

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DPTO. DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA



**DISFUNCION ENDOTELIAL ASOCIADA A LA
DIABETES MELLITUS. INTERACCIÓN ENTRE
INFLAMACIÓN E HIPERGLUCEMIA**

Memoria que para optar al título de Doctor en Farmacología y Fisiología
presenta

ERIKA PALACIOS ROSAS

Directores

Dr. Carlos Félix Sánchez Ferrer

Catedrático de la Universidad Autónoma de Madrid

Dra. Concepción Peiró Vallejo

Catedrático de la Universidad Autónoma de Madrid

MADRID, 2012

Resumen	I
Summary	II
Abreviaturas	III
Introducción	1
1. DIABETES MELLITUS	1
1.1 <i>Tipos de diabetes mellitus</i>	3
1.2 <i>Diabetes mellitus y alteraciones vasculares</i>	6
2. ENDOTELIO VASCULAR	7
2.1 <i>Factores Vasodilatadores</i>	10
2.1.1 <i>Óxido Nítrico</i>	10
2.1.2 <i>Prostaciclina</i>	12
2.1.3 <i>Factor hiperpolarizante derivado del endotelio</i>	12
2.2 <i>Factores Vasoconstrictores</i>	13
2.2.1 <i>Endotelina</i>	13
2.2.2 <i>Tromboxano A₂</i>	14
2.2.3 <i>Angiotensina II</i>	14
3. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL	15
3.1 <i>Glucosa y disfunción endotelial</i>	15
3.2 <i>Glicosilación no enzimática de proteínas y disfunción endotelial</i>	16
3.3 <i>Inflamación y disfunción endotelial</i>	18
3.4 <i>Estrés oxidativo y disfunción endotelial</i>	21
3.4.1 <i>Fuentes de estrés oxidativo</i>	22
3.4.1.1 <i>Desacoplamiento de la óxido nítrico sintasa</i>	23
3.4.1.2 <i>Xantina oxidasa (XO)</i>	23
3.4.1.3 <i>Vía del sorbitol y el mio-inositol</i>	23
3.4.1.4 <i>Vía de la protein kinasa C</i>	24
3.4.1.5 <i>Sobreproducción mitocondrial de aniones superóxido</i>	25

3.4.1.6 NADPH oxidasa.....	25
3.4.1.7 Glucosa 6-fosfatodeshidrogenasa.....	30
Objetivos.....	32
Materiales y Métodos.....	34
1. Animales de experimentación.....	34
2. Reactividad vascular en microvasos mesentéricos.....	35
2.1. Protocolo experimental.....	37
3. Obtención de cultivos celulares.....	38
4. Caracterización celular.....	40
5. Determinación de la actividad NADPH-oxidasa en células endoteliales.....	41
6. Determinación de la actividad NADPH-oxidasa en tejido.....	43
7. Determinación de citoquinas en suero de animales.....	44
8. Soluciones y fármacos empleados.....	44
9. Análisis estadístico.....	46
Resultados.....	47
1. Reactividad vascular en microvasos mesentéricos de rata SD control (Grupo 1).....	47
1.1. Influencia de la D-glucosa extracelular sobre la relajación a ACh.....	47
1.2. Efecto de IL1- β sobre la relajación inducida por ACh. Influencia de la concentración extracelular de D-glucosa.....	48
1.3. Efecto de IL1- β sobre la relajación inducida por Nitroprusiato Sódico (NPS.) Influencia de la concentración extracelular de D-glucosa.....	52
1.4. Interferencia farmacológica del efecto de IL1- β sobre la relajación a ACh.....	54
1.4.1. Efecto de anakinra (AK).....	54
1.4.2. Efecto de indometacina.....	56
1.4.3. Efecto de I400W.....	57
1.4.4. Efecto de tempol.....	58
1.4.5. Efecto de apocinina.....	60
1.4.6. Efecto de 6-ANAM.....	62
2. Actividad de la enzima NADPH-oxidasa.....	64
2.1. Actividad NADPH oxidasa en cultivos celulares.....	64

2.2. Actividad NADPH oxidasa en microvasos mesentéricos aislados de rata SD no diabética (Grupo 1).....	66
3. Reactividad vascular en microvasos mesentéricos de rata con DM inducida con STZ (Grupo 2).....	69
3.1. Disfunción endotelial en ratas SD con DM inducida por STZ.....	69
3.2. Interferencia farmacológica de la disfunción endotelial en ratas SD diabéticas.....	71
3.3. Influencia del bloqueo de los receptores de IL-1 con Anakinra sobre la disfunción endotelial diabética.....	75
4. Actividad de NADPH oxidasa en microvasos mesentéricos de animales diabéticos.....	80
5. Determinación de citoquinas pro-inflamatorias circulantes en ratas SD diabéticas.....	82
Discusión.....	83
Conclusiones.....	97
Conclusions.....	100
Referencias.....	103

Este trabajo ha sido subvencionado con ayudas del Plan Nacional de I+D+I (SAF2011-28011 y SAF2011-24648), la Acción integrada hispano-alemana HD2008-0056 y la Sociedad Española de Farmacología/Almirall Prodesfarma. Erika Palacios Rosas ha sido la beneficiaria de una beca de la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo desde 2009 hasta 2012.

ABREVIATURAS

6-ANAM: 6-aminonicotinamide.
AC: Adeinilatociclasa.
ACh: Acetilcolina.
ADP: Adenín difosfato.
AGEs: Productos finales de glicosilación avanzada.
Ang II: Angiotensina II.
AK: Anakinra.
AR: Aldosa reductasa.
ATP: Adenín trifosfato.
ANOVA: Análisis de la varianza.
BBS: Solución tampón bicarbonatada.
BH₄: Tetrahidrobiopterina.
BK: Bradiquinina.
BSA: Albúmina de suero bovino.
COX-1: Ciclooxygenasa-1.
COX-2: Ciclooxygenasa-2.
COX: Ciclooxygenasa.
DAG: Diacilglicerol.
DG: D-glucosa.
DM: Diabétes mellitus.
DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco.
ECA: Enzima convertidora de angiotensina.
ECE: Enzima convertidora de endotelina.
ECGS: Suplemento de crecimiento de células endoteliales.
EDHF: Factor hiperpolarizante derivado del endotelio.
EDTA: Ácido etilendiamina-tetraacético.
EGTA: Etilenglicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetra ácido.
eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial.
ERK: Quinasas reguladas por señales extracelulares.
ES: Error estándar.
ET: Endotelina.
FAD: Flavin adenin dinucleótido.
FCS: Suero fetal de ternera.
FMN: Flavin mononucleótidos.
G6PD: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
GC: Guanilato ciclasa.
GMPc: Guanosín monofosfato cíclico.
H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.

HbA₁: Hemoglobina glicosilada A₁.
HbA_{1c}: Hemoglobina glicosilada A_{1c}.
HSA: Albúmina de suero humano.
HUVEC: Células endoteliales de vena de cordón umbilical humano.
ICAM: Moléculas de adhesión intracelular.
i.p.: Intraperitoneal.
IL: Interleuquina.
IL-1 β : Interleuquina-1 β .
IL-1R1: Receptor tipo I de interleuquina-1 β .
iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible.
KHS: Solución fisiológica Krebs-Henseleit.
L-NAME: N^G-nitro-L-arginina metil éster.
MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos.
MPO: Mieloperoxidasa.
NA: Noradrenalina.
NADPH: Dinucleotido de nicotiamida-adenina fosfato.
NF-kB: Factor de transcripción nuclear kB.
NO: Óxido nítrico.
NOS: Sintasa de óxido nítrico.
NPS: Nitroprusiato sódico.
O₂⁻: Anión superóxido.
·OH: Radical hidroxilo.
OMS: Organización Mundial de la Salud.
ONOO·: peroxinitrito.
PARP: PoliADP-robosa polimerasa.
PBS: Solución salina tamponada con fosfato.
PGI₂: Prostaciclina.
PKC: Proteína quinasa C.
ROS: Especies reactivas de oxígeno.
rpm: Revoluciones por minuto.
SD: Ratas Sprague-Dawley.
SOD: Superóxido dismutasa.
STZ: Estreptozotocina.
sGC: Guanilato ciclasa soluble.
TNF- α : Factor de necrosis tumoral α .
TXA₂: Tromboxano A₂.
VCAM: Moléculas de adhesión de células vasculares.
XD: Xantina deshidrogenasa.
XO: Xantina oxidasa.

RESUMEN

La vasculopatía diabética es una enfermedad crónica inflamatoria de bajo grado que se ha relacionado con la hiperglucemia. La disfunción endotelial es una manifestación temprana de la vasculopatía diabética y en la actualidad existen resultados controvertidos sobre como la elevación de la D-glucosa deteriora la vasodilatación mediada por endotelio. Por otro lado, tanto en la diabetes mellitus tipo 1 como tipo 2, se ha propuesto un papel relevante para las citoquinas inflamatorias, como interleuquina-1 β (IL-1 β), en la patogenia de la enfermedad, así como en el desarrollo de vasculopatía diabética. Sin embargo, se conoce muy poco sobre la capacidad de estas citoquinas en la aparición de la disfunción endotelial. En el presente trabajo se han estudiado los posibles mecanismos implicados en la aparición de disfunción endotelial asociada a la diabetes mellitus.

En la primera parte del estudio, en microvasos mesentéricos de rata Sprague-Dawley controles, se ha demostrado que el mero aumento de las concentraciones extracelulares de D-glucosa no es suficiente para inducir un deterioro en las relajaciones dependientes de endotelio producidas por ACh. Sin embargo, la preincubación de los vasos con la citoquina pro-inflamatoria IL-1 β durante 30 min ó 2 h produjo disfunción endotelial en estos microvasos de manera concentración-dependiente. La disfunción endotelial inducida por IL-1 β se potenció por el aumento de las concentraciones extracelulares de D-glucosa, sugiriendo que la hiperglucemia modula la alteración de la función endotelial inducida por la IL-1 β . El tratamiento de los microvasos mesentéricos de rata con el antagonista recombinante del receptor de IL-1, anakinra (AK), produjo un bloqueo concentración dependiente de la disfunción endotelial causada por IL-1 β , tanto en un medio con D-glucosa normal como en presencia de concentraciones elevadas de la misma.

La disfunción endotelial inducida por IL-1 β , así como su potenciación en presencia de alta D-glucosa, está relacionada con un aumento de la actividad de la

enzima NADPH-oxidasa, medida mediante estudios de quimioluminiscencia por lucigenina, capaz de producir O_2^- e interferir con las relajaciones endotelio-dependientes mediadas por el ON. En este sentido, la disfunción endotelial por IL-1 β mejora con tempol, un barredor de O_2^- , con el bloqueo de la NADPH-oxidasa con apocinina y mediante la inhibición de la ruta de las pentosas fosfato (necesaria para el suministro de NADPH) con 6-ANAM.

En la segunda parte del trabajo, se estudió la función endotelial en un modelo agudo de diabetes tipo 1, inducido por la administración de estreptozotocina. En microvasos mesentéricos obtenidos de este modelo de diabetes experimental se produjo un deterioro de la relajación endotelio-dependiente inducida por ACh transcurridas dos semanas de evolución de la enfermedad. La disfunción endotelial observada estaba mediada por un aumento del estrés oxidativo asociado a la activación de la enzima NADPH-oxidasa, medida mediante estudios de quimioluminiscencia por lucigenina. Al igual que ocurre con la alteración de la función endotelial originada por IL-1 β , la disfunción endotelial diabética mejora con tempol, un barredor de O_2^- , con el bloqueo de la NADPH-oxidasa con apocinina y mediante la inhibición de la ruta de las pentosas fosfato (necesaria para el suministro de NADPH) con 6-ANAM.

En este modelo agudo de diabetes experimental, la función endotelial de los microvasos mesentéricos se restauró mediante el tratamiento de los animales con el antagonista competitivo de los receptores para IL-1, anakinra. La mejoría de la función endotelial se asoció a una inhibición de la actividad NADPH-oxidasa en los vasos obtenidos de los animales tratados. Por tanto, la citoquina pro-inflamatoria IL-1 β puede tener un papel relevante en la disfunción endotelial asociada a la diabetes mellitus, aunque sus niveles plasmáticos no se incrementaron significativamente en los animales diabéticos.

En conclusión, estos hallazgos indican que la hiperglucemia *per se* no es suficiente para producir directamente disfunción endotelial, aunque puede exacerbar los efectos de una respuesta inflamatoria en curso, producida por citoquinas del tipo de la IL-1 β , que podrían estar mediando la disfunción endotelial asociada a la diabetes mellitus, del mismo modo que participan en distintos procesos inflamatorios relacionados con la enfermedad. El mecanismo activado por estas citoquinas puede ser la enzima NADPH-oxidasa vascular, con el consiguiente aumento en la producción de O $_2^{\cdot-}$. Finalmente, este trabajo sugiere que las aproximaciones terapéuticas para el tratamiento de la vasculopatía diabética deberían no sólo disminuir la hiperglucemia, sino también reducir el ambiente pro-inflamatorio vascular. En este sentido, los antagonistas de los receptores para IL-1 constituyen una prometedora posibilidad.

