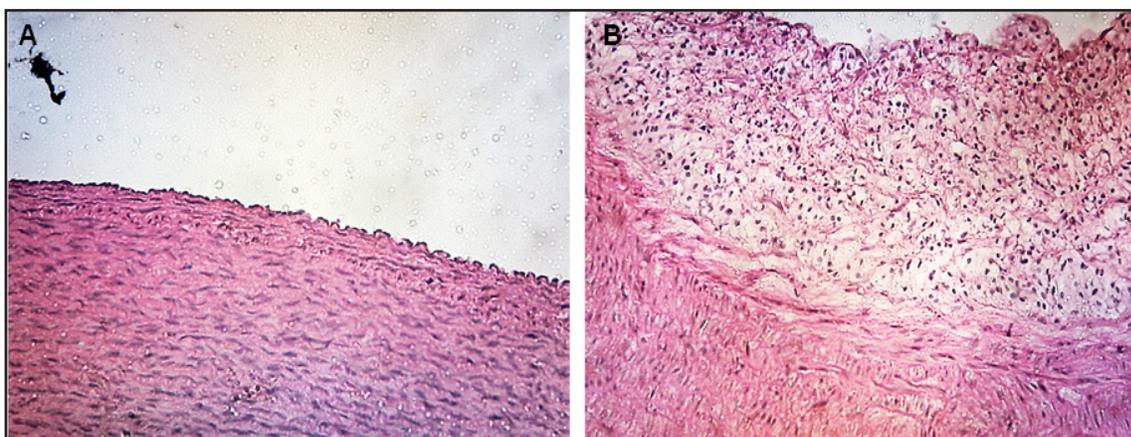


Figura 4. Cortes histológicos de las aortas de los conejos a lo largo del estudio. Sin lesiones (Panel A) de un conejo perteneciente al grupo 1 al final del estudio. Lesión tipo IV (Panel B) de un conejo perteneciente al grupo 2 al final del estudio. Se observa en la íntima arterial lípidos intracelulares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

inhibición del estrés oxidativo, inflamación, proliferación y agregación plaquetaria; de hecho, el deterioro de la vasoactividad mediada por NO es un evento temprano en la aterosclerosis, pues contribuye al vasoespasmo, formación de trombos intravasculares, isquemia cardiaca, conllevando síntomas clínicos tales como angina e infarto al miocardio (Kauser y col., 2000).

Por su parte, la ADMA es un análogo endógeno de la L-Arg, sustituido con guanidina, que inhibe la síntesis *in vivo* del NO ya que es un inhibidor endógeno competitivo de las tres isoformas de la NOS, la neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) y la inducible (iNOS). La ADMA es sintetizada mediante proteólisis de la Arg metilada post-traduccionalmente en proteínas (Fickling y col., 1993). Esta modificación postraducciona es llevada a cabo por enzimas denominadas metiltransferasas de proteína – arginina (PRMTs) (Bedford y col., 2009). En los mamíferos estas enzimas han sido clasificadas como tipo I (PRMT a, 3, 4, 6 y 8), y tipo II (PRMT 5, 7 y FBXO11). En la primera reacción,

ambas enzimas catalizan la formación de monometilarginina (NMMA) a partir de L-Arg, pero en la segunda reacción las PRMTs tipo I producen ADMA, mientras que las PRMTs tipo II producen dimetilarginina simétrica (SDMA). Durante el recambio proteico, las metilargininas son liberadas en el citoplasma. La SDMA es eliminada principalmente mediante excreción renal; por su parte la ADMA es extensamente metabolizada intracelularmente mediante la acción de enzimas denominadas dimetilarginina dimetilaminohidrolasas (DDAH) produciendo citrulina y dimetilamina (DMA) (Franceschelli y col., 2013).

Se ha sugerido que la ADMA participa en la patogenia de las enfermedades CDV y sus complicaciones; pues se ha descrito que las concentraciones plasmáticas de ADMA predicen eventos CDV y la mortalidad en poblaciones con riesgo alto, intermedio y bajo (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 aterosclerosis (Teerlink y col., 2009).

