

# ARTÍCULOS DE REVISIÓN

## REVIEW ARTICLES

---

# Arginina, óxido nítrico y función endotelial

## *Arginine, nitric oxide and endothelial function*

MARTÍNEZ-AUGUSTIN O, SÁNCHEZ DE MEDINA F

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Granada. Granada. España.

e-mail: [omartine@ugr.es](mailto:omartine@ugr.es)

Financiación: OMA es investigadora del Plan Ramón y Cajal del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

### RESUMEN

La arginina es un aminoácido semiesencial con importantes funciones fisiológicas. Entre ellas destaca su papel como precursora del óxido nítrico, una molécula producida a partir de la arginina por la enzima óxido nítrico sintasa en muchos tejidos y que en el endotelio vascular se comporta como vasodilatadora, antiaterogénica y antiagregante plaquetaria. El estudio detallado de esta reacción enzimática indica que la óxido nítrico sintasa tiene una gran afinidad por su sustrato, la arginina, que se encuentra en concentraciones altas en el endotelio. Por tanto, resultaba sorprendente que el funcionamiento de esta enzima estuviera condicionado por las variaciones en las concentraciones de arginina debidas al aporte nutricional. A esto se le llamó «paradoja de la arginina». Sin embargo, se ha demostrado recientemente la existencia de un inhibidor endógeno de la óxido nítrico sintasa denominado dimetilarginina asimétrica. Este compuesto disminuiría la formación del óxido nítrico por inhibición competitiva con el sustrato natural, la arginina. De ahí la importancia de la suplementación con arginina para contrarrestar este efecto. Además de la arginina, existen otros componentes de la dieta que pueden influir también en la síntesis de óxido nítrico por el endotelio vascular.

PALABRAS CLAVE: Arginina. Óxido nítrico. Función endotelial.

### ABSTRACT

*Arginine is a semi-essential amino acid with major physiological functions. One of the most outstanding of such is its role as an amino acid precursor of nitric oxide, a molecule produced, in many tissues, from arginine by the nitric oxide synthase enzyme. Within the vascular endothelium, nitric oxide behaves as a vasodilator, antiatherogenic, and anti-plaque aggregation agent. The detailed study of this enzymatic reaction indicates that nitric oxide synthase presents high affinity, for its substrate, arginine, which is found in high concentrations in the endothelium. Consequently, it is surprising that the functionality of this enzyme is conditioned by variations in concentrations of arginine, produced by nutritional intake. This is known as «the arginine paradox». However, the existence of an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, known as asymmetric dimethylarginine, has been recently demonstrated. This compound would decrease the formation of nitric oxide through competitive inhibition with the natural substrate, arginine. It is for this reason that dietary supplementation with arginine would be important as a means to counteracting such an effect. In addition to arginine, there are other dietary components which may also influence the synthesis of nitric oxide by the vascular endothelium.*

KEY WORDS: Arginine. Nitric oxide. Endothelial function.

### INTRODUCCIÓN

La arginina es un aminoácido semiesencial o condicionalmente esencial. Además de las funciones relacionadas directamente con su metabolismo (formación de péptidos y proteínas, funcionamiento del ciclo de la urea, síntesis de creatina, síntesis de prolina, síntesis de poliaminas, etc), la arginina parece desem-

### INTRODUCTION

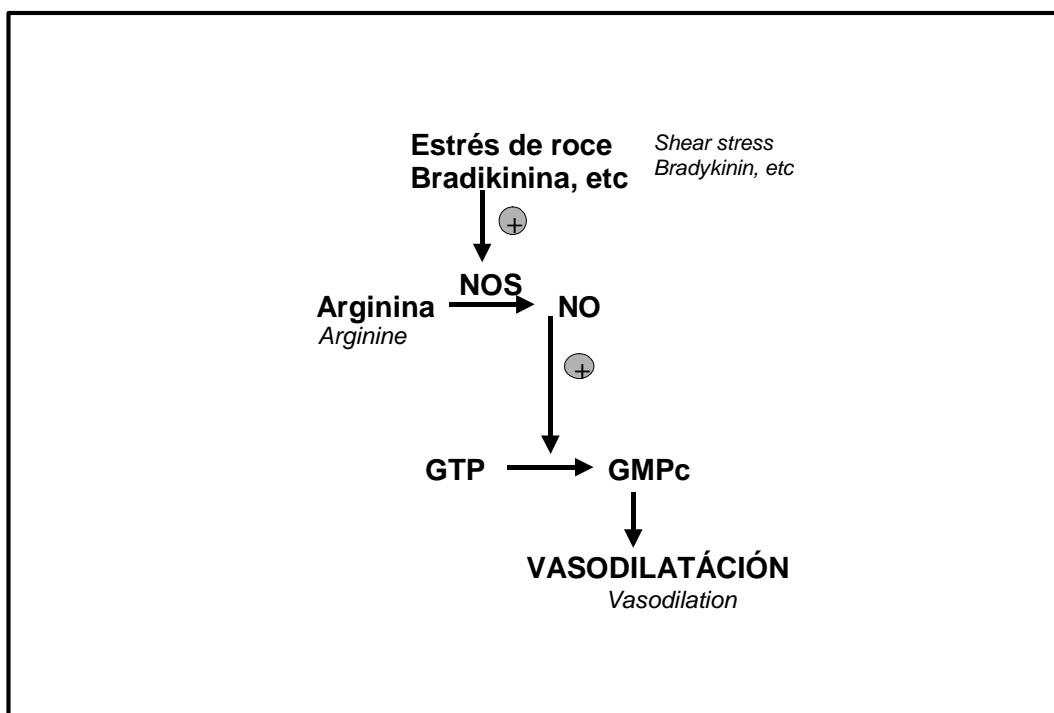
Arginine can be considered as a semi-essential or conditionally essential amino acid. In addition to the functions that are directly related to its metabolism (formation of peptides and proteins, urea cycle function, creatine synthesis, proline synthesis, polyamine synthesis, etc), arginine seems to carry out other

peñar otras funciones fisiológicas importantes. Así, este aminoácido es capaz de estimular la secreción de hormonas diversas, como insulina, glucagon, catecolaminas, prolactina y hormona de crecimiento, lo que podría ayudar a comprender el efecto beneficioso de la suplementación con arginina a la dieta de los pacientes en situaciones catabólicas<sup>1</sup>. Por otra parte, la arginina desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la respuesta inmune<sup>2</sup>. En los últimos años existe una atención creciente sobre el posible papel protector de la arginina sobre la salud cardiovascular, que tiene su base científica en el hecho de que este aminoácido es el precursor metabólico del óxido nítrico (Figura 1), una molécula producida en el endotelio vascular con acción vasodilatadora, antiaterogénica y antiagregante plaquetaria<sup>3</sup>.

important physiological functions. Thus, this amino acid is capable of stimulating the secretion of several hormones, such as insulin, glucagon, catecholamines, prolactin and growth hormone. These facts may help us to understand the beneficial effects of arginine dietary supplementation in patients in catabolic situations<sup>1</sup>. On the other hand, arginine has a fundamental role in the maintenance of immune response<sup>2</sup>. Over recent years, increasing attention has been given to the possible protective role of arginine in cardiovascular health, which has a scientific basis in the fact that this amino acid is the metabolic precursor of nitric oxide (Figure 1), a molecule produced in the vascular endothelium that presents vasodilatory and antiatherogenic activities, as well as an effect inhibiting platelet aggregation<sup>3</sup>.