SUMMARY

Diabetic vasculopathy is a chronic low-grade inflammatory disease associated to hyperglycemia. Endothelial dysfunction is an early manifestation of the diabetic vasculopathy and controversial results exist at present to explain how the elevation of D-glucose can impair the endothelium-mediated vasodilatations. On the other hand, both in type 1 and type 2 diabetes mellitus, a prominent role for pro-inflammatory cytokines, such as interleukin-1 β (IL-1 β), has been proposed for the pathogenesis of the disease, as well as in the development of diabetic vasculopathy. Nevertheless, little it is known concerning on the capacity of these cytokines to induce endothelial dysfunction, as well as its relevance in diabetes mellitus.

In the first part of the study, performed in mesenteric microvessels from control Sprague-Dawley rats, it was demonstrated that the mere increase of extracellular D-glucose concentrations was not sufficient to induce an impairment of the endothelium-dependent relaxations to ACh. Nevertheless, the pre-incubation of the microvessels with the pro-inflammatory cytokine IL-1 β during 30 min or 2 h produced a concentration-dependent endothelial dysfunction in these microvessels. The endothelial dysfunction induced by IL-1 β was potentiated by the increase of the extracellular concentrations of D-glucose. The treatment of the rat mesenteric microvessels with the recombinant human IL-1 receptors antagonist, anakinra (AK), produced a concentration-dependent improvement of the endothelial dysfunction caused by IL-1 β , both in normal D-glucose medium as in the presence of high concentrations of the hexose.

The endothelial dysfunction induced by IL-1 β , as well as its enhancement by high D-glucose, was associated with an increase of the NADPH-oxidase enzymatic activity, measured by lucigenin chemiluminescence, which can produce O $_2^-$ that interferes with the endothelium-dependent relaxations mediated by NO. Moreover, the endothelial dysfunction by IL-1 β was improved by treating the vessels with the O $_2^-$ scavenger tempol or the NADPH-oxidase inhibitor apocynin, and by inhibiting the pentose phosphate pathway (necessary for the supply of NADPH) with 6-ANAM.

In the second part of the study, the endothelial function was tested in an acute model of diabetes type 1, induced by the administration of streptozotocin. In mesenteric microvessels

obtained from this experimental model of diabetes, an impairment of the endothelium-dependent relaxations induced by ACh was produced after two weeks of evolution of the disease. The endothelial dysfunction observed in these rats was mediated by an increase of the oxidative stress associated to the activation of the NADPH-oxidase enzyme, measured by lucigenin chemiluminescence studies. As occurs with the alteration of the endothelial function caused by IL-1 β , the diabetic endothelial dysfunction was improved by treating the vessels with the O $_2^-$ scavenger tempol or the NADPH-oxidase inhibitor apocynin, and by inhibiting the pentose phosphate pathway (necessary for the supply of NADPH) with 6-ANAM.

In this acute model of experimental diabetes, the endothelial function of the mesenteric microvessels was restored by the treatment of the animals with the competitive antagonist of the IL-1 receptors, anakinra. The improvement of the endothelial function was associated to an inhibition of the NADPH-oxidase activity in the vessels obtained of these treated animals. Therefore, the pro-inflammatory cytokine IL-1 β can have a relevant role in the endothelial dysfunction associated to the diabetes mellitus, although its plasmatic levels were not significantly increased in the diabetic animals.

In conclusion, these findings indicate that hyperglycemia by itself is not sufficient to directly produce endothelial dysfunction, although it can potentiate the effects of an ongoing inflammatory response, produced by cytokines like IL-1 β , which could be mediating the endothelial dysfunction associated to the diabetes mellitus, in the same way that occurs in different inflammatory processes related to the disease. The mechanism activated by these cytokines can be the vascular NADPH-oxidase enzyme, with the consequent increase in the production of O $_2^-$. Finally, this study suggests that the therapeutic approaches for the treatment of the diabetic vasculopathy should not only diminish the hyperglycemia, but also reduce the vascular pro-inflammatory environment. The antagonists of the receptors for IL-1 seem to be a promising possibility.

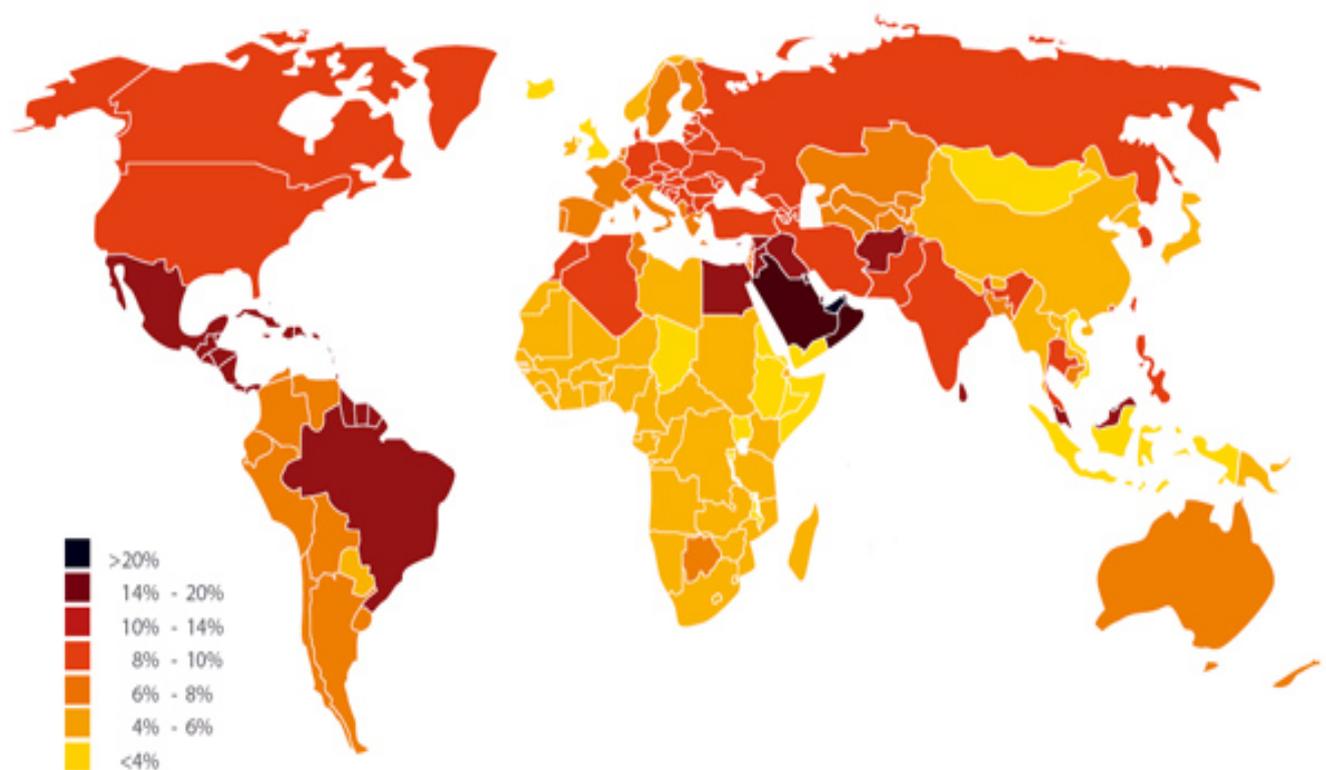
INTRODUCCIÓN

1. DIABETES MELLITUS.

La *Diabetes mellitus* (DM) es una enfermedad crónica degenerativa cuya relevancia en la morbi-mortalidad en el mundo se ha visto incrementada sobre todo en la segunda mitad del siglo XX. De esta manera, la Federación Internacional de Diabetes estima un aumento del 900% en el número de pacientes diabéticos alrededor del mundo, al pasar de 30 millones en 1985 a 300 millones para 2025 (Figura 1). En el mapa se puede apreciar que los países con mayor desarrollo presentan una alta prevalencia estimada, de entre el 10% y el 14% (señalados con el color naranja oscuro). De igual forma, la Organización Mundial de la Salud (OMS) informa que, durante el año 2008, la DM fue la octava causa de muerte a nivel mundial. La DM es una enfermedad cuya frecuencia está aumentando drásticamente en todo el mundo, debido fundamentalmente al envejecimiento de la población y a la presencia de otros factores concomitantes, en particular la obesidad y el sedentarismo, de modo que la OMS estima que más de 220 millones de personas en todo el mundo tienen diabetes. Además, según este estudio, el número de adultos con diabetes en el mundo ha aumentado exageradamente entre 1980 y 2008 (de 153 millones a 347 millones). Como se ha indicado, la diabetes causa alrededor de 3 millones de muertes cada año, una cifra que seguirá aumentando a medida que el número de personas afectadas aumente. Casi el 80% de las muertes por diabetes ocurren en países de bajos y medianos ingresos. Como ejemplos, la diabetes ha aumentado en países insulares del Pacífico, mientras que en las Islas Marshall, un tercio de las mujeres y una cuarta parte de los hombres tienen diabetes. Entre los países ricos, el aumento de la diabetes ha sido más alto en América del Norte y relativamente menor en el oeste de Europa (OMS, 2012)

La OMS define la diabetes mellitus como un desorden metabólico, de múltiples etiologías, caracterizado por una hiperglucemia crónica con alteración del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, y causado por un defecto en la secreción de insulina, en su acción o de ambas cosas. Las consecuencias de sufrir DM incluyen, a largo plazo, la aparición de enfermedades en diversos órganos o sistemas, como la retina, el riñón o el aparato cardiovascular (Fauci *et al.* 2008)

Prevalence estimates of diabetes, 2025



SOURCE: DIABETES ATLAS THIRD EDITION, © INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2006

Fig. 1 Prevalencia mundial de la diabetes mellitus según la Federación Internacional de la Diabetes, 2006.

Para el diagnóstico definitivo de DM se usa la determinación de glucosa en plasma o suero. En ayunas de 10 a 12 horas, las glicemias normales son < 100 mg/dl. En un test de sobrecarga oral de glucosa (75 g), las glicemias normales son: Basal <

100, a los 30, 60 y 90 minutos < 200 y los 120 minutos post sobrecarga < 140 mg/dl. Para que una persona sea diagnosticada con DM, el paciente debe cumplir con alguno de estos tres criterios, lo que debe ser confirmado en otra oportunidad para asegurar el diagnóstico. 1. Glicemia (en cualquier momento) \geq 200 mg/dl, asociada a síntomas clásicos (poliuria, polidipsia, baja de peso), 2. Dos o más glicemias \geq 126 mg/ dl; 3.- Respuesta a la sobrecarga glucosa alterada, con una glicemia a los 120 minutos post sobrecarga \geq 200 mg/dl.

1.1 TIPOS DE DIABETES MELLITUS.

La diabetes mellitus presenta como manifestación común la hiperglucemia. Asimismo, dentro de los procesos patológicos implicados en el desarrollo de la enfermedad, se encuentra la destrucción de células beta pancreáticas, que conlleva una deficiencia de insulina, u otros caracterizados por la resistencia tisular a la insulina. En 2003, un comité de expertos internacionales realizó un informe con las siguientes recomendaciones para la clasificación y el diagnóstico de la diabetes mellitus (Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003):

Diabetes tipo 1

También conocida como diabetes juvenil o diabetes mellitus insulino-dependiente, se caracteriza por la destrucción de las células beta pancreáticas, un proceso autoinmune que suele conllevar un déficit absoluto de insulina. La causa es compleja y aún no se ha esclarecido del todo, aunque se conoce que están involucrados factores genéticos, virus, dieta, así como factores químicos y ambientales. No hay discriminación entre sexo y es más común en la población blanca. El inicio de la enfermedad suele ser agudo y se desarrolla en un periodo de

tiempo de pocos días o semanas. Se ha determinado que el 95% de los pacientes que sufren de diabetes tipo 1 desarrollan dicha enfermedad antes de los 25 años. Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad son polifagia, polidipsia, poliuria, y pérdida de peso en poco tiempo. Los pacientes no responden a tratamientos con antidiabéticos orales y requieren la administración constante de insulina, ya que sin ella desarrollan graves complicaciones metabólicas, como cetoacidosis aguda y coma diabético.