En el presente estudio y bajo nuestras condiciones experimentales, pudimos apreciar que la administración de una dieta enriquecida con colesterol ocasionó un incremento en las concentraciones séricas de ADMA y TBARS y disminución del NO, efectos que se acompañaron con la formación de lesiones ateroscleróticas; evidenciando además asociación positiva entre la ADMA con TBARS, y una relación inversa entre el NO con ADMA y TBARS. En este sentido, se ha descrito que el estrés oxidativo y la disfunción endotelial juegan un papel importante en la aterosclerosis; de hecho la ADMA ha sido reconocida como un marcador de disfunción endotelial, por lo que se le ha relacionado con varios factores de riesgo cardiovascular, como hipertensión, obesidad, hipertrigliceridemia y diabetes (Dowsett y col., 2020). Estudios longitudinales revelan que la ADMA predice la morbimortalidad en pacientes con infarto al miocardio y accidente cerebro vascular (Yoo y col., 2001; Leong y col., 2008). En efecto, diversos estudios han encontrado una fuerte relación entre el espesor de la íntima media con la ADMA (Miyazaki y col., 2003; Furuki y col., 2007; Furuki y col., 2008), comportándose como un predictor independiente de mortalidad en pacientes con infarto al miocardio (Zeller y col., 2008), y como valor pronóstico para predecir futuros eventos CDV, más allá de los factores de riesgo tradicionales (Schnabel y col., 2005). Además, la evidencia indica que las concentraciones elevadas de ADMA se correlacionan con la presencia de placas ateromatosas, particularmente en la arteria carótida, y son predictores del riesgo de desarrollo de futuras lesiones, de infarto al miocardio y accidente cerebro vascular (Dowsett y col., 2020).

Se ha descrito la participación del NO y ADMA en la aterosclerosis y en la disfunción endotelial pues la ADMA tiene efectos sobre la función endotelial, reduciendo la integridad de la barrera endotelial, incrementando la producción de ROS y de marcadores proinflamatorios; siendo muchas de estas acciones mediadas por la inhibición de la producción de NO (Dowsett y col., 2020). En este sentido, en condiciones fisiológicas, se ha destacado que el flujo laminar protege al endotelio mediante la supresión de factores proinflamatorios e incrementando la liberación de mediadores vasoactivos tales como el NO, el cual además de regular el tono vascular, tiene efectos anti-proliferativos y anti-trombóticos. Las lesiones ateroscleróticas, en contraste, tienden a encontrarse en áreas de baja tensión de corte y flujo no laminar perturbado, tales como en las bifurcaciones arteriales y áreas de alta curvatura, donde exhibe alta permeabilidad, permitiendo que macromoléculas como las LDL oxidadas (LDLox) migren al espacio subendotelial, induciendo un ambiente inflamatorio, iniciando el proceso aterosclerótico (Dowsett y col., 2020). En modelos experimentales de aterosclerosis se ha encontrado niveles elevados de ADMA plasmático y disfunción endotelial (Böger y col., 2000; Jacobi y col., 2010). Por su parte, la administración exógena de ADMA en ratones C57BL/6J desencadena el desarrollo de lesiones ateroscleróticas (Xiao y col., 2007) e induce fibrosis perivascular y engrosamiento de la íntima arterial en la microvasculatura coronaria (Suda y col., 2004). Asimismo, el tratamiento con ADMA en ratones deficientes con apolipoproteína E, exacerba las lesiones ateroscleróticas (Xiao y col., 2007). Todo ello sugiere que los niveles elevados de ADMA podrían afectar la aterogénesis al inhibir los

procesos de reparación vascular, lo cual refuerza la hipótesis de que la ADMA es una molécula implicada en el desarrollo de la aterosclerosis. Por lo tanto, el aumento de las concentraciones de ADMA inducida por la dieta enriquecida con colesterol observado en la presente investigación, sugiere que es parcialmente responsable del aumento de ROS (TBARS) y de la disminución de NO, posiblemente al desacoplar e inhibir a la NOS, respectivamente. Adicionalmente, el incremento del ADMA pudo contribuir al desarrollo y progresión de la aterosclerosis, posiblemente induciendo inflamación vascular y un ambiente oxidativo.