**FIGURA 1.** Mecanismo de acción de la arginina en la vasodilatación.

**FIGURE 1.** Action mechanism of arginine in vasodilation



## FUNCIÓN Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

Durante mucho tiempo se pensó que la única función del endotelio vascular era de naturaleza pasiva y que consistía en separar la sangre de las estructuras adyacentes. En la actualidad se conocen ya muchas funciones del endotelio vascular que incluyen entre otras la regulación de la agregación plaquetaria y la coagulación sanguínea, la modulación del tono vascular, la regulación de la proliferación de las células de músculo liso y la capacidad de reclutar células sanguíneas. Lógicamente, por tanto, las alteraciones de la fisiología endotelial («disfunción endotelial») están implicadas en numerosas situaciones patológicas entre las que destaca la aterosclerosis. En los últimos años ha quedado bien establecido que la disfunción endotelial constituye una de las primeras etapas en el desarrollo de la aterogénesis y contribuye también a la progresión de la placa aterosclerótica y a la aparición de las complicaciones clínicas correspondientes<sup>4,5</sup>. En estas condiciones, el endotelio pierde sus características antiagregantes, anticoagulantes y fibrinolíticas, pasando a favorecer la formación de trombos y coágulos. Y pasa de tener efectos vasodilatadores a originar vasoconstricción. Por otra parte, se favorece la adhesión de células inflamatorias y la proliferación de las células de músculo liso.

Las causas de la disfunción endotelial son muy numerosas (infecciones, agentes oxidantes, hipercolesterolemia, turbulencias sanguíneas, etc). Las células endoteliales pueden responder a estas agresiones de manera muy rápida en ocasiones, pero la respuesta endotelial suele ser a largo plazo mediante la modulación de la expresión génica de proteínas diversas involucradas en la adaptación funcional. Así, por ejemplo, como resultado de la agresión al endotelio, disminuye la producción del óxido nítrico, de carácter vasodilatador, y se induce la síntesis de las endotelinas, proteínas de acción vasoconstrictora<sup>6</sup>.

## ÓXIDO NÍTRICO

La producción de óxido nítrico (NO) es uno de los principales mecanismos implica-

## ENDOTHELIAL FUNCTION AND DYSFUNCTION

It was thought, for a long time, that vascular endothelium function was only of a passive nature, consisting of the separation of blood from the adjacent structures. Nowadays, it is already well known that there are many other vascular endothelium functions, which include the regulation of platelet aggregation and blood coagulation, the modulation of vascular tone, and the regulation of smooth muscle cell proliferation and blood cell recruitment capacity. Consequently, it is logical that physiological endothelial alterations («endothelial dysfunction») are involved in numerous pathologies, especially with respect to atherosclerosis, among others. In recent years, it has been well established that endothelial dysfunction constitutes one of the first stages in the development of atherogenesis and it also contributes to the progression of the atherosclerotic plaque and the appearance of the corresponding clinical complications<sup>4,5</sup>. Under such conditions, the endothelium loses its antiplatelet, anticoagulant and fibrinolytic characteristics, favouring the subsequent formation of blood clots and coagulates. In addition, the endothelium changes from a vasodilatory to a vasoconstricting effect. Furthermore, such a situation favours the adhesion of inflammatory cells and the proliferation of smooth muscle cells.

The causes for endothelial dysfunction are very numerous (infections, oxidative agents, hypercholesterolemia, blood turbulence, etc). On occasions, endothelial cells may respond to these aggressions very rapidly, but endothelial response usually occurs over long periods of time through the modulation of the expression of several proteins involved in functional adaptation. Consequently, for example, as a result of an aggressive action towards the endothelium the production of nitric oxide, with a vasodilatory action, decreases, and the synthesis of endothelins, proteins of a vasoconstrictory action<sup>6</sup>, is induced.

dos en el funcionamiento del endotelio. Este compuesto químico es un gas que difunde fácilmente desde las células endoteliales a las células de músculo liso de la pared vascular. Allí estimula a la guanilato ciclasa, una enzima soluble que cataliza la formación de GMP cíclico (GMPc) a partir de GTP. El GMPc desencadena entonces la vasodilatación arterial (Figura 1). De esta forma, la síntesis de NO regula el flujo sanguíneo en respuesta a estímulos tales como el llamado «estrés de roce» de la sangre o la acción de moléculas circulantes como la bradikinina o la acetilcolina. Las funciones del NO endotelial son, sin embargo, muy diversas. Además de controlar el tono vascular, contribuye al mantenimiento de la estructura de la pared arterial, ya que reprime la proliferación de las células musculares lisas. Por otra parte, el NO tiene acción antiagregante sobre las plaquetas e inhibe la adhesión de los leucocitos al endotelio<sup>3</sup>.

La síntesis del NO se realiza a partir de la arginina por acción de la óxido nítrico sintasa (NOS)<sup>7</sup>. Se trata de una reacción muy compleja en la que se necesita oxígeno molecular y diversos coenzimas: tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), NADPH, FAD, FMN, grupo hemo y calmodulina (Figura 2). Es interesante resaltar que el NO se forma prácticamente en todas las células del organismo, en las que desempeña multitud de funciones diversas. Aunque la síntesis se realiza siempre a partir de arginina por la óxido nítrico sintasa, existen en los distintos tejidos varias isoformas de esta enzima. La enzima constitutiva del endotelio se denomina eNOS (óxido nítrico sintasa endotelial) y es la responsable de la formación habitual de NO. Tanto en el endotelio como en otras células de la pared vascular, macrófagos, etc, se puede inducir otra isoforma denominada iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) en situaciones inflamatorias.

La regulación de las concentraciones de NO es muy complicada y no se conoce todavía por completo. Se sabe que su producción disminuye durante la aterosclerosis avanzada, tanto por una disminución en la síntesis de la eNOS como por un aumento en su degradación. Como la vida media del NO es muy breve (unos segundos tan solo), en estas condiciones habría muy poca cantidad de NO disponible para sus funciones endoteliales. Es

## NITRIC OXIDE

The production of nitric oxide (NO) is one of the main mechanisms involved in endothelial function. This chemical compound is a gas that easily diffuses from the endothelial cells to the smooth muscle cells on the vascular wall. Here it stimulates guanylate cyclase, a soluble enzyme, which catalyses the formation of cyclic GMP (cGMP) from GTP. cGMP in turn triggers off arterial vasodilatation (Figure 1). In such a way, the synthesis of NO regulates blood flow in response to stimuli, such as the so called «shear stress» of blood or the action of circulating molecules, such as bradykinin or acetylcholine. Endothelial NO functions are however, numerous. In addition to controlling vascular tone, it contributes to the maintenance of arterial wall structure, inhibiting the proliferation of smooth muscle cells. Furthermore, NO presents antiplatelet activity and inhibits the adhesion of leukocytes to the endothelium<sup>3</sup>.