Diabetes tipo 2

Igualmente denominada diabetes mellitus no insulina-dependiente. Es la forma más común de la diabetes, con un 80 al 90% del total de los pacientes afectados y se caracteriza por una alteración en la tolerancia a la glucosa, eventualmente producida por resistencia de los tejidos a la insulina e hiperinsulinemia. (Robbins, 2011). Este tipo de diabetes está asociada con un historial familiar de enfermedad, edad avanzada, obesidad y falta de ejercicio. Es más común en mujeres, negros e hispanos. Es un grupo heterogéneo de pacientes, la mayoría obesos y/o con distribución de grasa predominantemente abdominal y con fuerte predisposición genética no bien definida (multigénica). Su etiología es multifactorial, ya que, además de los fundamentos genéticos está condicionada por factores relacionados con los hábitos de vida. Este tipo de diabetes responde al tratamiento con antidiabéticos orales y muchos pacientes pueden tratarse sólo con una dieta adecuada y ejercicio físico. Con niveles de insulina plasmática normal o elevada, sin tendencia a la acidosis, responden a dieta e hipoglicemiantes orales, aunque muchos con el tiempo requieren de insulina para su control, pero ella no es indispensable para preservar la vida.

Diabetes Gestacional

Es la diabetes que, siguiendo la definición de la OMS, se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa diagnosticada durante el embarazo. Generalmente desaparece cuando finaliza el embarazo, pero supone un riesgo importante para desarrollar la enfermedad posteriormente. La DM gestacional tiene una prevalencia que varía del 1 al 14% de los embarazos.

Otros Tipos Específicos de Diabetes

Comprende en un listado ordenado de la A a la H, los tipos de diabetes de causa conocida y cuya lista se podrá incrementar a medida que progrese la investigación. Por el momento constituyen una minoría. Se ubican en este grupo los defectos genéticos en la función de la célula beta. También se incluyen los defectos genéticos en la acción de la insulina, como la insulinoresistencia Tipo A, con mutaciones en el receptor de la insulina, hiperinsulinemia, hiperglucemia y en algunas mujeres, virilización y ovario poliquístico. Corresponden, además, a este tipo de diabetes las enfermedades del páncreas exocrino como pancreatitis infecciosa, carcinoma, fibrosis quística, hemocromatosis y otras. Figuran en este listado las endocrinopatías que provocan hiperglicemia, la diabetes inducida por drogas o agentes químicos, infecciones virales que provocan destrucción específica de la célula beta y otras formas infrecuentes de diabetes mediada inmunológicamente. Asimismo, se incluye otros síndromes genéticos ocasionalmente asociados a diabetes, como el síndrome de Down.

1.2 DIABETES MELLITUS Y ALTERACIONES VASCULARES.

Las complicaciones vasculares de la diabetes constituyen la primera causa de morbi-mortalidad en estos pacientes (Beckman *et al.*, 2002). En pacientes diabéticos, alteraciones como aterosclerosis, hipertensión o enfermedad coronaria son mucho más frecuentes que en el resto de la población y representan el principal factor de riesgo (Stratton *et al.*, 2000). La vasculopatía diabética se ha dividido habitualmente en microangiopatía y macroangiopatía. Las macroangiopatías afectan principalmente a los grandes vasos (coronarias, carótida, arterias de los miembros inferiores) produciendo grandes placas de lípidos en las arterias y calcificación de la túnica media. En pacientes diabéticos estas complicaciones son la principal causa de isquemia, gangrena isquémica de miembros inferiores, infarto de miocardio e infarto cerebral. Sin embargo, la mayoría de las complicaciones vasculares ocurren en la microcirculación. Los vasos afectados muestran cambios morfológicos como el engrosamiento de la membrana basal, lo que provoca una disminución del aporte de nutrientes a los tejidos y de la eliminación de los productos de desecho, lo que conduce a lesiones tisulares irreparables. La retinopatía y la nefropatía diabética son procesos característicos de microangiopatía.

Al inicio de la enfermedad predominan las alteraciones funcionales que afectan al endotelio que recubre la luz vascular, lo que se conoce como disfunción endotelial. La disfunción endotelial se define en general como una disminución de las respuestas vasodilatadoras dependientes del endotelio y se considera el primer eslabón de la cadena de mecanismos fisiopatológicos que conducen a la vasculopatía diabética. Estas alteraciones funcionales, que están estrechamente ligadas a la hiperglucemia o a fenómenos directamente relacionados con la misma, se pondrían de manifiesto con más facilidad en la microcirculación y serían potencialmente reversibles con el control de la glucemia (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1995). En fases más avanzadas de la DM, la persistencia de estas alteraciones vasculares

funcionales, junto con la aparición de otras manifestaciones de la enfermedad (especialmente las alteraciones del metabolismo lipídico y de las plaquetas) daría lugar a la aparición de fenómenos de remodelado vascular, con un engrosamiento de la capa media y un aumento en la rigidez de los vasos, así como al desarrollo de fenómenos inflamatorios de bajo grado y a la aparición de placas de ateroma en la capa íntima (Giannattasio et al, 2001). Estas alteraciones estructurales son rápidamente irreversibles, se ponen de manifiesto fundamentalmente en los vasos de mayor diámetro y conducen al desarrollo de aterosclerosis y a la obstrucción de la luz vascular, lo que origina isquemia y/o infarto en los tejidos afectados.

2. ENDOTELIO VASCULAR.

Los vasos sanguíneos están formados por tres capas: una capa externa o adventicia, una capa media de células musculares lisas y una capa interna o íntima, formada por una membrana basal y por el endotelio. El endotelio vascular es una capa delgada de células que tapiza la parte interior de las arterias, venas, capilares y vasos linfáticos de los mamíferos. Anteriormente se creía que el endotelio era una barrera inerte entre la pared vascular y la sangre, pero a partir de los 80 se le considera un verdadero órgano con un peso alrededor de los 1.5 kg, que actúa como una barrera selectiva que permite el intercambio de nutrientes y desechos (Palmer *et al.*, 1987). Así, el endotelio vascular participa en procesos de regulación del crecimiento y proliferación de las células musculares lisas vasculares, en la coagulación e inflamación, y en el inicio y desarrollo del proceso de aterosclerosis (Feletou y Vanhoutte, 2006). Además, el endotelio gracias a la síntesis y liberación de sustancias vasoactivas, tanto vasoconstrictoras (endotelina, angiotensina II, tromboxano A2 y otros prostanoides vasoconstrictores), como sustancias con acción vasodilatadora. Entre estas el óxido nítrico (ON) que actúa sobre la pared vascular subyacente y produce vasodilatación, manteniendo los vasos en buen estado, el factor

hiperpolarizante (EDHF) cuya acción va acompañada de una hiperpolarización de gran amplitud a través de la apertura de los canales de potasio, y prostanoïdes vasodilatadores como la prostaciclina (Gautier *et al.*, 2005)

El endotelio es un órgano activamente comprometido en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos. Debido a su ubicación estratégica detecta cambios en las fuerzas hemodinámicas que actúan sobre la pared vascular, así como señales químicas transportadas por la sangre y responde a ellas liberando un gran número de sustancias, que se reflejan en la Tabla 1.

En condiciones fisiológicas, la secreción y el balance de estas sustancias, a través de sus efectos autocrinos o paracrinos, hace que el endotelio ejerza tónicamente los siguientes efectos: (1) disminuye el tono vascular, debido a que relaja el músculo liso de la pared del vaso, (2) reduce la proliferación celular, (3) inhibe la adhesión y agregación plaquetaria, (4) deprime la activación del sistema de coagulación, (5) estimula la fibrinólisis, (6) disminuye la permeabilidad capilar, y (7) inhibe la adhesión y migración de neutrófilos y macrófagos generadores de inflamación.

Antihemostáticos	Trombomodulina Proteína C y Proteína S Activador tisular de plasminógeno Prostaciclina (PGI ₂) Óxido nítrico Heparansulfatos
Hemoistáticos	Factor de von Willerbrand Factor V Factor III (tisular) Inhibidor del activador de plasminógeno Tromboxano A2
Vasodilatadores	Óxido nítrico Prostaciclina (PGI ₂) EDHF
Vasoconstrictores	Endotelina Angiotensina II Tromboxano A2 Anión superóxido
Promoteres de crecimiento	Endotelina Angiotensina II Factor de Crecimiento Vascular Anión superóxido
Inhibidores del crecimiento	Óxido nítrico Heparansulfatos
Inmunológicos	Selectinas Moléculas de Adhesión Interleuquinas 1, 6, 18. Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α)

Tabla 1. Principios activos del endotelio vascular.

2.1 FACTORES VASODILADORES.

2.1.1 ÓXIDO NÍTRICO.

El óxido nítrico (ON), inicialmente conocido como factor relajante derivado del endotelio (EDRF), es el principal modulador de la función vascular gracias a su potente acción vasodilatadora. El ON endógeno es sintetizado en diversos tipos celulares a partir del terminal nitrógeno del aminoácido-L-arginina por acción de las sintasas del óxido nítrico (NOS) (Fig 2).

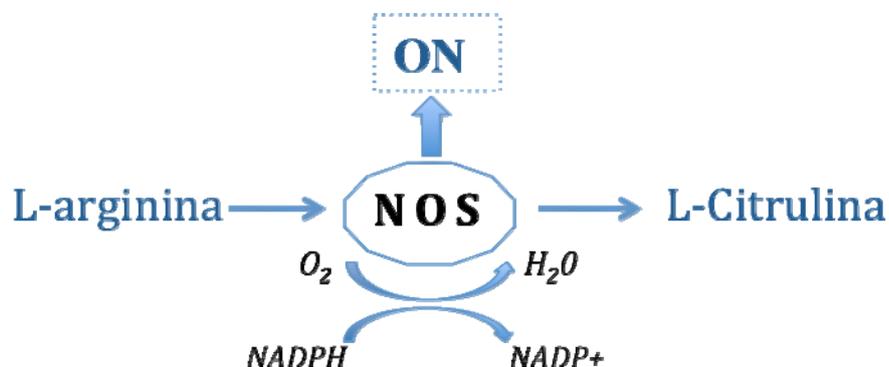


Figura 2 . Formación de ON a partir de L-arginina.

El ON tiene una vida media de unos pocos segundos (Moncada y Higgs, 1993) y es rápidamente oxidado a nitrato por la hemoglobina oxigenada, por el oxígeno molecular y por los aniones superóxido, antes de ser excretado por la orina. Se han identificado diferentes isoformas de la NOS. Existen dos isoformas constitutivas que producen niveles picomolares de ON, son reguladas por Ca^{2+} -calmodulina y utilizan NADPH, flavina adenina dinucleótido/mononucleótido (FAD/FAM) y tetrahydrobiopterina (BH_4) como cofactores. A este tipo pertenecen la isoforma tipo I, presentes en el cerebro, y la tipo III, aislada en células endoteliales vasculares.

La isoforma NOS tipo III endotelial produce ON que se difunde desde el endotelio al músculo liso vascular, donde activa a la guanilato ciclasa. El incremento que se produce en los niveles de GMPc intracelulares media la relajación del músculo liso

vascular (Fig 3). La liberación de ON contribuye a la regulación del tono arterial por sus acciones vasodilatadoras y además frena el crecimiento de las células musculares lisas vasculares e inhibe la agregación plaquetaria y la activación de moléculas de adhesión, brindando con ello un efecto protector sobre la pared del vaso. Por lo tanto, la alteración en su producción por parte del endotelio perturba profundamente la homeostasis vascular y potencia el desarrollo de lesiones ateroscleróticas (Sagach *et al.*, 2006).