Es relevante señalar que la elevación de las concentraciones séricas de TBARS y ADMA, y la disminución de NO encontrado en el presente estudio se evidenció desde la cuarta semana de experimentación, lo cual sugiere que los mismos son marcadores tempranos, no invasivos de aterosclerosis; pues intervienen en el inicio y progresión de esta enfermedad. De hecho, la ADMA puede inducir la formación de células espumosas, las lesiones incipientes de la aterosclerosis. En este sentido, se ha demostrado que el tratamiento con ADMA en macrófagos es capaz de incrementar la expresión del receptor de lipoproteínas de baja densidad oxidado tipo lectina-1 (LOX-1), el cual media la captación de LDLox, paso clave en la aterosclerosis; y además incrementa la expresión de la acetil coenzima A colesterol acetil transferasa 1 (ACAT-1), la cual esterifica el colesterol; por lo que la ADMA incrementa el almacenamiento de colesterol, acontecimientos importantes en la aterosclerosis. Además, la ADMA disminuye la expresión del transportador de cassette de unión a ATP, ABCA1 y ABCG1, reduciendo el eflujo del colesterol desde el macrófago, contribuyendo con la formación

de las células espumosas (Dowsett y col., 2020). De igual manera, la evidencia indica que el tratamiento con ADMA produce la reorganización de actina y la dispersión de las uniones adherentes, que fue revertido tanto por la apocinina, un inhibidor de la NADPH oxidasa, y el SB203580, un inhibidor de la proteína quinasa activada por mitógenos p38. Esto indica que la ADMA puede influir en la permeabilidad de las células endoteliales mediante la organización del citoesqueleto de actina, a través de la señalización de las ROS y MAPK p38, y sugiere que la ADMA puede mediar la reducción de la integridad de la barrera endotelial contribuyendo a la acumulación de LDLox en la aterosclerosis.

Por otra parte, la ADMA es capaz de inducir la activación de las células endoteliales, y en consecuencia mediar las acciones inflamatorias en el endotelio; pues estudios *in vitro* han descrito que el tratamiento con ADMA indujo la expresión de citocinas proinflamatorias y moléculas de adhesión vascular como la molécula de adhesión intercelular tipo 1 (ICAM-1), molécula de adhesión vascular tipo 1 (VCAM-1), proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1 (MCP-1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Böger y col., 2000; Guo y col., 2011 y 2013), además la ADMA incrementó la translocación nuclear del factor nuclear kappa B (NF-KB), lo cual coincidió con la incrementada expresión de ICAM-1 en células endoteliales de las venas de cordón umbilical humana HUVEC (Guo y col., 2011), indicando que la ADMA induce disfunción endotelial y propicia un ambiente proinflamatorio y oxidativo, propio de la aterosclerosis.

Por lo tanto, el aumento de las concentraciones séricas de ADMA y TBARS, y disminución de NO observados en el presente estudio sugieren que pudieron ser

debidos al proceso inmunoinflamatorio y oxidativo de la aterosclerosis inducido por la dieta enriquecida con colesterol; pues se ha descrito asociación positiva entre las concentraciones plasmáticas de ADMA con la producción de superóxido en pacientes con enfermedad arterial coronaria (Antoniades y col., 2009). De hecho, se ha postulado que la ADMA puede promover el desbalance de ROS vascular contribuyendo a la disfunción endotelial, mediante la reducción de la biodisponibilidad del NO, además la ADMA puede incrementar la producción de superóxido mediante el desacople de la eNOS (Antoniades y col., 2009). En este sentido, Borger y col., (2000) encontraron que la producción de superóxido inducida por ADMA fue acompañada de la activación de NF-KB, la secreción de MCP-1 y la formación de lesiones (Suda y col., 2004). Por otra parte, la evidencia sugiere que la ADMA puede modular la carga oxidativa a través de mecanismos independientes del NO, pues la ADMA puede inhibir los sistemas de defensa antioxidante. En este sentido, se ha demostrado que la administración crónica de ADMA en ratas redujo la actividad de enzimas antioxidantes como la catalasa, SOD y GPx, lo cual se acompañó de un aumento en los niveles circulantes de malondialdehído (Alacam y col., 2013), sugiriendo que la ADMA puede además reducir la eliminación de las ROS, contribuyendo a la carga oxidativa; y ratifica el papel de la oxidación e inflamación en esta patología. En apoyo a este concepto, en estudios previos demostramos que la administración de una dieta enriquecida con colesterol incrementó los niveles séricos de marcadores de oxidación como LOX-1, LDLox y TBARS y de inflamación desde las primeras fases de la aterosclerosis, siendo esto revertido con la administración oral de antioxidantes, lo cual se vio acompañado de

una reducción en la formación y severidad de lesiones ateroscleróticas (González y col., 2008; Figueira y González, 2008; 2018; 2020; 2022, 2023).