NO is synthesized from arginin by nitric oxide synthase (NOS)<sup>7</sup> in a very complex reaction in which molecular oxygen and several co-enzymes (tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), NADPH, FAD, FMN, heme group and calmodulin) are required (Figure 2). It is interesting to note that NO formation takes place in practically all the cells of the organism, in which it has a multitude of functions. Although synthesis always takes place in the presence of arginine through nitric oxide synthase, there are several isoforms of this enzyme in different tissues. The constitutive enzyme of the endothelium is known as eNOS (endothelial nitric oxide synthase) and is responsible for the usual formation of NO. In the endothelium, as well as in other vascular wall cells, macrophages, etc, another isoform known as iNOS (inducible nitric oxide synthase) may be induced in inflammatory situations.

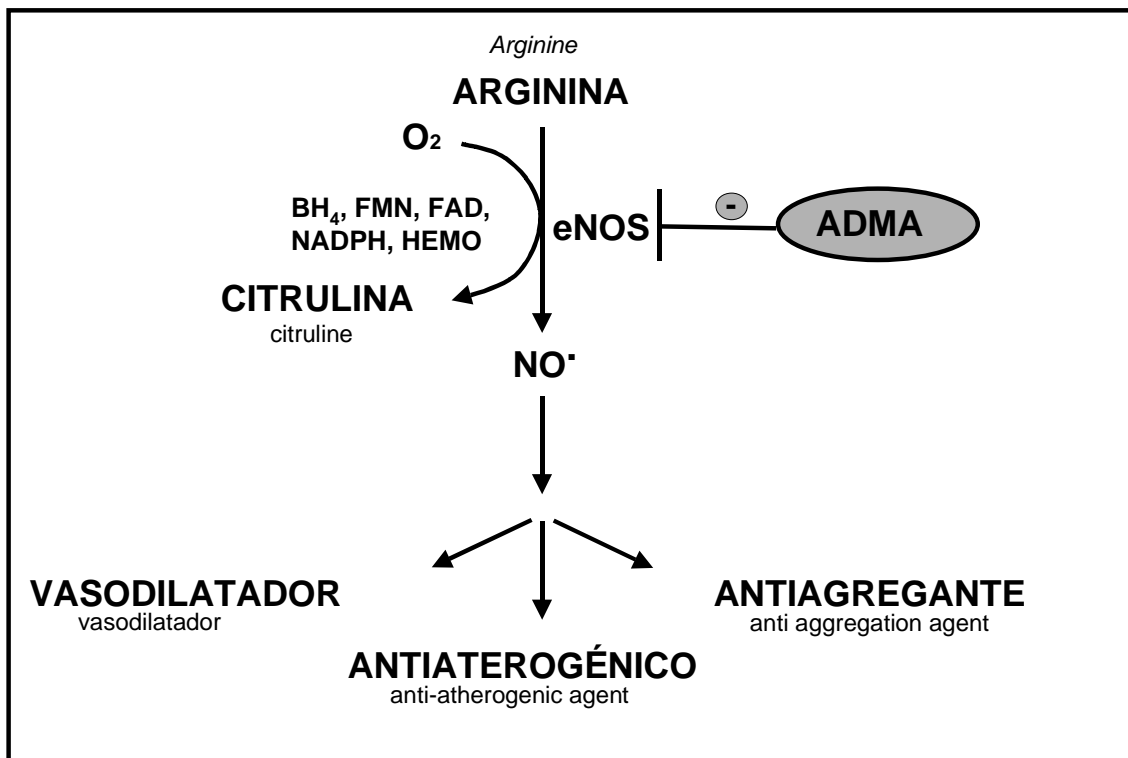
The regulation of NO concentrations is very complicated and is not yet fully known. However, it is known that its production decreases in advanced atherosclerosis, due either to a decrease in eNOS synthesis or an increase in NO degradation. Given that the average life span of NO is very brief (only a few seconds), in such conditions, there would be very little quantity of NO available for endothelial func-

interesante añadir, además, que si la disponibilidad de arginina o de BH<sub>4</sub> disminuyen, en vez de formarse NO se produciría entonces la síntesis alternativa del radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) por la eNOS.

It is interesting to add that if the availability of arginine or BH<sub>4</sub> decreases the alternative synthesis of superoxide radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) through eNOS will occur instead of the formation of NO.

**FIGURA 2.** Efectos vasculares de la arginina y mecanismo de acción de la dimetil arginina asimétrica (ADMA).

**FIGURE 2.** Vascular effects of arginine and action mechanism of assymetric dimethyl arginine (ADMA).



**INGESTA PROTEICA Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR**

Resulta curioso recordar que los primeros estudios sobre la influencia de la dieta en la enfermedad cardiovascular se enfocaron a la ingesta proteica, manejando la hipótesis de que pudieran existir metabolitos tóxicos de las proteínas de carácter aterogénico. Lógicamente, cuando se conocieron posteriormente las conexiones del colesterol con la aterosclerosis, los estudios se centraron fundamentalmente en la grasa de la dieta<sup>8</sup>. No obstante, durante los últimos años se ha vuelto a insistir en la relación de las proteínas con la salud cardiovascular. De acuerdo con los estudios de observación parece claro que existe una rela-

**PROTEIN INTAKE AND CARDIOVASCULAR DISEASE**

It is a curiosity to remember that the first studies on the influence of diet on cardiovascular disease were focussed on protein intake, considering the hypothesis of the existence of toxic metabolites in proteins of an atherogenic nature. Logically, when the connection between cholesterol and atherosclerosis was subsequently discovered, studies were fundamentally centred on fat intake in daily diets<sup>8</sup>. However, in the last few years there is a renovated interest in the relationship between proteins and cardiovascular health. In accordance with observational studies, it seems clear that there is an inverse relationship between



ción inversa entre la ingesta proteica y la presión arterial. Los ensayos clínicos corroboran estas conclusiones y subrayan que este efecto protector se debe sobre todo a las proteínas vegetales. Haciendo análisis detallado de las distintas dietas empleadas puede concluirse que la protección vascular es superior cuando se consumen proteínas derivadas de lo que se podría llamar una dieta «prudente» (verduras, frutas, legumbres, harinas integrales, pollo y pescado) que cuando las proteínas proceden de una dieta típicamente occidental (carne roja, harinas refinadas, dulces, bollería, fritos y productos lácteos ricos en grasa). Aunque todavía existe una tendencia generalizada a pensar que el exceso de proteína puede ser perjudicial para la salud vascular, estos estudios sugieren lo contrario, aunque los datos son todavía insuficientes<sup>9</sup>.

Los mecanismos por los que la ingesta proteica pudiera favorecer la salud vascular no están claros, aunque parece que deben estar relacionados sobre todo con la arginina. De hecho, algunos estudios indicaban que la protección cardiovascular era proporcional a la riqueza en arginina de la proteína y, sobre todo, a la relación arginina/lisina, que es mayor en la proteína vegetal. El mecanismo de esta protección no se pudo explicar hasta que se descubrió la naturaleza química del conocido «factor relajante derivado del endotelio» y se identificó con el óxido nítrico (NO). Como se acaba de describir, este compuesto deriva enzimáticamente de la arginina y tiene numerosas capacidades funcionales entre las que destacan su carácter vasodilatador, antiaterosclerótico y antiagregante plaquetario.