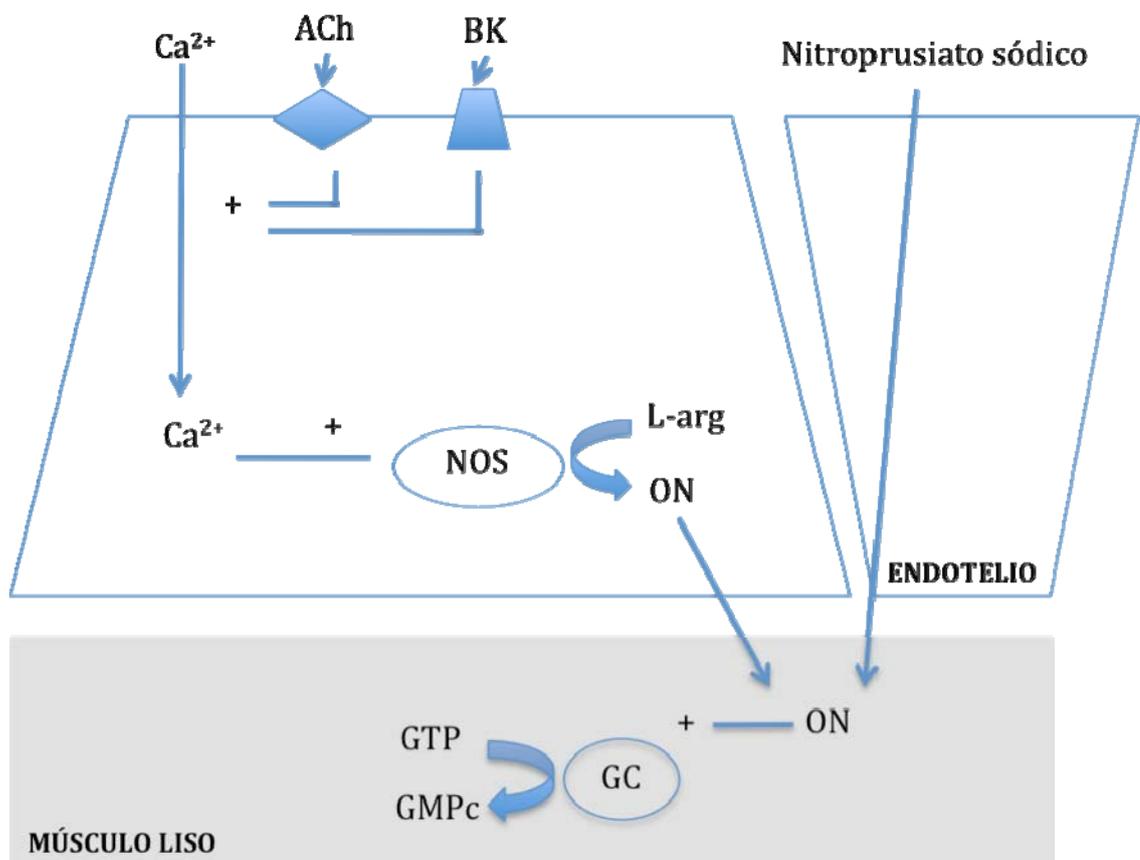


Figura 3. Mecanismos de respuesta vascular endotelio y no endotelio dependientes (ACh:acetilcolina; NOS: sintasa del óxido nítrico; L-arg: L-arginina; ON:óxido nítrico; GTP:guanosina trifosfato; GMPc: guanosina monofosfato cíclico; GC: guanilato ciclasa).

2.1.2 PROSTACICLINA.

La prostaciclina (PGI₂) es una sustancia endógena sintetizada a partir del ácido araquidónico, y la acción de las enzimas ciclooxigenasa (COX) y prostaciclina sintetasa (Mitchell *et al.*, 2008). La función de la prostaciclina es local, causando relajación del músculo subyacente a través de la activación de la adenilciclasa. Su efecto está estrechamente relacionado con el ON. De hecho existen evidencias que sugieren que el ON puede aumentar o inhibir la actividad y expresión de COX (Villar *et al.*, 2006). Además, la prostaciclina inhibe la agregación plaquetaria y la liberación de factores de crecimiento implicados en el engrosamiento de la pared vascular (Zou, 2007).

La enzima COX tiene dos isoformas, COX-1 y COX-2, La COX-1 se expresa de forma constitutiva por la mayoría de los tejidos y participa en la síntesis de las prostaglandinas que controlan procesos fisiológicos. Por el contrario, la isoforma COX-2 es inducible y se expresa en respuesta a diferentes estímulos proinflamatorios o factores mitogénicos en distintos tipos celulares (células endoteliales, células de músculo liso vascular, macrófagos, etc.). Además, se ha descrito que la COX-2 contribuye a la proliferación de la célula muscular lisa inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF α) y por la angiotensina II (Kang *et al.*, 2006). Recientemente se ha hallado una expresión constitutiva de la COX-2 en distintos lechos vasculares, por lo que parece también que esta isoforma juega un papel importante en algunos procesos fisiológicos (Briones *et al.*, 2005).

2.1.3 FACTOR HIPERPOLARIZANTE DERIVADO DEL ENDOTELIO.

Actualmente la naturaleza química del factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) no ha sido claramente identificada. Entre los posibles candidatos figuran los iones de potasio, peróxido de hidrógeno, etc. (Luksha *et al.*, 2008). Este

factor es producido por las células endoteliales y es capaz de inducir vasodilatación a través de la hiperpolarización de la membrana de la célula de músculo liso vascular (CML) (Garland *et al.*, 1995). El EDHF juega un papel de mayor relevancia en arterias de pequeño calibre que en arterias de conducción (Woodman *et al.*, 2000; Honing *et al.*, 2000).

En la actualidad, se cree que las respuestas mediadas por el EDHF se inician con un incremento en la concentración de calcio endotelial y la consecuente activación de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} que hiperpolarizan las células endoteliales (Woodman *et al.*, 2000). En algunos tejidos, la hiperpolarización de las células endoteliales podría estar regulada por la activación del citocromo P-450, generando ácidos epoxieicosatrienoicos. La hiperpolarización endotelial podría propagarse hacia las células musculares lisas vecinas a través de uniones gap, ~~que podrían estar reguladas por el flujo de K^+ a través de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} ,~~ produciendo la hiperpolarización del músculo liso vascular (Bryan *et al.*, 2005). Se ha sugerido que la generación del EDHF y/o sus mecanismos de acción son inhibidas por el ON, ya que las respuestas mediadas por el EDHF son más prominentes tras la inhibición de la NOS (Honing *et al.*, 2000).

2.2 FACTORES VASCONSTRICTORES.

2.2.1 ENDOTELINA .

Este factor es liberado tónicamente en respuesta a distintos estímulos (adrenalina, citoquinas y radicales libres), con el fin de mantener la resistencia vascular sistémica. La endotelina (ET) actúa como un antagonista fisiológico del ON y es producida en macrófagos, células de músculo liso y, principalmente, en la célula endotelial a partir de la proendotelina, sobre la que actúa la enzima convertidora de endotelina (ECE).

Estudios recientes muestran la importancia de la endotelina como potente vasoconstrictor y péptido pro-inflamatorio en la fisiopatología de la disfunción vascular y en enfermedades cardiovasculares (Sudano *et al.*, 2006).

2.2.2 TROMBOXANO A₂ .

Los tromboxanos también son el resultado principalmente de la acción de la enzima ciclooxigenasa sobre el ácido araquidónico, que origina compuestos con efecto autocrino y paracrino. El tromboxano A₂ (TXA₂) es un metabolito del ácido araquidónico generado por la acción de la COX y, en un paso posterior, por la tromboxano sintasa. Actúa como un potente agregante plaquetario y vasoconstrictor. Las plaquetas son ricas en la enzima tromboxano sintetasa y producen una cantidad elevada de tromboxano A₂. Su principal función biológica es participar en la hemostasia, lo que refiere los procesos de coagulación y agregación plaquetaria (Nakahata, 2008).

El TXA₂ ejerce su efecto específico activando el receptor del tromboxano en el tejido muscular vascular y en plaquetas, contrarrestando la acción del ON y PGI₂ en ambos tipos celulares (Dogné *et al.*, 2006). Debido a su función en la agregación plaquetaria, el TXA₂ es importante en el cierre de las heridas y hemorragias que permanentemente se producen en nuestro organismo.

2.2.3 ANGIOTENSINA II .

La Angiotensina II (Ang II) es producida por la acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), que convierte la angiotensina I en angiotensina II. La angiotensina II, después de la activación de sus receptores, estimula también la producción de ET-1 y de otros mediadores, tales como el activador de plasminógeno.

La Ang II se considera una hormona multifuncional que tiene un papel importante en distintos procesos celulares, además de ser un potente vasoconstrictor (Wolf y Wenzel, 2004). Muchas de sus acciones están mediadas por mecanismos oxidativos, de los cuales el mejor caracterizado es la activación de la NADH/NAD(P)H oxidasa, con la consiguiente producción de aniones superóxido (Pacher y Szabó, 2006). Asimismo, la Ang II, en condiciones patológicas, contribuye por sus acciones vasoconstrictoras, mitogénicas, proinflamatorias y profibróticas a la alteración del tono vascular, la disfunción endotelial, y la remodelación e inflamación vascular, todas ellas características del daño vascular presente en la aterosclerosis, el envejecimiento, la hipertensión y la diabetes, entre otras (Toyyz, 2004).

3. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL.

La disfunción endotelial se define como el deterioro de la vasodilatación endotelio-dependiente. Cuando el endotelio no cumple adecuadamente sus funciones se dice que existe disfunción endotelial, que suele ser causada por varios factores: (1) una menor biodisponibilidad de ON; (2) una alteración en la producción de prostanoïdes; (3) un deterioro de la hiperpolarización dependiente de endotelio; y (4) una mayor liberación de factores vasoconstrictores. Sin embargo, la menor biodisponibilidad de ON, causada por una disminución en su síntesis o un aumento en la velocidad con que la que se degrada, constituye el fenómeno más temprano y la característica más importante de disfunción endotelial (Pickup *et al.*, 2000).

3.1 GLUCOSA Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL.

La hiperglucemia es un factor claramente asociado al desarrollo de la enfermedad vascular, pero no está claro si participa directamente en la patogénesis de las

complicaciones vasculares, ó bien produce alteraciones metabólicas y bioquímicas en la pared vascular que conducen a anormalidades en la función y estructura del vaso.

Actualmente existen resultados contradictorios sobre la influencia de la hiperglucemia en la disfunción endotelial. Algunos estudios sugieren que la hiperglucemia incrementa la inducción de iNOS, y subsecuentemente, la producción de ON por la activación de la proteína kinasa C- β II en células de ratas normotensas, sin tener este efecto en ratas espontáneamente hipertensas (Pacheco, 2006). Otros estudios mediante pletismografía en humanos sanos, sugieren que el aumento de la glucosa puede contribuir directamente a la disfunción endotelial observada en pacientes con DM (Williams *et al*, 1998). Asimismo, estudios de reactividad vascular en aorta de rata, indican que la hiperglucemia daña la relajación dependiente de endotelio pero no a la vasodilatación independiente de endotelio (Pieper *et al*, 1995). Sin embargo, existe una clara controversia en este asunto, ya que otros autores han encontrado que la hiperglucemia no afecta la reactividad dependiente y no dependiente de endotelio en humanos, también mediante técnicas de pletismografía (Houben *et al*, 1996).

3.2 GLICOSILACIÓN NO ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL.

Se ha propuesto un importante papel para la glicosilación no enzimática de proteínas en el desarrollo de complicaciones de la DM, ya que se ha observado que el mayor daño tisular en la DM ocurre en tejidos ricos en colágeno y en los que la entrada de glucosa no está regulada por la insulina, como en el riñón, la retina ó el endotelio vascular (Singh *et al*, 2011).

Es bien conocido que la glucosa es capaz de formar uniones reversibles con grupo amino de las proteínas, dando lugar a las bases de Schiff. La formación de estas bases es reversible y directamente proporcional a la concentración de glucosa en el medio. A continuación, la base de Schiff sufre una reestructuración y da lugar a un

producto de Amadori, siendo el más conocido la hemoglobina glicada (HbA_1) que se utiliza clínicamente para evaluar la evolución de los pacientes diabéticos (Makita *et al*, 1992). La hemoglobina es una proteína constituida por cuatro cadenas peptídicas y consta de un átomo de hierro como grupo prostético. El átomo de hierro tiene una posición libre que le permite ligar una molécula de oxígeno cuando está reducido. Las hemoglobinas glicosiladas se caracterizan por tener unido un resto de monosacárido en el amino terminal de la cadena beta, que es el punto donde la hemoglobina se glicosila con más facilidad. La HbA_{1c} es la forma más frecuente de hemoglobina glicosilada y, en 1976, Koenig y colaboradores establecieron la relación entre la hiperglucemia y los valores de HbA_{1c} en los pacientes diabéticos (Koenig *et al*, 1976). Además, se ha comprobado la existencia de una correlación entre el grado de disfunción endotelial u el porcentaje de HbA_{1c} . Así, al estudiar las respuestas endotelio-dependientes en segmentos aórticos y microvasos mesentéricos de ratas con diferentes niveles de hemoglobina glicada se ha observado que sólo los obtenidos de animales con niveles de $HbA_{1c} >7.5\%$ presentan disfunción endotelial (Rodríguez-Mañas *et al*, 1998). De la misma manera, se ha observado que la implicación de la oxihemoglobina glicada en la relajación endotelio-dependiente en vasos humanos se debe a la producción de aniones superóxido (Rodríguez-Mañas *et al*, 2003).

Las bases de Schiff son consideradas los productos tempranos de la glicosilación, mientras que los productos de Amadori como los productos intermedios (Singh, *et al*, 2011). Adicionalmente, la formación de productos avanzados de glicosilación (AGEs) tiene lugar en las proteínas con una vida media larga, donde los procesos de glicosilación no enzimática progresan durante semanas o meses. Las dianas preferentes de estas reacciones son los componentes estructurales de la matriz de tejido conectivo o de la membrana basal, además de encontrarse incrementados los niveles de AGE en tejidos (Makita *et al*, 1992).