En conclusión, bajo nuestras condiciones experimentales y de acuerdo con los resultados obtenidos, la ADMA, el NO y TBARS constituyen marcadores tempranos no invasivos de oxidación y aterosclerosis; pues los mismos se modificaron desde la 4ta semana de estudio. Esto sugiere que la oxidación y la disfunción arterial juegan un papel relevante en la fisiopatología de esta enfermedad.

Referencias Bibliográficas

- Alacam H, Avci B, Sali O, Dilek A, Kozan A, Mertoglu C, Sahin M, Okuyucu A. 2013. Does ADMA affect the oxidant/antioxidant balance in rats? *Turk J Med Sci* 43: 405-10.
- Antoniades C, Shirodaria C, Leeson P, Antonopoulos A, Warrick N, Van-Assche T, Cunningham C, Tousoulis D, Pillai R, Ratnatunga C. 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: 1142-50.
- Batty M, Bennett MR, Yu E. 2022. The Role of Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Cells* 11(23):3843.
- Bedford M, Clarke S. 2009. Protein arginine methylation in mammals: Who, what, and why. *Mol Cell* 33: 1-13.
- Böger R, Bode-Böger S, Sydow K, Heistad D, Lentz S. 2000. Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1557-64.
- Böger R, Bode-Böger S, Tsao P, Lin P, Chan J, Cooke J. 2000. An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase regulates endothelial adhesiveness for monocytes. *J Am Coll Cardiol* 36: 2287-95.
- Böger RH, Maas R, Schulze F, Schwedhelm E. 2009. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a prospective marker of cardiovascular disease and

- mortality--an update on patient populations with a wide range of cardiovascular risk. *Pharmacol Res* 60(6):481-7.
- Cai H, Harrison DG. 2000. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidant stress. *Circ Res* 87: 840-844.
- Creager MA, Gallagher SJ, Girerd XJ, Coleman SM, Dzau VJ, Cooke JP. 1992. L-arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* 90: 1248-1253.
- 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* 20(9):3026.
- Dri E, Lampas E, Lazaros G, Lazarou E, Theofilis P, Tsioufis C, Tousoulis D. 2023. Inflammatory Mediators of Endothelial Dysfunction. *Life (Basel)* 13(6):1420.
- Fickling S, Leone A, Nussey S, Vallance P, Whitley G. 1993. Synthesis of NG, NG dimethylarginine by human endothelial cells. *Endothelium* 1: 137-40.
- 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 aterosclerosis. *Clin Investig Arterioscler* 30(5):209-216.
- Figueira L, González J. 2020. Efecto del resveratrol sobre quimioquinas séricas en la aterosclerosis. *Rev Fac Farma UCV* 83 (1 y 2): 7-23.
- Figueira L, González J. 2022. Efecto antiinflamatorio y antioxidante del resveratrol en la aterosclerosis. Papel de la molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria 1. *Rev Fac Farma UCV* 85(1 y 2): 51-66.
- Figueira L, González J. 2023. Papel del receptor de lipoproteína de baja densidad oxidado tipo lectina-1 como marcador sérico de aterosclerosis. *Rev Fac Farma* 86(1 y 2):93-105.
- 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* 2013. 14(12):24412-21.
- Furuki K, Adachi H, Enomoto M, Otsuka M, Fukami A, Kumagai 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.
- Ghebremariam Y, Erlanson D, Cooke J. 2014. A novel and potent inhibitor of dimethylarginine dimethylaminohydrolase: A modulator of cardiovascular nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 348(1): 69-76.
- Gimbrone MA Jr, García-Cardena G. 2016. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res* 118(4):620-36.
- 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.
- Griendling K, Sorescu D, Ushio-Fukai M. 2000. NAD(P) H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86: 494-501.
- Guo W, Zhang D, Wang L, Zhang Y, Liu W. 2013. Disruption of asymmetric dimethylarginine-induced RelA/P65 association with actin in endothelial cells. *Acta Biochim Biophys Sin* 45: 229-35.
- Guo W, Zhang D, Wang X, Kong W, Zhang Y, Zhang Q, Liu W. 2011. Actin cytoskeleton modulates ADMA-induced NF-kappaB nuclear translocation and ICAM-1 expression in endothelial cells. *Med Sci Monit* 17: BR242-7.
- Gusev E, Sarapultsev A. 2023. Atherosclerosis and Inflammation: Insights from the Theory of General Pathological Processes. *Int J Mol Sci* 24(9):7910.
- Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. 2009. Endothelial Function and Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Circ J* 73: 411-418.
- Jacobi J, Maas R, Cardounel A, Arend M, Pope A, Cordasic N, Heusinger-Ribeiro J, Atzler D, Strobel J, Schwedhelm E. 2010. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase overexpression ameliorates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by lowering asymmetric dimethylarginine. *Am J Pathol* 176: 2559-70.