La acción vasoprotectora de la arginina podría explicarse, en consecuencia, por su capacidad de aumentar la producción de óxido nítrico en el endotelio vascular. Sin embargo, el estudio detallado de esta reacción enzimática indica que la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) tiene una  $K_m$  muy baja (de orden micromolar), y, por tanto, una gran afinidad por su sustrato, la arginina; y, por otra parte, que las concentraciones endoteliales de arginina son muy altas (de orden milimolar). Por tanto, resultaba sorprendente que el funcionamiento de la enzima estuviera condicionado por las variaciones en las concentraciones de sustrato debidas a su aporte nutricional. Esto

protein intake and arterial pressure. Clinical tests have corroborated such conclusions and emphasise that above all, it is the vegetable proteins that afford a protective effect. On detailed analysis of the different diets used, it can be concluded that vascular protection is higher when proteins derives from what could be termed as a «prudent diet» are taken (vegetables, fruit, pulses, wholemeal flour, chicken and fish), as opposed to proteins from typically western nation diets (red meat, refined flour, sweets, pastries, fried food and dairy products rich in fat). Although there is still a general tendency to consider that an excess of protein may be detrimental to vascular health, these studies suggest that the contrary is nearer the truth. However, there is still a lack of data on this subject.

The mechanisms through which protein intake could favour vascular health are not clear, but they seem to be mainly associated to arginine. In fact, some studies have indicated that cardiovascular protection was proportional to the richness of arginine in protein and above all to the arginine/lysine ratio, which is higher in vegetal protein. The mechanism involved in this protective role could not be explained until the chemical nature of the well known «endothelium-derived relaxing factor» was discovered and identified as nitric oxide (NO). As we have just described, this compound is enzymatically derived from arginine and has numerous functional capacities, among which its vasodilatory, antiatherosclerotic and antiplatelet aggregation properties are well known.

The vasoprotective activity of arginine could be explained, in consequence, by its capacity to increase the production of nitric oxide in the vascular endothelium. However, the detailed study of this enzymatic reaction indicates that endothelial nitric oxide synthase (eNOS) has a very low  $K_m$  (on a micro molar scale), and therefore, a great affinity for its substrate, arginine; and on the hand, endothelial concentrations of arginine are very high (on a milimolar scale). Consequently, it was surprising that the functionality of the enzyme was conditioned by variations in the concentrations of substrate due to variations in nutritional intake. This is what is known as «the arginine paradox». In fact, experimental studies did not

es lo que se llamó «paradoja de la arginina». De hecho, los estudios experimentales no mostraron efectos vasodilatadores directos de la arginina ni en animales ni en individuos sanos. Sin embargo, sí que se encontraron estos efectos vasodilatadores en condiciones de hipercolesterolemia. Entre las posibles explicaciones para esta paradoja de la arginina se encuentran problemas de compartimentación (solo una pequeña porción de arginina podría ser utilizada por la eNOS, debido a su localización en zonas específicas de la membrana endotelial denominadas caveolas) y, especialmente, la existencia de inhibidores endógenos.

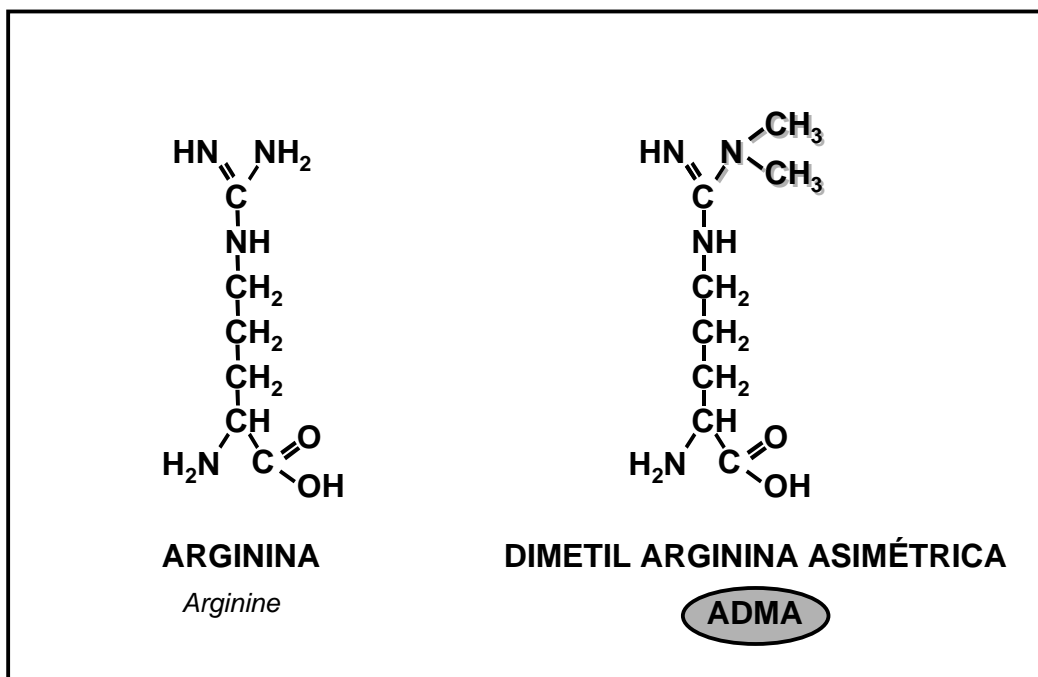
### DIMETIL-ARGININA ASIMÉTRICA

La dimetil-arginina asimétrica (ADMA) es un inhibidor competitivo endógeno de la eNOS, descubierto en 1992 en enfermos con insuficiencia renal<sup>10</sup>. La denominación se debe a que los dos metilos están unidos a un solo nitrógeno del grupo guanido (Figura 3). Este compuesto está aumentado en la insuficiencia renal y en otras situaciones patológicas como la hipercolesterolemia, la aterosclerosis y la hipertensión arterial. El incremento en las concentraciones de ADMA supone un importante efecto inhibitor sobre la enzima. Por eso, la inhibición puede ser atenuada si aumenta la concentración de sustrato disponible. En efecto, algunos estudios de intervención indican que la suplementación con arginina mejora la función endotelial en pacientes con enfermedad coronaria. Además, el tratamiento a largo plazo con arginina disminuye los síntomas de la enfermedad vascular en pacientes con aterosclerosis periférica y coronaria<sup>11</sup>.

show the direct vasodilatory effects from arginine, either in animals, or in healthy human subjects. However, such vasodilatory effects have been found in conditions of hypercholesterolemia. Among the possible explanations for this arginine paradox are compartmentalization problems (only a small portion of arginine may be used by eNOS, due to its localization in specific areas of the endothelial membrane, known as caveolae) and to the existence of endogenous inhibitors.

### ASSYMETRIC DIMETHYLARGININE

Assymetric dimethylarginine (ADMA) is a competitive endogen inhibitor of eNOS, discovered in 1992 in patients suffering from renal insufficiency<sup>10</sup>. The naming of this compound is attributable to the fact that both methyl molecules are linked to only one of nitrogens from the guanide group (Figure 3). This compound is present at greater concentrations in renal insufficiency and in other pathologies, such as hypercholesterolemia, atherosclerosis and arterial hypertension. The increase in ADMA concentrations results in a major inhibitory effect on the enzyme. Hence, inhibition may be reduced if the concentration of substrate increases. In fact, some intervention studies indicate that arginine supplementation improves endothelial function in patients suffering from coronary disease. Furthermore, long term treatment with arginine reduces the symptoms of vascular disease in patients suffering from peripheral arteriosclerosis and coronary disease<sup>11</sup>.