Los AGE causan su efecto en al menos tres localizaciones y mecanismos distintos: (1) acumulación en matriz extracelular; (2) interacción con receptores

celulares; y/o (3) formación en el interior de la célula cambiando el ADN. En condiciones de alta producción de AGE, como en la DM, los efectos indirectos de los AGE mediados por receptores de superficie celular, que actúan como mediadores de la endocitosis y degradación de AGE, incluyen la activación de la PKC, la producción de radicales libres y la liberación de factores de crecimiento y citoquinas, dando como resultado un proceso acelerado de crecimiento y de respuestas inflamatorias (Sharma *et al*, 1996). Los AGE acumulados en matriz extracelular forman enlaces covalentes entre proteínas estables y de vida media larga, como el colágeno, alterando los procesos de remodelación vascular y favoreciendo la acumulación de matriz extracelular y el engrosamiento de la membrana basal capilar (Rodríguez Mañas *et al*, 2003). Asimismo, el atrapamiento de lipoproteínas circulantes por AGE formados en la matriz de la pared vascular favorece su acumulación y el desarrollo de aterosclerosis (Monnier *et al*, 1996). Asimismo, la formación de AGE produce radicales libres, provocando una disminución en el ON y un estado de estrés oxidativo.

3.3 INFLAMACIÓN Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL.

La vasculopatía diabética se ha definido como una enfermedad inflamatoria crónica (Giuseppe *et al.*, 2003), ya que cada vez existen más evidencias sobre la estrecha relación que existe entre una activación crónica de la respuesta inflamatoria, también denominada “inflamación de bajo grado” con la patogénesis de la diabetes tipo 2 y sus complicaciones asociadas, tales como la dislipidemia y la aterosclerosis (Pickup, 2004). Además, tanto en modelos animales de diabetes como en pacientes con diabetes tipo 1 y 2, se han encontrado aumentadas las concentraciones circulantes de factores inflamatorios como la proteína C-reactiva y citoquinas pro-inflamatorias, como la interleuquina-1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) (Erbagci *et al.*, 2001; Marques-Vidal *et al.*, 2012; Pickup *et al.*, 2000). La IL-1 β y el TNF- α son citoquinas pro-inflamatorias producidas por múltiples estirpes celulares en

respuesta a infecciones o cualquier tipo de lesión o estrés. Son mediadores que actúan en la superficie de las células vasculares sobre receptores específicos de membrana, los cuales, una vez activados, desencadenan una señalización intracelular que genera especies reactivas de oxígeno y activa diferentes vías sensibles a ellas, como las quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Las MAPK promueven la síntesis proteica y activan distintos factores de transcripción, incluyendo el factor nuclear κ B (NF- κ B) que, a su vez, facilita la expresión de genes sensibles al estado de óxido-reducción intracelular que codifican citoquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión y enzimas proinflamatorias, como la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) (Kracht y Saklatvala, 2002). La iNOS inducida en el músculo liso y/o endotelio vascular es capaz de producir importantes cantidades de ON y aniones superóxido, cuya interacción inactiva el ON y conduce a la formación de peroxinitrito (ONOO⁻). El peroxinitrito induce daños a largo plazo en la pared vascular y tiene un papel importante en la génesis de distintas enfermedades vasculares, como hipertensión, aterosclerosis y/o vasculopatía diabética (Spitaler y Graier, 2002; Loscalzo, 2000; Xia, 2012). En este sentido, la actividad de iNOS como productor de peroxinitrito parece ser un mecanismo claro de daño cardiovascular mediado por citoquinas (Ferdinandy *et al.*, 2000). Además, el peroxinitrito incrementa la expresión y actividad de la iNOS mediada por NF- κ B en músculo liso y endotelio vasculares (Hattori *et al.* 2000; Tannous *et al.* 1999), lo que puede constituir un mecanismo que perpetúe el incremento del estrés oxidativo en la pared vascular y conduzca al mantenimiento de alteraciones, como la disfunción endotelial, el crecimiento celular y el entorno pro-inflamatorio.

Actualmente, hay estudios que muestran que los marcadores inflamatorios elevados no son tan sólo factores de riesgo que predisponen a un desarrollo posterior de la DM, sino que, una vez establecida la enfermedad, desempeñan un papel crucial en la patogénesis de la retinopatía y las complicaciones renales y

cardiovasculares de la DM (Leiva *et al*, 2001). Se ha descrito que los monocitos proedentes de pacientes que padecen DM tipo 2 presentan una mayor actividad proaterogénica, dando lugar a una mayor liberación de anión superóxido y de IL-1 β y una mayor adhesividad al endotelio (Hattori *et al*. 2000). A su vez, se ha observado que niveles elevados de leucocitos, incluso dentro de los parámetros considerados clínicamente normales, están asociados con las complicaciones micro y macrovasculares diabéticas de tipo 2, indicando la existencia de una inflamación crónica (Tong *et al*, 2004).

Aún no están esclarecidos los mecanismos por los cuales se activa el sistema inmunitario en la DM. Sin embargo, se ha observado que la hiperglucemia aumenta las concentraciones de citoquinas circulantes mediante un aumento del estrés oxidativo, lo que a su vez contribuye a una activación del sistema inmune (Espósito *et al*, 2002). Del mismo modo, existe una asociación entre niveles elevados en suero de productos avanzados de glicosilación (AGEs) y un incremento de los niveles circulantes de CRP (Tan *et al*, 2004). Hay datos que sugieren que la activación del sistema inmune es probablemente el antecedente común entre la aterosclerosis y la DM de tipo 2 (Pickup, 2004). En este sentido, es importante resaltar que la aterosclerosis se considera también una enfermedad inflamatoria crónica de la pared vascular, por lo que parece probable que muchos de los mecanismos implicados sean análogos. Cabe recordar que otros factores como la dislipidemia, el incremento de factores de coagulación en plasma o la mayor agregabilidad plaquetaria juegan un papel fundamental en el desarrollo de fenómenos ateroscleróticos asociados a la DM, por lo que la inflamación crónica asociada a la DM ofrece un mecanismo plausible que podría explicar porqué el desarrollo de la aterosclerosis está acelerado en la DM (Tan *et al*, 2004).

3.4 ESTRÉS OXIDATIVO Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL.

Durante la respiración aeróbica, las células vasculares producen energía mediante la reducción del oxígeno molecular a agua, generando durante este proceso especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), producido por la reducción del oxígeno por la transferencia de un electrón, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), mediante la transferencia de dos electrones al oxígeno y radical hidroxilo (OH^{\cdot}), considerado el más reactivo y dañino de los radicales libres, ~~entre otros~~ (Poli, 2004). Los radicales libres son moléculas que poseen un electrón desapareado, lo que confiere una gran reactividad a estas especies químicas. Así, como se ha descrito antes la reacción entre $O_2^{\cdot-}$ y ON produce otro compuesto altamente reactivo, el $OONO^{\cdot-}$. La sobreproducción de ROS bajo condiciones fisiopatológicas se ha convertido en un elemento clave en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Un aumento del estrés oxidativo se produce cuando hay un desequilibrio entre la generación de ROS y los sistemas barredores de los mismos presentes en el organismo. El aumento de estrés oxidativo daña las funciones endoteliales, y es considerado como un serio factor causal de la disfunción vascular, la cual es importante en la fisiopatología de varias enfermedades vasculares, incluyendo la DM (Poli, 2004).

Las ROS juegan un papel importante en la vasodilatación, debido a la inactivación oxidativa del ON; esta interacción del ON derivado del endotelio se debe a la rápida reacción con el $O_2^{\cdot-}$ reduciendo así su biodisponibilidad (Muller y Morawietz, 2009). El $O_2^{\cdot-}$ es el principal radical libre implicado en la inactivación del ON. Así, se ha podido comprobar que la enzima superóxido dismutasa (SOD), que inactiva el $O_2^{\cdot-}$, mejora las relajaciones dependientes de endotelio en vasos de animales diabéticos (Angulo *et al*, 1996). También hay datos que sugieren la participación de otros radicales libres, ya que la catalasa (que promueve el catabolismo del H_2O_2) y el manitol (un barredor de

.OH) pueden mejorar total o parcialmente la disfunción endotelial diabética (Giugliano *et al*, 1996).

En los últimos años, se ha apuntado a un aumento del estrés oxidativo como el factor clave tanto en la génesis de la DM como en el desarrollo de la vasculopatía diabética (Giugliano *et al*, 1996, Baynes y Thorpe, 1999). De esta forma, la sobreproducción de ROS bajo condiciones fisiopatológicas constituye un elemento clave en desarrollo de enfermedades cardiovasculares, incluyendo la DM. (Griendling, 2003). En este sentido, diferentes estudios han demostrado un aumento en la producción de ROS y/o una disminución de los sistemas antioxidantes en pacientes diabéticos, dando lugar a un aumento neto del estrés oxidativo. (Nourooz-Zadeh *et al*, 1997; Martín-Gallán *et al*, 2003; Darmaun *et al*, 2005). Adicionalmente, en estudios pletismográficos realizados en sujetos con diabetes tipo I, la coin fusión de SOD ó ácido ascórbico produce una mejoría en la respuesta vasodilatadora (Rodríguez-Mañas *et al*, 2003). Posiblemente, el estrés oxidativo es un mediador común a todos los mecanismos propuestos capaces de inducir disfunción endotelial diabética, bien como desencadenante de la alteración de procesos bioquímicos, bien como resultante de éstos y causante directo del daño celular (De Vriese *et al*, 2000).

3.4.1 FUENTES DE ESTRÉS OXIDATIVO

Se han descrito una amplia variedad de mecanismos en la DM capaces de incrementar el estrés oxidativo en la pared vascular. A continuación, se revisan brevemente los más relevantes:

3.4.1.1 DESACOPLAMIENTO DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA

Cuando se produce un déficit del sustrato (L-arginina) o del cofactor (BH_4), cualquier isoforma de NOS puede ser una fuente de estrés oxidativo, ya que no produce ON sino que transfiere los electrones al O_2 , produciendo O_2^- , lo que se conoce como desacoplamiento de la enzima, con una menor síntesis de ON y una mayor producción de aniones superóxido (Wassmann *et al*, 2004).

3.4.1.2 XANTINA OXIDASA (XO)

La xantina óxidoreductasa es una molibdoenzima capaz de generar aniones superóxido catalizando la oxidación de la hipoxantina y la xantina en el proceso del metabolismo de las purinas. Existen dos formas interconvertibles de la xantina óxidoreductasa, la xantina deshidrogenada (XDH) y la xantina oxidasa (XO). Así, mientras la XDH utiliza como cofactor el nucleótido NAD^+ para generar NADH, la XO prefiere el oxígeno molecular, lo que permite que en las reacciones enzimáticas consecutivas se produzca el anión superóxido y H_2O_2 (Cai y Harrison, 2000). La xantina oxidasa (XO) es una enzima que se encuentra en la vasculatura, tanto en el citoplasma de las células musculares lisas como en el endotelio (Darmaun *et al*, 2005)

3.4.1.3 VÍA DEL SORBITOL Y MIO-INOSITOL.

La vía del sorbitol implica una secuencia de 2 reacciones en las que intervienen las enzimas aldosa reductasa (AR) y la sorbitol deshidrogenasa (SDH) (Fig. 4)



Fig. 4 Esquematización de la vía del sorbitol.

La hiperglucemia determina un aumento del flujo de glucosa al interior celular en aquellos tejidos donde la captación de glucosa no es dependiente de insulina, como en el riñón, el cristalino, el tejido nervioso y vascular. En estos tejidos, una parte de la glucosa es reducida a sorbitol por acción de la aldosa-reductasa, utilizando como cofactor al NADPH. Al aumentar los niveles de glucosa, aumenta la actividad de la vía sorbitol teniendo como consecuencia una disminución en los niveles de NADPH, con lo que se reduce la capacidad de defensa de la célula ante el estrés oxidativo, y la producción de ON, al ser un cofactor para la NOS. Además, se produce un aumento de la relación NADH/NAD⁺, que a su vez provoca un incremento en los niveles de tirosina fosfato (agentes de glicación muy reactivos) y de diacilglicerol (DAG), un activador endógeno de la PKC, así como una disminución en la síntesis ó transporte del mioinositol, traduciendo en una menor actividad de la ATPasa-NA⁺-K⁺ dependiente de la membrana plasmática celular, lo que contribuiría a la aparición de las complicaciones vasculares. Así, una mayor actividad en la vía de los polioles puede justificar el aumento en la producción de radicales libres, así como la acumulación de AGE y la activación de la PKC (Díaz *et al*, 2004).

3.4.1.4 VÍA DE LA PROTEIN KINASA C.

La protein quinasas C (PKC) son una familia de isoenzimas que poseen la propiedad general de ser activadas por el diacilglicerol (DAG); este compuesto se eleva en el interior de células expuestas a elevadas concentraciones de glucosa, posiblemente a través de la vía de los polioles. Además, existen datos que sugieren

una activación de la PKC como consecuencia de la interacción entre los AGE y sus receptores de superficie (Scivitaro *et al*, 2000).