- Jebari-Benslaiman S, Galicia-García U, Larrea-Sebal A, Olaetxea JR, Alloza I, Vandenbroeck K, Benito-Vicente A, Martín C. 2022. Pathophysiology of Atherosclerosis. *Int J Mol Sci* 23(6):3346.
- Kauser K, da Cunha V, Fitch R, Mallari C, Rubanyi GM. 2000. Role of endogenous nitric oxide in progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278(5):H1679-85.
- Kong P, Cui ZY, Huang XF, Zhang DD, Guo RJ, Han M. 2022. Inflammation and atherosclerosis: signaling pathways and therapeutic intervention. *Signal Transduct Target Ther* 7(1):131.
- Leong T, Zylberstein D, Graham I, Lissner L, Ward D, Fogart J, Bengtsson C, Björkelund C, Thelle D, Collaboration S.-I.-N. 2008. Asymmetric dimethylarginine independently predicts fatal and nonfatal myocardial infarction and stroke in women: 24-year follow-up of the population study of women in Gothenburg. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 961-7.
- Lüscher TF. 1990. Imbalance of endothelium-derived relaxing and contracting factors. *Am J Hypertens* 3: 317-330.
- Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. 2005. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 29-38.
- Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke J, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T. 1999. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: A novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 99: 1141-6.
- Nappi F, Fiore A, Masiglat J, Cavuoti T, Romandini M, Nappi P, Avtaar Singh SS, Couetil JP. 2022. Endothelium-Derived Relaxing Factors and Endothelial Function: A Systematic Review. *Biomedicines* 10(11):2884.
- 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.
- Rasmussen C, Moinard C, Martin C, Tricottet 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.
- Schnabel R, Blankenberg S, Lubos E, Lackner K, Rupprecht H, Espinola-Klein C, Jachmann N, Post F, Peetz D, Bickel C. 2005. Asymmetric Dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease. *Circ Res* 97: e53-9.
- Shao C, Wang J, Tian J, Tang YD. 2020. Coronary artery disease: from mechanism to clinical practice. *Adv Exp Med Biol* 2020;1177:1-36.
- 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. 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: 1682-8.
- Taddei S, Ghiadoni L, Virdis A, Versari D, Salvetti A. 2003. Mechanisms of Endothelial Dysfunction: Clinical Significance and Preventive Non-Pharmacological Therapeutic Strategies. *Curr Pharmaceut Des* 9: 2385-2402.
- Teerlink T, Luo Z, Palm F, Wilcox CS. 2009. Cellular ADMA: regulation and action. *Pharmacol Res* 60(6):448-60.
- Vogiatzi G, Tousoulis D, Stefanadis C. 2009. The Role of Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Hellenic J Cardiol* 50: 402-409.
- Xiao H, Yang Z, Jia S, Li N, Jiang D, Zhang X, Guo R, Zhou Z, Deng H, Li Y. 2007. Effect of asymmetric dimethylarginine on atherogenesis and erythrocyte deformability in apolipoprotein E deficient mice. *Life Sci* 81: 1-7.
- Xuan C, Tian Q, Li H, Bei-Bei Z, He G, Lun L. 2015. Levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA), an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, and risk of coronary artery disease: A meta-analysis based on 4713 participants. *Eur J Prev Cardiol* 23: 502-10.
- Yoo J, Lee S. 2001. Elevated levels of plasma homocyst(e)ine and asymmetric dimethylarginine in elderly patients with stroke. *Atherosclerosis* 158: 425-30.
- Zeller M, Korandji C, Guillard J, Sicard P, Vergely C, Lorgis L, Beer J, Duvillard L, Lagrost A, Moreau D. 2008. Impact of asymmetric dimethylarginine on mortality after acute myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 954-60.
- Zuccalá A, Fiorenza S, Rapaná R, Santoro A. 2005. Hypertension, atherosclerosis and kidney. *G Ital Nefrol* 22(Suppl 31):S9-14.