**FIGURA 3.** Fórmulas químicas de la arginina y de la dimetil arginina asimétrica (ADMA).**FIGURE 3.** Vascular effects of arginine and action mechanism of assymetric dimethyl arginine (ADMA).

La dimetil-arginina asimétrica procede de la hidrólisis de proteínas nucleares previamente metiladas, implicadas en el procesado y transcripción del RNA. Las enzimas responsables de estas metilaciones se denominan proteína-arginina metil transferasa (PRMT: Protein arginine Methyl Transferase). La PRMT tipo I es responsable de la formación de restos de ADMA mientras que la PRMT tipo II produce una metilación simétrica de los restos de arginina que originarán posteriormente una dimetil-arginina simétrica (por metilación en restos nitrogenados distintos en vez de la dimetilación en un solo grupo nitrogenado que caracteriza a la ADMA) que no interfiere con la eNOS.

Una vez hidrolizadas las proteínas que contienen los restos ADMA, este metabolito puede tener varios destinos (Figura 4)<sup>12</sup>:

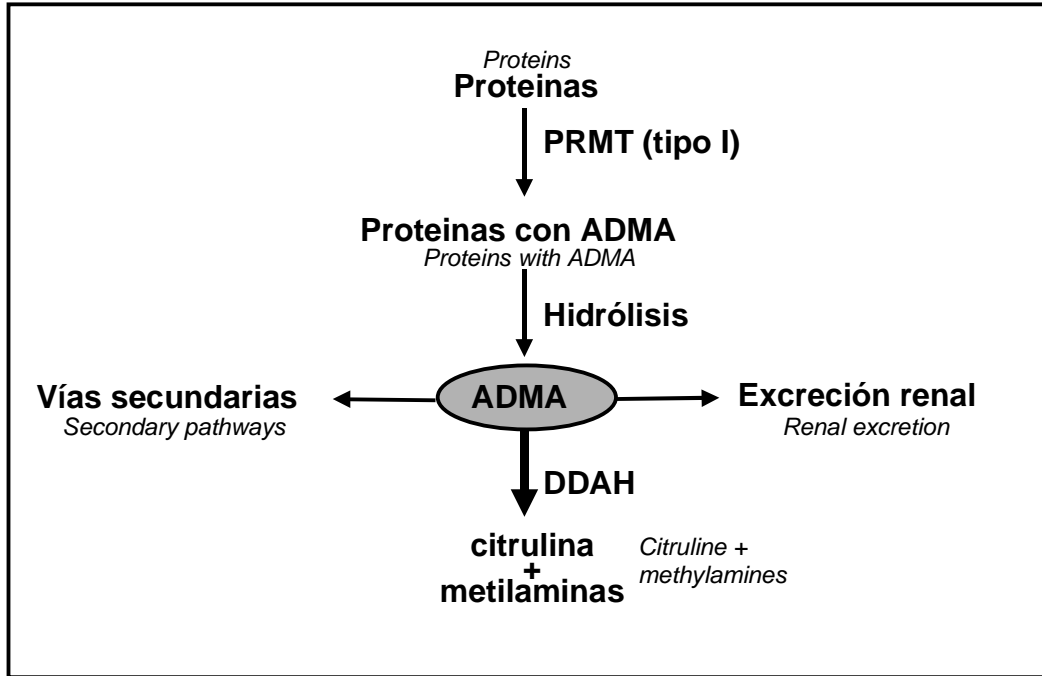
Assymmetric dimethylarginine originates from the hydrolysis of previously methylated nuclear proteins, involved in the processing of RNA. The enzymes responsible for these methylation processes are known as protein-arginine methyl transferase (PRMT). Type I PRMT is responsible for the formation of ADMA residues, while type II PRMT produces a symmetric methylation of arginine residues, which subsequently produces a symmetric dimethylarginine, (through methylation in different nitrogen residues, instead of dimethylation in only one nitrogen group characteristic of ADMA), which does not interfere with eNOS.

Once the proteins containing ADMA residues have been hydrolysed, this metabolite may have several fates (Figure 4)<sup>12</sup>:



**FIGURA 4.** Síntesis y destinos de la dimetil arginina asimétrica (ADMA). PRMT: protein arginine methyl transferase. DDAH: dietilarginina-dimetil-amino-hidrolasa.

**FIGURE 4.** Synthesis and destinations of assymetric dimethyl arginine (ADMA). PRMT: protein arginine methyl transferase. DDAH: dimethylarginine-dimethylaminohydrolase.



- a) Excreción renal
- b) Hidrólisis hasta citrulina y metilaminas. La reacción de hidrólisis está catalizada por la enzima DDAH (dimetilarginina-dimetil-amino-hidrolasa)
- c) Otras vías metabólicas secundarias (reacciones de transaminación en el riñón o reacciones de acetilación en el hígado)

La causa mejor establecida del aumento de las concentraciones plasmáticas del ADMA es la insuficiencia renal. Además, este metabolito puede aumentar por la inhibición de la enzima responsable de su catabolismo: la DDAH. Esta inhibición la pueden originar en general las especies reactivas de oxígeno y, especialmente, las LDL oxidadas<sup>12</sup>. También se ha demostrado el efecto inhibitorio de la homocisteína<sup>13</sup>.

Conviene señalar que las concentraciones endoteliales de óxido nítrico no descienden solamente a causa de la disminución de su síntesis. Como ocurre en el proceso aterosclerótico, la producción excesiva del radical superóxido hace que esta molécula reaccione

- a) Renal excretion
- b) Hydrolysis to citrulline and methylamine catalysed by the DDAH enzyme (dimethylarginine-dimethyl-amino-hydrolase).
- c) Other secondary metabolic pathways (transamination reactions in the kidney or acetylation reactions in the liver).