3.4.1.5 SOBREPDUCCIÓN MITROCONDRIAL DE ANIONES SUPERÓXIDO.

Se ha sugerido que la mitocondria juega un papel esencial en el desarrollo de las complicaciones vasculares asociadas a la DM. Algunos autores proponen que la glucosa puede penetrar libremente en las células endoteliales, por lo que la hiperglucemia conduce a una sobrecarga de glucosa intracelular, que se traduce en una saturación de cadena de transporte electrónico mitocondrial, por lo que el exceso de electrones se transfiere al electrones al O₂, produciendo O₂⁻ (Brownlee, 2001; Ceriello, 2003). Además, estos autores han propuesto que este mecanismo puede ser la causa del resto de las alteraciones descritas en las vías de señalización celular relacionadas con la DM, incluyendo la vía de los polioles, la activación de la PKC o la formación de AGEs (Brownlee, 2001; Brownlee, 2005; Giacco & Brownlee, 2010).

3.4.1.6 NADPH OXIDASA.

La enzima NADPH oxidasa, también conocida como Nox (Fig 5), constituye la mayor fuente enzimática de O₂⁻ endotelial y vascular. La enzima NAD(P)H oxidasa cataliza la reacción de oxidación del NADH ó NADPH a NAD⁺ ó NADP⁺, utilizando para ello oxígeno molecular y produciendo peróxido de hidrógeno.



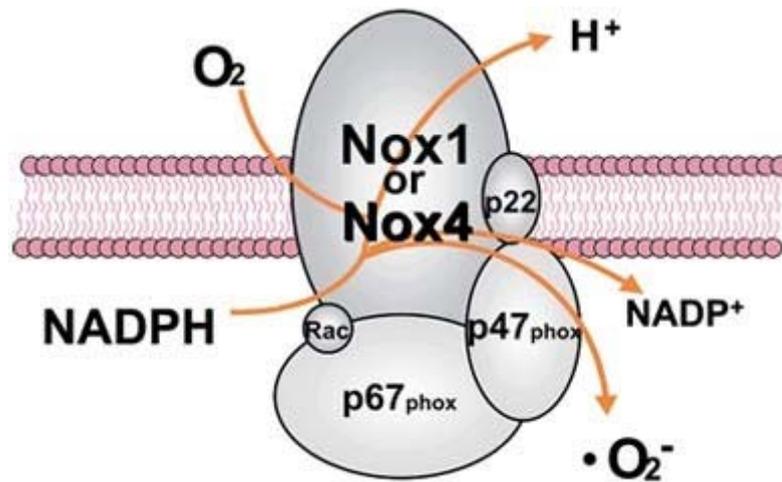


Fig 5. Representación simplificada de la estructura de la enzima NADPH-oxidasa.

(Dusting *et al*, 2005).

Las proteínas Nox representan las subunidades catalíticas de esta enzima y varían en su modo de activación y necesidad de cofactores (Griendling, 2003). La familia Nox se compone de siete homólogos catalíticos, de las que las subunidades Nox1, Nox2, Nox4 y Nox5 se encuentran en la pared vascular. Todas las enzimas Nox, excepto Nox5, forman un complejo en la membrana con p22phox, la cual sirve como una proteína "puerto" para otras subunidades y para estabilizar las proteínas Nox (Griendling, 2003). Las diferentes subunidades liberan O_2^- en el interior de las vesículas o en el exterior después de la activación de sus receptores por sus ligandos (Fig. 6). El O_2^- afecta a las señales citosólicas después de atravesar la membrana plasmática por los canales iónicos o al transformarse en H_2O_2 .

Los niveles de proteína Nox1 son bastante bajos en células vasculares, pero pueden ser inducidos por estímulos como el Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas (PDGF) y la Ang II. Esta isoforma se expresa en el endotelio y en el músculo liso (Gorlach *et al*, 2000) En las células de músculo liso vascular se encuentran en un complejo con el activador Noxa1 y el organizador fagocítico p47phox (Fig. 6). A diferencia de su homólogo, Nox1, p47phox requiere de fosforilación para

su activación, lo que forma parte de la regulación de su actividad enzimática. La sobreexpresión de Nox1 por CML potencia la hipertensión y la hipertrofia inducida por Ang II, mientras que la disminución de Nox1 revierte los efectos producidos por la hipertensión inducida por Ang II (Griendling, 2003). Se ha descrito que existe una relación entre Nox1 y la inflamación vascular inducida por citoquinas, como IL-1 β o TNF α (Miller *et al*, 2007; Lassegue y Griendling, 2010). La isoforma Nox2, previamente conocida como gp91phox, se expresa en el endotelio, en células adventicias de grandes vasos y en células musculares lisas de vasos más pequeños (Gorlach *et al*, 2000). La proteína Nox4 es expresada constitutivamente en células musculares lisas y células endoteliales, donde constituye la isoforma más abundante (Ago *et al*, 2004). Existe evidencia que indica que Nox4 inhibe el crecimiento celular de los vasos, ya que la retirada del suero aumenta la regulación de mRNA de Nox4 en células musculares lisas y células endoteliales, mientras que los factores de crecimiento como Ang II, IL-1 β y trombina hacen que se regule negativamente (Lassegue y Griendling, 2010).

Cabe destacar que aunque las oxidasas endoteliales y vasculares parecen estar constantemente activas, generando bajos niveles de ROS, son reguladas por factores humorales como se ha demostrado para citocinas, factores de crecimiento, y agentes vasoactivos, así como también por factores físicos, incluyendo la presión arterial y el estrés inducido por fuerzas de cizallamiento (Ago *et al*, 2004). Por otra parte, el peróxido de hidrógeno y peróxidos lipídicos pueden estimular la actividad de NAD(P)H oxidasa en células musculares lisas, generando una retroalimentación en la producción de ROS a nivel de la pared vascular (Li *et al*, 2003). Recientemente, varios estudios han mostrado la importancia de este sistema enzimático en enfermedades cardiovasculares, al evidenciar que los aumentos en los niveles de p22phox, p47phox, p67phox y de subunidades Nox están presentes tanto en sujetos portadores de

arterosclerosis coronaria como en vasos de pacientes diabéticos, asociados al aumento en la producción de superóxido (Sorescu *et al*, 2002; Guzik *et al*, 2002).

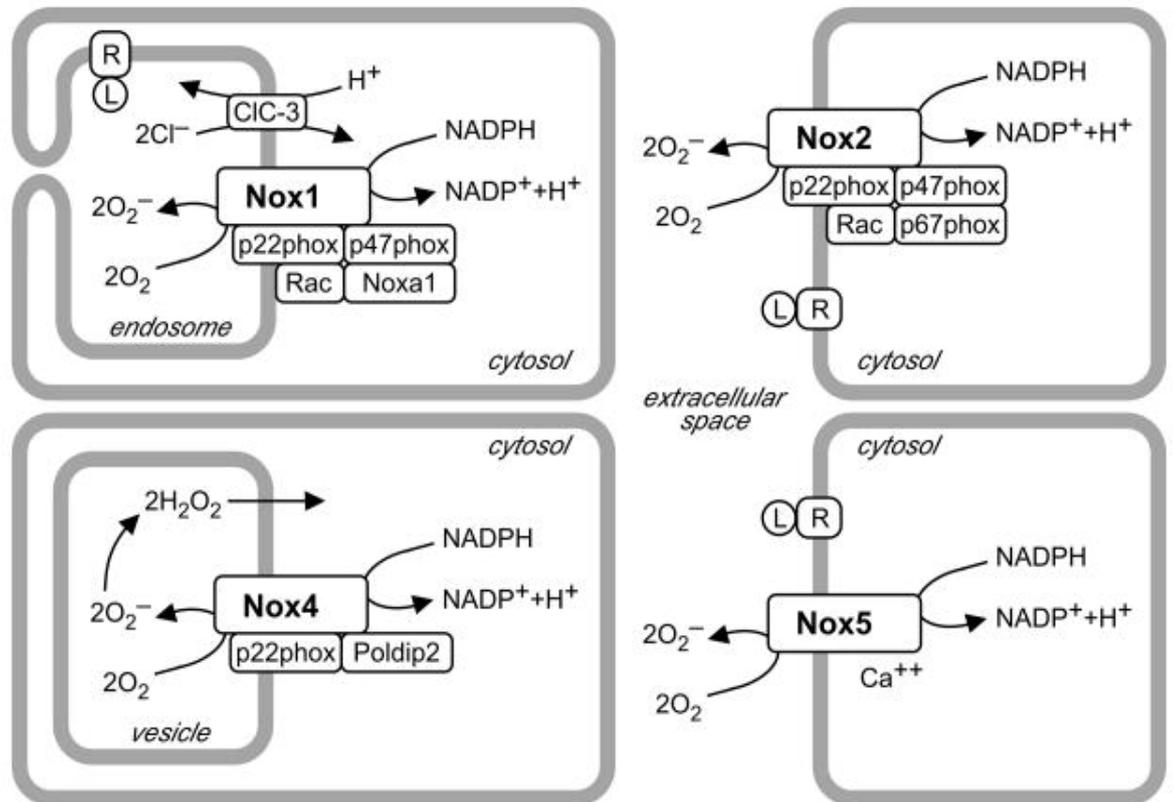


Fig 6. Representación espacial y molecular de las subunidades Nox1, Nox2, Nox4 y Nox5 en diferentes compartimentos celulares ubicados dentro de la célula o en la membrana plasmática.

(L) ligando, (R) receptor. (Lassegue y Gliendling, 2010).

La apocinina, un catecol metoxi-sustituido, actúa como un inhibidor selectivo de la NADPH oxidasa vascular. La apocinina necesita ser oxidada para activarse en presencia de H₂O₂ y MPO (Fig. 7). (Zhang, 2007), El mecanismo de acción es el bloqueo de la translocación a la membrana del componente citosólico p47phox, evitando el ensamblaje del complejo enzimático (Riganti *et al*, 2008) (Fig 8).

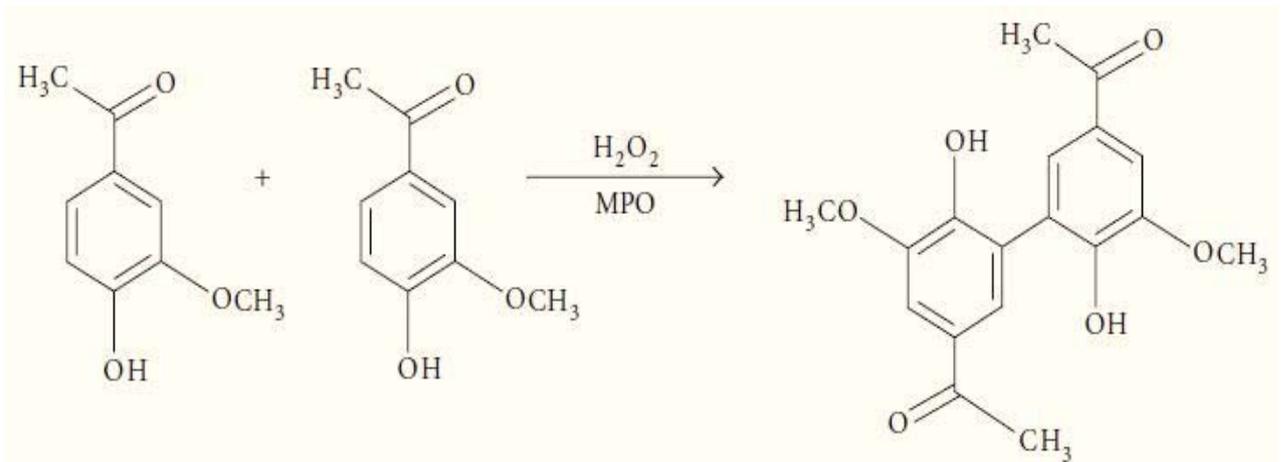


Fig. 7. Dimerización de la forma activa de apocina.

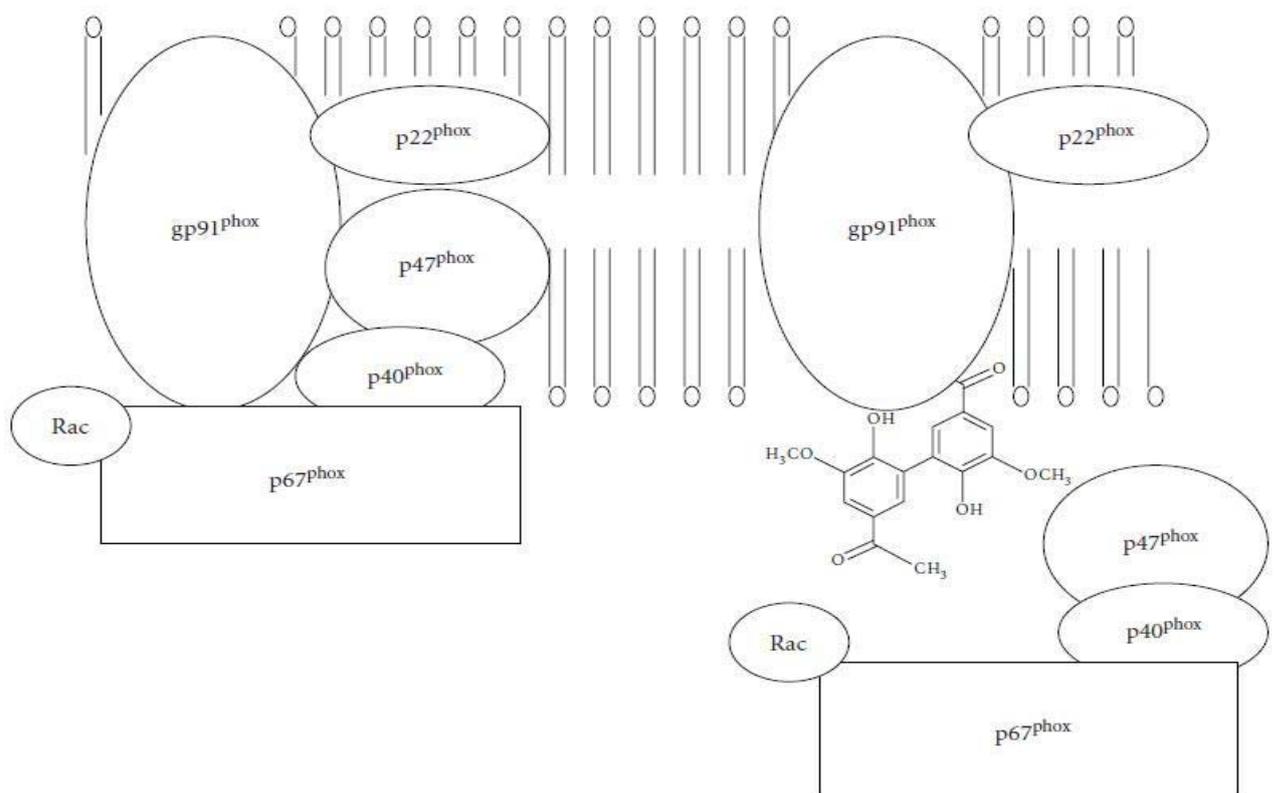


Fig 8. Mecanismo de acción de la apocinina inhibiendo la NADPH-oxidasa.

3.4.1.7 GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA.

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) es una enzima presente en todos los seres vivos. En los mamíferos cataliza la primera reacción en la vía de las pentosas fosfato, la ruta metabólica que provisiona a la célula de NADPH para la síntesis de ácidos nucleicos. Recientemente, se ha identificado a la G6PD como una importante fuente de NADPH mitocondrial (Mallioux y Harper, 2010).

Cuando la tasa de $\text{NADP}^+:\text{NADPH}$ aumenta, el organismo debe promover la síntesis de NADPH, un agente reductor imprescindible en multitud de reacciones como la síntesis de ácidos grasos o la reducción de glutatión. Para ello, la glucosa-6-fosfato es deshidrogenada por medio de la enzima G6PD, dando lugar a la primera reacción (reversible) de la ruta de las pentosas fosfato (Stanton, 2012). La reacción catalizada por la G6PD es la reducción de la NADP^+ a expensas de la deshidrogenación de la glucosa-6-fosfato en 6-fosfogluconato:



La producción de NADPH por la ruta de las pentosas fosfato se utiliza por al menos tres vías enzimáticas relacionadas con los procesos de oxidación y reducción: (1) es necesaria para la reducción del glutatión por la glutatión-reductasa (Salvemini *et al*, 1999); se requiere para la producción de ON por las NOS constitutivas e inflamatoria (Tsai *et al*, 1998; Guo *et al*, 2002; Leopold *et al*, 2003); y (3) está implicada en la generación de O_2^- por la NADPH oxidasa (Gao y Mann, 2009; Selemidis *et al*, 2009). Sin embargo, la constante de Michaelis no es igual para las tres enzimas; así, la K_m de la NADPH oxidasa para NADPH es cien veces mayor que la de iNOS y cinco veces mayor que la de glutatión-reductasa (Matsui *et al*, 2005).

Se ha propuesto que la G6PD puede tener un papel importante como fuente de NADPH para la producción de O_2^- por la NADPH oxidasa en procesos patológicos cardiovasculares (Gupte et al, 2006; Gupte et al, 2007). Asimismo, hay evidencia creciente de que la G6PD puede ser un regulador relevante de la contracción vascular (Gupte et al, 2011).. En este sentido, los inhibidores de la ruta de las pentosas, como 6-aminonicotinamida (6-ANAM), pueden causar respuestas vasodilatadoras (Gupte et al, 2002), lo que ha llevado a proponer a esta enzima como una nueva diana terapéutica en patología cardiovascular (Gupte, 2008).

OBJETIVOS

El objetivo principal de nuestro trabajo ha sido analizar el papel específico que desempeñan la glucosa extracelular y una citoquina inflamatoria como la IL-1 β sobre el desarrollo de una de las alteraciones de aparición precoz de la diabetes mellitus: la disfunción endotelial. Para ello, inicialmente se ha estudiado la reactividad vascular en microvasos mesentéricos aislados de rata Sprague-Dawley (SD) en presencia de distintas concentraciones de glucosa extracelular y/o IL-1 β , analizando los posibles mecanismos implicados en la producción de disfunción endotelial. A continuación, se ha estudiado esos mismos mecanismos en un modelo agudo de diabetes tipo 1, mediante la administración de estreptozotocina en ratas SD. Los objetivos concretos del estudio han sido los siguientes:

1. Determinar la influencia de la D-glucosa extracelular en las respuestas vasodilatadoras inducidas por ACh en microvasos mesentéricos de rata.
2. Analizar el papel de la citoquina pro-inflamatoria IL-1 β como posible inductor de disfunción endotelial en microvasos mesentéricos de rata, en presencia de distintas concentraciones extracelulares de D-glucosa.
3. Estudiar la interferencia farmacológica de la disfunción endotelial asociada a la inflamación con IL-1 β mediante un antagonista recombinante del receptor de interleuquina-1, como anakinra. Asimismo, se analizará el efecto de bloqueo respectivo de COX e iNOS, mediante indometacina y 1400W, la inhibición respectiva de la NADPH-oxidasa y G6PD con apocinina y 6-ANAM ó el secuestro de los aniones superóxido mediante tempol.

4. Determinar la capacidad de la D-glucosa y la IL-1 β para incrementar la actividad de la enzima NADPH oxidasa en células umbilicales humanas cultivadas y en arterias mesentéricas aisladas de rata. Analizar la capacidad de los fármacos anteriormente mencionados para interferir con dicha actividad enzimática.
5. Estudiar la disfunción endotelial en microvasos mesentéricos de rata con DM inducida por estreptozotocina.
6. Determinar si la administración intraperitoneal de anakinra en dicho modelo experimental de DM es capaz de modificar la disfunción endotelial diabética.
7. Estudiar la interferencia farmacológica de la disfunción endotelial diabética mediante el bloqueo respectivo de COX e iNOS, con indometacina y 1400W, la inhibición respectiva de la NADPH-oxidasa y G6PD con apocinina y 6-ANAM ó el secuestro de los aniones superóxido con tempol.
8. Determinar la actividad de la enzima NADPH oxidasa en microvasos mesentéricos aislados de rata con DM inducida por estreptozotocina, así como de animales diabéticos tratados con anakinra. Analizar la capacidad de los fármacos anteriormente mencionados para interferir con dicha actividad enzimática.
9. Determinar las concentraciones circulantes de citoquinas inflamatorias en el suero de animales diabéticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales de experimentación.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (SD) de tres meses de edad, criadas en el animalario de la Universidad Autónoma de Madrid (Número de registro EX/021-U) de acuerdo con las normas establecidas por la CE y el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (RD 1205/2005). En estas ratas se indujo Diabetes mellitus tipo 1 (DM) mediante una única inyección intraperitoneal de estreptozotocina (STZ: 60mg/Kg) disuelta en un tampón de citrato trisódico (0,1M)-ácido cítrico, que mantenía un pH de 4,5 a 5. A las 72 horas de la inyección, se obtuvieron muestras de sangre de la cola y se midió la concentración de D-glucosa con la ayuda de un glucómetro Optium Xcee. Se consideró que la inducción de la diabetes se había conseguido cuando la glucemia superó los 200mg/dl.

Una vez asegurada la condición de animales diabéticos, se consideró una evolución de una a tres semanas y se aplicaron diferentes tratamientos antes del sacrificio de los animales, para formar los siguientes grupos:

Grupo 1 o Grupo Control. Ratas no diabéticas sin tratamiento.

Grupo 2. Ratas DM sin tratamiento, de una, dos o tres semanas de evolución.

Grupo 3. Ratas no diabéticas con un tratamiento intraperitoneal de 100 mg/kg de anakinra (AK) cada 24 h, durante los 3 días previos al sacrificio.

Grupo 4. Ratas DM de dos semanas de evolución, con un tratamiento intraperitoneal de 100 mg/kg de AK cada 24 h, durante los 3 días previos al sacrificio.

Grupo 5. Ratas no diabéticas con un tratamiento intraperitoneal de 100 mg/kg de AK cada 24 h, durante los 7 días previos al sacrificio.

Grupo 6. Ratas DM de dos semanas de evolución, con un tratamiento de 100 mg/kg de AK cada 24 h, durante los 7 días previos al sacrificio.

Grupo 7. Ratas no diabéticas con un tratamiento intraperitoneal de 160 mg/kg de AK cada 24 h, durante los 3 días previos al sacrificio

Grupo 8. Ratas DM de dos semanas de evolución, con un tratamiento intraperitoneal de 160 mg/kg de AK cada 24 h, durante los 3 días previos al sacrificio.

2. *Reactividad vascular en microvasos mesentéricos*

Tras los periodos y tratamientos indicados, los animales fueron sacrificados por inhalación de CO₂. Inmediatamente, se determinó la glucemia a través de una muestra de sangre de la cola con la ayuda de un glucómetro. A continuación, se extrajeron muestras de sangre mediante punción cardíaca, que fueron centrifugadas para obtener suero, que fue congelado para la posterior determinación de citoquinas inflamatorias. A continuación, se extrajo el mesenterio. Este tejido se lavó en solución fisiológica Krebs-Henseleit (KHS) a 4 °C, para mantenerlo en condiciones fisiológicas y limpiar los restos de sangre. A continuación, se disecó la 3^a rama mesentérica bajo microscopia óptica, eliminando el tejido conectivo que rodea los vasos al igual que la vena que circula paralela a la arteria. Se obtuvieron así pequeños segmentos arteriales, de aproximadamente 300 µm de diámetro, que fueron montados en un miógrafo para vasos (Mulvany & Halpern, 1977), capaz de medir tensión isométrica. (Fig.9) Estas arterias se colocaron en un baño de órganos con 5 ml de Krebs (KHS) a 37°C en continuo burbujeo con una mezcla de carbógeno (95% O₂ y 5% de CO₂) para asegurar un pH entre 7,3 y 7,4. Para cada segmento se determinó su diámetro interno y la tensión basal óptima, considerada como el 90% de la obtenida cuando se sometía a una presión transmural de 100 mm Hg (Mulvany & Halpern, 1977).