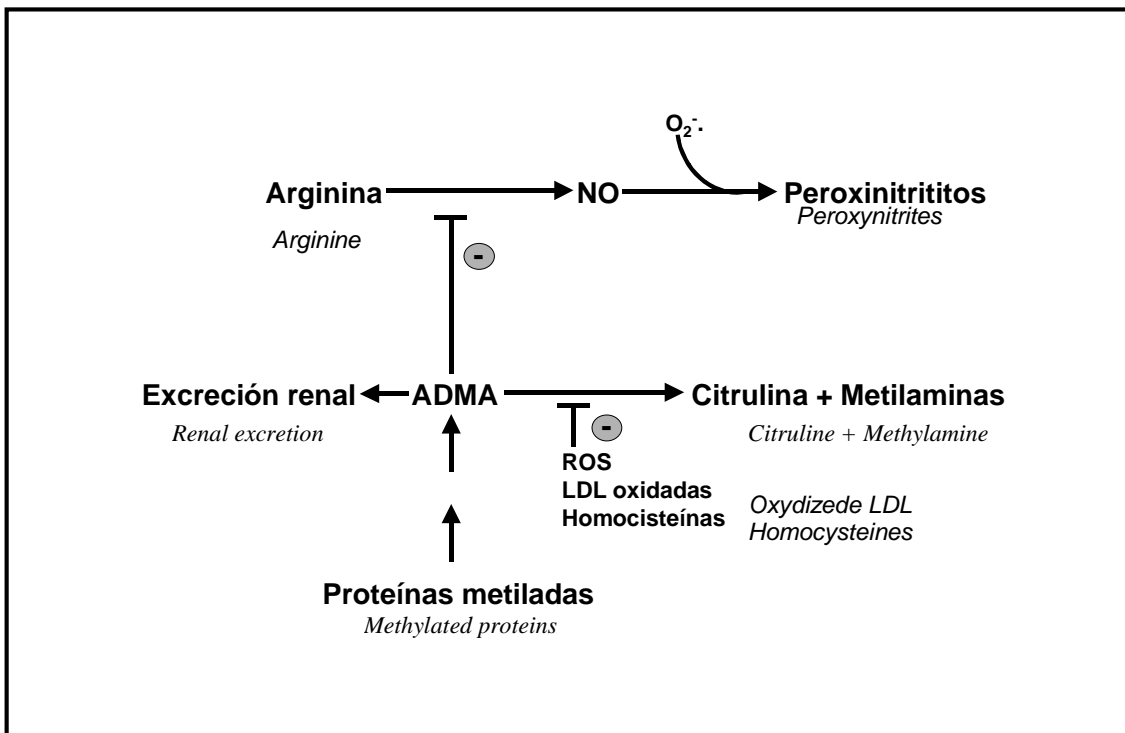
The best established cause for the increase in ADMA plasmatic concentrations is renal insufficiency. Furthermore, levels of this metabolite may increase, due to the inhibition of the enzyme responsible for its catabolism: DDAH. Such an inhibition may be generally triggered by reactive oxygen species, especially oxidized LDL<sup>12</sup>. The inhibitory effect of homocysteine has also been demonstrated<sup>13</sup>.

It is important to point out that endothelial nitric oxide concentrations do not only decrease due to a decrease in its synthesis. As occurs in the case of atherosclerotic processes, excessive production of the superoxide radical causes this molecule to react with nitric oxide, decreasing its concentration and leading to the formation of a very reactive oxidative species known as peroxynitrite (Figure 5)<sup>14</sup>.

con el óxido nítrico, disminuyendo su concentración y originando una especie oxidativa muy reactiva denominada peroxinitrito (Figura 5)<sup>14</sup>.

**FIGURA 5.** Regulación del catabolismo de la dimetil arginina asimétrica (ADMA) por diversos metabolitos. ROS: radicales libres del oxígeno

**FIGURE 5.** Regulation of the catabolism of assymetric dimethyl arginine (ADMA) by varying metabolites. ROS: free radical oxygen species.



**ESTUDIOS DE SUPLEMENTACIÓN CON ARGININA**

**ARGININE SUPPLEMENTATION STUDIES**

Se han realizado bastantes estudios clínicos de suplementación con arginina, generalmente en pacientes hipercolesterolémicos o con enfermedad coronaria establecida<sup>15</sup>. Se han empleado cantidades de arginina entre 9 y 21 g durante períodos que oscilan entre los tres días y los seis meses. Los principales métodos para verificar la acción vasoprotectora de la arginina han sido la medida de la dilatación de la arteria braquial mediada por flujo, la medida del flujo coronario estimulado por acetil-colina, los ensayos de adhesión de monocitos y la medida directa de moléculas de adhesión solubles. En la mayor parte de estos trabajos se pudo observar una mejora de la función endotelial, siendo pocos los casos

Numerous studies on clinical supplementation with arginine have been carried out, generally in hypercholesterolemic subjects or in coronary disease patients<sup>15</sup>. Arginine quantities between 9 and 21 gr have been tested for periods of three days to six months. The main methods used to verify the vasoprotective properties of the compound include the measurement of flux-induced brachial artery dilatation, the measurement of coronary flow stimulated by acetylcholine, monocyte adhesion tests and the direct measurement of soluble adhesion molecules. In the great majority of these studies an improvement in endothelial function was observed, while no improvement was found in only a few cases. These

en los que no se observó ninguna mejoría. Todo ello sugiere que la suplementación con arginina favorece a corto plazo la función endotelial. La protección cardiovascular a largo plazo no está tan clara y se necesitan estudios posteriores. De hecho, la suplementación con arginina a animales de experimentación con aterosclerosis establecida se ha mostrado contraproducente<sup>16</sup>. Es posible que en estos casos se induzca la iNOS y se formen cantidades excesivas de óxido nítrico, originando entonces el radical peroxinitrito como se acaba de comentar. En cualquier caso, parece claro que la determinación del ADMA plasmático es un buen marcador biológico de riesgo aterogénico, especialmente en enfermos con problemas renales<sup>17</sup>.

### OTROS COMPONENTES DE LA DIETA QUE INFLUYEN EN LA SÍNTESIS DE ÓXIDO NÍTRICO

Existen muchos componentes de la dieta que pueden interactuar con la síntesis de óxido nítrico a partir de la arginina, tal como se ha revisado con detalle recientemente<sup>18</sup>. Algunas de estas interacciones contribuyen a explicar el papel de estos compuestos en la prevención o en el desarrollo de alteraciones patológicas diversas.

#### a) *Proteínas*

Además de la arginina, hay otros aminoácidos que interactúan con la formación de óxido nítrico. Así, se ha descrito que la glutamina inhibe dicha síntesis en las células endoteliales vasculares y en el cerebro, mientras que el glutamato activa la producción neuronal de óxido nítrico. Por otra parte, está bien establecido que la lisina inhibe dicha síntesis en el endotelio vascular. Esta inhibición se explica porque tanto la lisina como la arginina comparten el mismo transportador celular. Por tanto, concentraciones altas de lisina pueden disminuir la entrada de arginina en las células endoteliales, especialmente cuando los valores plasmáticos de arginina sean bajos. Este mecanismo explica el clásico antagonismo nutricional lisina-arginina ya comentado.

results indicate that at least in the short term, arginine supplementation favours endothelial function. However, its effect on long term cardiovascular protection is not so clear and requires further study. In fact, arginine supplementation in experimental animals with established atherosclerosis has been shown to be counter productive<sup>16</sup>. It is possible that in such cases, on induction of iNOS, excessive quantities of nitric oxide are formed, which as previously mentioned, results in the production of the peroxynitrite radical. In any case, it seems clear that the determination of plasmatic ADMA is a good biological marker of atherogenic risk, especially in the case of patients presenting renal problems<sup>17</sup>.

### OTHER DIETARY COMPONENTS THAT INFLUENCE THE SYNTHESIS OF NITRIC OXIDE

According to recent detailed revisions<sup>18</sup>, there are many dietary components which may interact in the synthesis of nitric oxide from arginine. Some of these interactions have contributed to explain the role of these compounds in the prevention or the development of various pathological alterations.

#### a) *Proteins*

In addition to arginine, there are other amino acids which interact with nitric oxide formation processes. Thus glutamine has been described as having an inhibitory effect in vascular endothelial cells, while glutamate activates the neuronal production of nitric oxide. On the other hand, it has been well established that lysine inhibits synthesis NO in the vascular endothelium. This can be explained by the fact that both lysine and arginine share the same cellular transporter. Therefore, high concentrations of lysine will decrease the entry of arginine into endothelial cells, especially when plasmatic values of arginine are low. This mechanism explains the previously mentioned classical nutritional lysine-arginine antagonism.

### b) Grasas

La grasa saturada inhibe la producción de óxido nítrico mientras que la grasa poliinsaturada la favorece, aunque no se conocen los mecanismos de estas interacciones. En contraste con los ácidos grasos poliinsaturados, el ácido oleico inhibe la actividad de la eNOS, disminuyendo, por tanto, la síntesis de óxido nítrico. De hecho, la infusión intravenosa de ácido oleico en ratas produce hipertensión.

Como es bien conocido, la ingesta excesiva de grasa saturada se suele traducir en el aumento de las concentraciones de colesterol en sangre, fundamentalmente por el incremento de las LDL circulantes. El efecto negativo de la hipercolesterolemia sobre la síntesis de óxido nítrico y la función endotelial está muy bien documentada. Las LDL oxidadas pueden actuar por diversos mecanismos:

- Inhibición del transporte de la arginina desde el plasma sanguíneo al endotelio vascular
- Disminución de la síntesis de la eNOS
- Interferencia con el tráfico intracelular de la eNOS desde el retículo endoplásmico a las caveolas de la membrana.
- Incremento de las concentraciones intracelulares de ADMA
- Disminución de la concentración del coenzima reducido  $BH_4$

Por otra parte, el incremento de las concentraciones intraendoteliales de colesterol favorece la síntesis de una proteína de membrana, la caveolina-1. Esta proteína se une a la eNOS, formando un complejo inactivo.

Todos estos procesos constituyen la base de la explicación biológica del efecto positivo de las estatinas (fármacos hipocolesterolemiantes) sobre la función endotelial.

### c) Vitaminas

Las vitaminas antioxidantes favorecen la síntesis de óxido nítrico por diversos mecanismos entre los cuales se puede destacar el efecto preventivo sobre la oxidación de las LDL. Además, la vitamina C protege al coenzima  $BH_4$  de la oxidación, favoreciendo, por tanto,

### b) Fat

Saturated fats inhibit the production of nitric oxide, while polyunsaturated fats produce the contrary effect. However, the mechanisms that cause such interactions are as yet unknown. In contrast to polyunsaturated fatty acids, oleic acid inhibits eNOS activity, thus reducing nitric oxide synthesis. In fact the intravenous infusion of oleic acid in rats produces hypertension.

It is a well known fact that the excessive intake of saturated fat usually results in an increase in blood cholesterol concentrations, due fundamentally to the increase in circulating LDL. The negative effect of hypercholesterolemia on the synthesis of nitric oxide and endothelial function has been very well documented. Oxidized LDL may act through several mechanisms:

- Inhibiting the transport of arginine from blood plasma to the vascular endothelium
- Reducing the synthesis of eNOS
- Interfering with eNOS intracellular traffic from the endoplasmic reticulum to the caveolae of the membrane.
- Increasing intracellular concentrations of ADMA
- Reducing concentrations of the reduced coenzyme  $BH_4$

On the other hand, the increase in intraendothelial cholesterol aids the synthesis of the membrane protein caveolin-1, which binds with eNOS to form an inactive complex.

All of such processes constitute the biological basis to explain the positive effects of statins (cholesterol-lowering drugs) on endothelial function.

### c) Vitamins

Antioxidant vitamins aid the synthesis of nitric oxide through several mechanisms, among which the preventive effect on LDL oxidation is a noteworthy example. Furthermore, vitamin C protects the coenzyme  $BH_4$  from oxidation and, as a consequence, eNOS function. Vitamin E, on the other hand, induces the synthesis of this enzyme.

el funcionamiento de la eNOS, mientras que la vitamina E induce la síntesis de esta enzima.

La vitamina A reduce las concentraciones intracelulares de ADMA mediante la estimulación de la síntesis de la dimetilarginina-dimetilamino-hidrolasa, enzima responsable de su degradación.

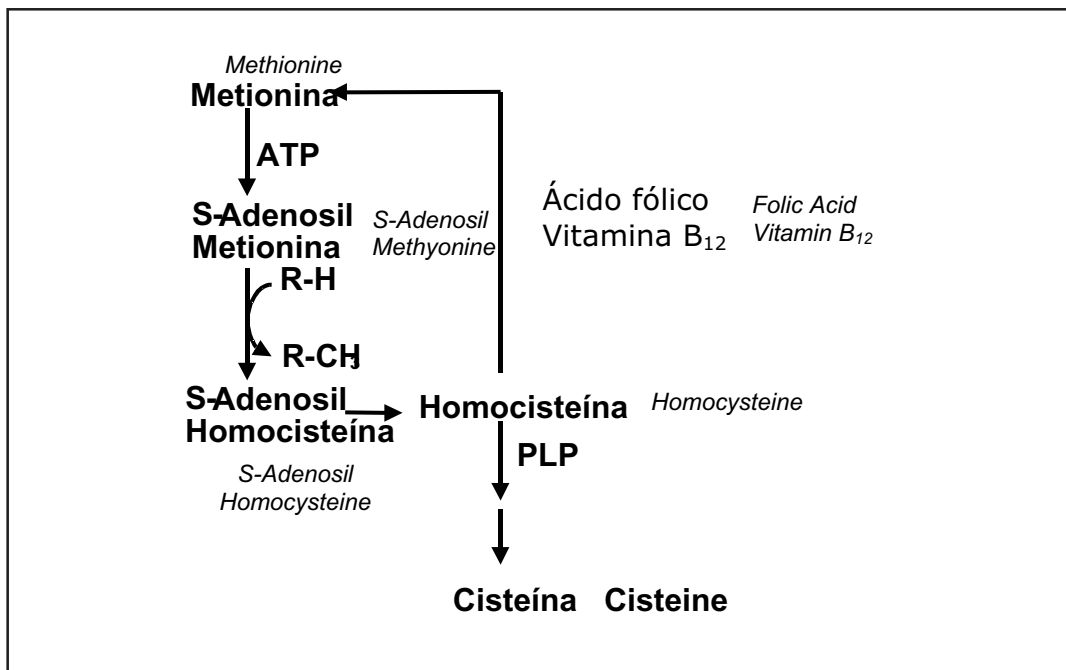
Está muy bien establecido en la actualidad el papel aterogénico de la homocisteína, un aminoácido no proteínogénico que se sintetiza a partir de la metionina. Como se puede ver en la Figura 6, el acúmulo de la homocisteína puede originarse por el mal funcionamiento de las vías metabólicas que lo utilizan: la formación de metionina y la formación de cisteína. En la primera de estas rutas se necesita el concurso del ácido fólico y de la vitamina B<sub>12</sub>. En la segunda ruta se necesita la colaboración de la vitamina B<sub>6</sub>. Por tanto, la deficiencia relativa de alguna de estas vitaminas, especialmente del ácido fólico, pueden conducir al aumento de la concentración de homocisteína en sangre.

Vitamin A reduces the intracellular concentrations of ADMA through the stimulation of dimethylarginine-dimethylamino-hydrolase, the enzyme responsible for its degradation.

Currently, the atherogenic role of homocysteine, a non-proteinogenic amino acid synthesised from methionine, has been well established. In Figure 6, it can be seen that the accumulation of homocysteine may be attributable to the poor functioning of the metabolic pathways that use it: the formation of methionine and the formation of cysteine. On the first of these routes, the concurrence of folic acid and vitamin B<sub>12</sub> is required, while on the second, vitamin B<sub>6</sub> is needed. Consequently, a relative deficiency in some of these vitamins, especially folic acid, may lead to an increase in homocysteine in blood.

**FIGURA 6.** Vías metabólicas implicadas en el papel aterogénico de la homocisteína.

**FIGURE 6.** Metabolic pathways involved in the atherogenic role of homocysteine.



La homocisteína parece tener efectos aterogénicos directos sobre el endotelio vascular. Pero, además, este aminoácido puede contribuir a la disfunción endotelial porque origina un incremento de ADMA mediante la inhibición de la síntesis de la dimetilarginina-dimetilamino-hidrolasa, enzima que, como ya se ha considerado, degrada este inhibidor endógeno de la eNOS a citrulina y metilaminas<sup>13</sup>.

Es interesante resaltar que se han descrito muy recientemente incrementos de homocisteína y de ADMA y disminución de óxido nítrico en pacientes con la enfermedad de Alzheimer<sup>19</sup>. Esto sugiere que la inhibición de la síntesis de óxido nítrico por el ADMA en las neuronas puede contribuir al declive en las funciones cognitivas en esta situación. De hecho, la administración oral de arginina estimula estas funciones en personas ancianas con enfermedad cerebrovascular<sup>20</sup>.

#### d) *Minerales*

El funcionamiento de la eNOS necesita el concurso de la calmodulina y de iones cálcicos. Esto explica que una dieta muy rica en calcio atenúe el desarrollo de hipertensión en ratas con hipertensión espontánea. La eNOS necesita también la cooperación en su actividad enzimática del grupo hemo, que contiene iones ferrosos. Es por ello seguramente que la dieta deficiente en hierro produce una disminución de la actividad de la óxido nítrico sintasa en ratas. El efecto de otros minerales en la producción de óxido nítrico está menos clara. Así, el cinc favorece la actividad de la óxido nítrico sintasa pero la inhibe cuando se utilizan concentraciones elevadas. En cambio, el magnesio favorece esta actividad de manera dosis-dependiente.

#### e) *Fitoestrógenos, etanol y polifenoles*

Es bien conocido que el estradiol incrementa la actividad de la eNOS y la producción endotelial de óxido nítrico. De manera análoga, los fitoestrógenos aumentan la producción de óxido nítrico tanto en animales como en humanos, lo que puede explicar el

Homocysteine seems to have a direct atherogenic effect on the vascular endothelium. Furthermore, this amino acid may contribute to endothelial dysfunction, given that it produces an increase in ADMA the inhibition of the synthesis of dimethylarginine-dimethylamino-hydrolase, an enzyme that, as already mentioned, degrades this endogenous inhibitor of eNOS to citrulline and methylamine<sup>13</sup>.

It is interesting to note that very recently, increases in homocysteine and ADMA, as well as reductions in nitric oxide, have been described in patients suffering from Alzheimer's disease<sup>19</sup>. This points to the hypothesis that the inhibition of nitric oxide synthesis by ADMA in the neurons may contribute to a decline in cognitive function. In fact, oral administration of arginine has been observed to stimulate these functions in elderly persons presenting cerebral vascular disease<sup>20</sup>.

#### d) *Minerals*

eNOS functioning requires the concurrence of calmodulin and calcium ions. This would explain the reason why a diet that is very rich in calcium reduces the development of hypertension in rats presenting spontaneous hypertension. eNOS also requires the co-operation of the heme group, which contain ferrous ions. For this reason, a dietary deficiency of iron produces a reduction in nitric oxide synthase activity in rats. The effect of other minerals on the production of nitric oxide is not as clear. Zinc, on one hand favours nitric oxide synthase activity, but on the other, inhibits such activity when high concentrations are used. In contrast, magnesium favours this activity on a dose dependent basis.

#### e) *Phytoestrogens, ethanol and polyphenols*

It is already well known that estradiol increases eNOS activity and the endothelial production of nitric oxide. Similarly, phytoestrogens increase the production of nitric oxide, both in animals and in humans. This could explain why foods rich in phytoestrogens, such as soya, have a protective cardiovascular effect.



efecto protector cardiovascular de los alimentos ricos en fitoestrógenos, como la soja.

El consumo moderado de alcohol en humanos incrementa la producción sistémica de óxido nítrico a través de la estimulación de la eNOS endotelial. En cambio, la ingestión crónica de cantidades relativamente elevadas de alcohol disminuye dicha producción y produce problemas cardiovasculares en experimentación animal. Los polifenoles en general, y los que se encuentran en el vino tinto (como el resveratrol) en particular, estimulan también la producción endotelial de óxido nítrico en ratas. El mecanismo de estas acciones no se conoce todavía.

The moderate consumption of alcohol in humans increases the systemic production of nitric oxide through the stimulation of endothelial eNOS. In contrast, the chronic intake of relatively high quantities decreases NO production and produces cardiovascular problems in experimental animals. Polyphenols in general, and particularly those present in red wine (such as resveratrol), also stimulate the production of endothelial nitric oxide in rats. The mechanism of these effects is as yet, still unknown.

## BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Barbul A. Arginine: biochemistry, physiology, and therapeutic implications. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 1986;10:227-238
2. Suchner U, Heyland DK, Peter K. Immune-modulatory actions of arginine in the critically ill. *British Journal of Nutrition* 2002;87(Suppl.1): S121-S132
3. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-42
4. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-126
5. Kinlay S, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in coronary artery disease and implications for therapy. *Am J Cardiol* 1997;80: 11-I-16-I
6. De Caterina R. Endothelial dysfunction: common denominators in vascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2000;11:9-23
7. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001;357:593-615
8. Kritchevsky D. Dietary protein, cholesterol and atherosclerosis. *J Nutr* 1995;125(Suppl):589S-593S
9. Appel LJ. The effects of protein intake on blood pressure and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2003;14:55-59
10. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992;339:572-5
11. Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF *et al.* Asymmetric dimethylarginine: a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998;98(18):1842-7
12. Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2032-37
13. Böger RH, Lentz SR, Bode-Böger SM, Knapp HR, Haynes WG. Elevation of asymmetrical dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inaemia in humans. *Clin Sci (Lond)* 2001;100 (2):161-7
14. Stamler JS, Hausladen A. Oxidative modifications in nitrosative stress. *Nature Struct Biol* 1998;5:247-249
15. Brown AA, Hu FB. Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2001;73:673-686
16. Chen J, Kuhlencordt P, Urano F, Ichinose H, Astern J, Huang PL. Effects of chronic treatment with L-arginine on atherosclerosis in apoE knockout and apoE/inducible NO synthase double-knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:97-103
17. Zoccali C, Bode-Böger SM, Mallamaci F, Benedetto FA, Tripepi G, Malatino LS *et al.* Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet* 2001;358:2113-17
18. Wu G, Meininger CJ. Regulation of nitric oxide synthesis by dietary factors. *Annu Rev Nutr* 2002;22:61-86
19. Selley ML. Increased concentrations of homocysteine and asymmetrical dimethylarginine and decreased concentrations of nitric oxide in the plasma of patients with Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 2003;24:903-907
20. Ohtsuka Y, Nakaya J. Effect of oral administration of L-arginine on senile dementia. *Am J Med* 2000;108(5):439.