Miógrafo para microvasos

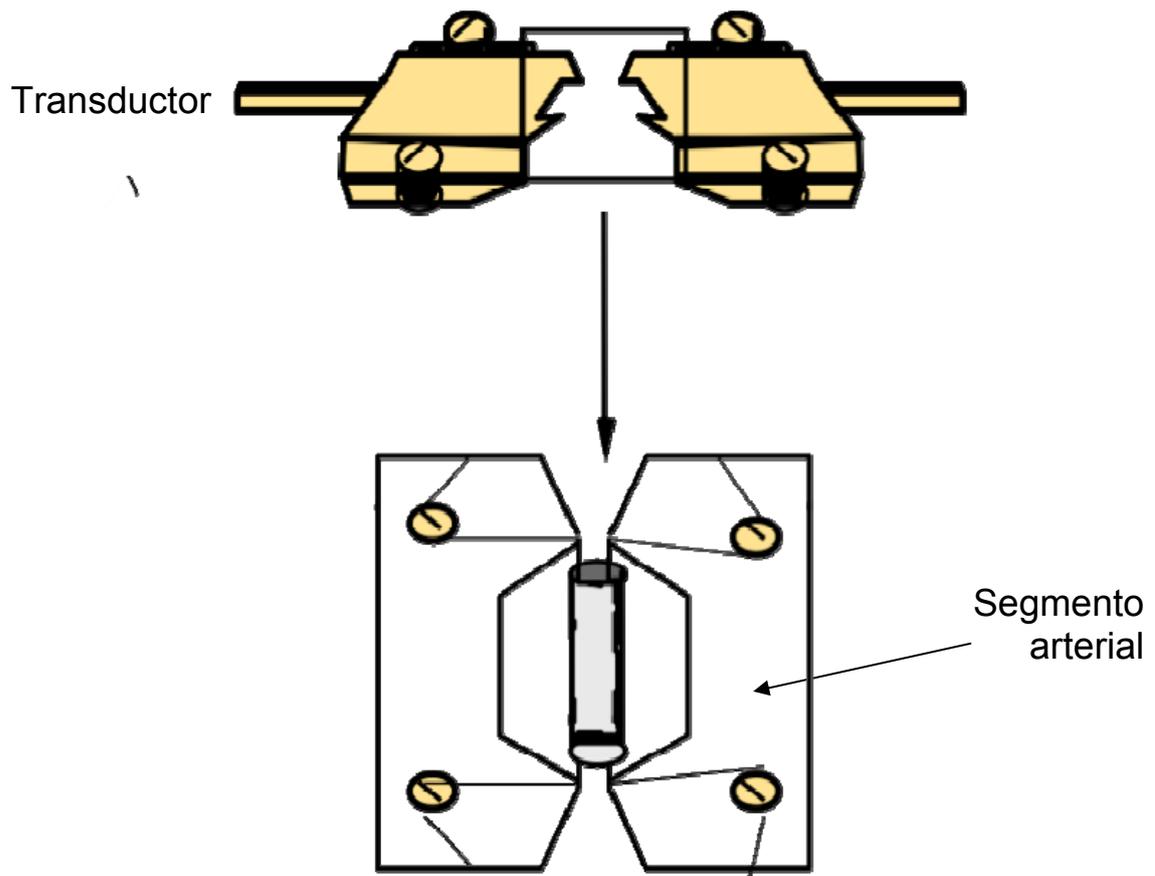
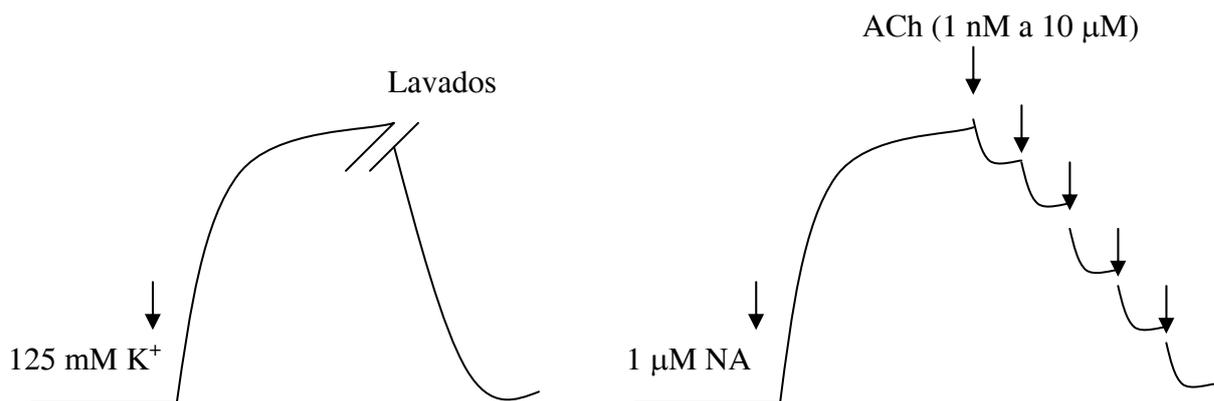


Fig.9 Esquema del miógrafo para vasos de pequeño calibre (150-500 μm) empleado para el estudio de la reactividad vascular en microvasos mesentéricos de rata.

2.1 Protocolo experimental.

Inicialmente, se administró a los segmentos arteriales una solución de 125 mM K⁺ (KKHS, con una substitución equimolar de KCl en lugar del NaCl en KHS) durante 2 minutos para comprobar la viabilidad del vaso. Posteriormente, después de lavar en cuatro ocasiones las arterias con KHS, los segmentos se dejaron reposar 30 minutos para recuperar y estabilizar su tensión. A continuación, los vasos se contrajeron con noradrenalina (NA; 1 μM) y cuando se alcanzó un tono de contracción estable, se añadieron concentraciones crecientes y acumulativas de acetilcolina (ACh, desde 1 nM a 10 μM), en intervalos de aproximadamente 2 minutos, como se indica en el siguiente esquema:



Para comprobar los mecanismos implicados en la relajación inducida por ACh, en algunos experimentos los vasos se pre-incubaron con el inhibidor de la síntesis de NO, N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME; 100 μM). También se analizó la pérdida espontánea de tono durante 15 min, tras contraer los vasos con NA y en ausencia de ACh u otro vasodilatador.

El papel de la D-glucosa *per se* en la respuesta vasodilatadora inducida por ACh se estudió incubando los segmentos vasculares con diferentes concentraciones de D-glucosa (5,5 y 22 mM) durante las 3 horas previas a la realización de la curva concentración-respuesta a ACh. Paralelamente, se analizó el efecto que sobre ellas tenía

la preincubación de concentraciones crecientes de interleuquina-1 β (IL-1 β ; 1, 2,5, 5 y 10 ng/ml) durante 30 minutos ó 2 horas.

En algunos experimentos, 30 minutos antes de la administración de 2,5 ng/ml IL-1 β y en presencia de diferentes concentraciones de D-glucosa extracelular (5,5 ó 22 mM), los vasos se pre-incubaron con anakinra (AK; 10, 50 o 100 μ g/ml), un inhibidor competitivo de los receptores de IL-1. Asimismo, otros segmentos se incubaron 30 minutos, previamente a la adición de 2,5 ng/ml IL-1 β y en presencia de 5,5 mM de D-glucosa, con el inhibidor no selectivo de la ciclooxigenasa (COX) indometacina (10 μ M), con el inhibidor selectivo de la sintasa de NO inducible (iNOS) 1400W (10 μ M), con el barredor de aniones superóxido 4-hidroxi-tempo (tempol, 100 μ M), con el inhibidor de la NADPH-oxidasa apocinina (10 μ M), o con el bloqueante de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) 6-aminonicotinamide (6-ANAM; 2 mM).

Las respuestas vasodilatadoras no dependientes del endotelio vascular se analizaron mediante la realización de curvas concentración-respuesta al donante de óxido nítrico nitroprusiato sódico (NPS; 0,1 nM –10 μ M).

3. Obtención de cultivos celulares

Las células endoteliales se obtuvieron de vena de cordón umbilical humano (HUVEC), utilizando en cada extracción celular tres cordones umbilicales con un protocolo aprobado por el comité ético del Hospital Universitario de Getafe (Peiró y col., 2007). Los cordones se recogieron en tubos estériles con medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Biological Industries, Beit Haemek, Israel), suplementado con 0,1 % de seroalbúmina bovina (BSA), 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de sulfato de estreptomina, 2,5 μ g/ml de anfotericina B y 0,05% de heparina. Antes de la extracción de las células endoteliales, los cordones se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril para eliminar restos de sangre y coágulos.

Tras limpiar el interior de la vena con PBS, uno de los extremos del cordón se cerró con una pinza de clampar estéril y por el otro extremo se introdujeron 2 ml de una solución de colagenasa tipo II (2 mg/mL) disuelta en PBS y previamente filtrada. Tras clampar el otro extremo del cordón, se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente permitiendo así la acción del enzima (Imagen 1). Pasado el periodo de incubación, se cortó uno de los extremos del cordón y se recogió en una placa de Petri estéril la solución de colagenasa arrastrando células endoteliales y hematíes. Para obtener el mayor número de células posibles, se lavó el interior de la vena con PBS, recogándose todo el eluyente. Este se añadió a un tubo estéril que contenía DMEM con 10% de suero fetal bovino (FCS; Biological Industries, Beit Haemek, Israel) y se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos. El precipitado resultante, se resuspendió y se centrifugó en las mismas condiciones repitiéndose este proceso otras dos veces hasta obtener el precipitado lo más limpio posible de glóbulos rojos. Tras la última centrifugación, el precipitado final se resuspendió en medio M199 (Biological Industries, Beit Haemek, Israel) suplementado con 20% de FCS, 25 μ g/ml de suplemento de crecimiento de células endoteliales (ECGS), 100 μ g/ml de heparina y los antibióticos anteriormente mencionados, y se sembró en una placa de cultivo de 60 mm de diámetro cubierta previamente con colágeno tipo I disuelto en ácido acético 0,1 M al 0,03%. Este primer cultivo de células endoteliales se incubó en una estufa a 37° C con una atmósfera del 5% de CO₂, reemplazando el medio de cultivo cada dos días hasta alcanzar la confluencia. Para los experimentos posteriores se utilizaron las células entre los pases 1 y 5, que se realizaron mediante la utilización de tripsina al 0,05% (Fig.10).

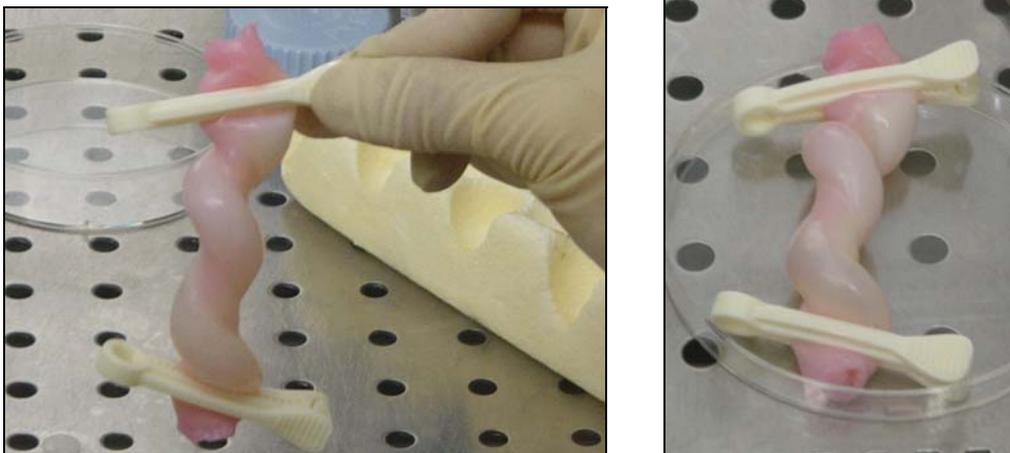


Imagen 1. Extracción de células endoteliales a partir del cordón umbilical humano

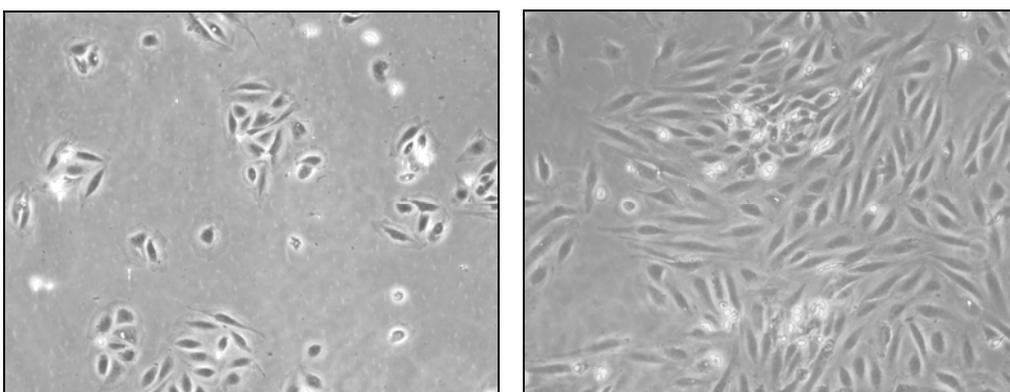


Figura 10. Cultivo primario de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) tras 24 h de su extracción (izquierda) y tras 72 h, en estado subconfluyente (derecha).

4. Caracterización celular

Una vez establecido el cultivo se caracterizaron las células obtenidas con el fin de corroborar el tipo y la pureza del cultivo. Las células obtenidas formaron una monocapa con aspecto de empedrado, característica de las células endoteliales, y mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta se observó una tinción positiva frente al factor de Von Willebrand o factor VIII (Dubey y col., 1992). Para su localización se empleó un

anticuerpo primario policlonal frente al factor VIII de células endoteliales (dilución 1/100; DAKO Corporation, CA, USA) y posteriormente un anticuerpo secundario unido a rodamina (dilución 1/100; Chemicon, Temecula, CA, USA). (Fig.11).

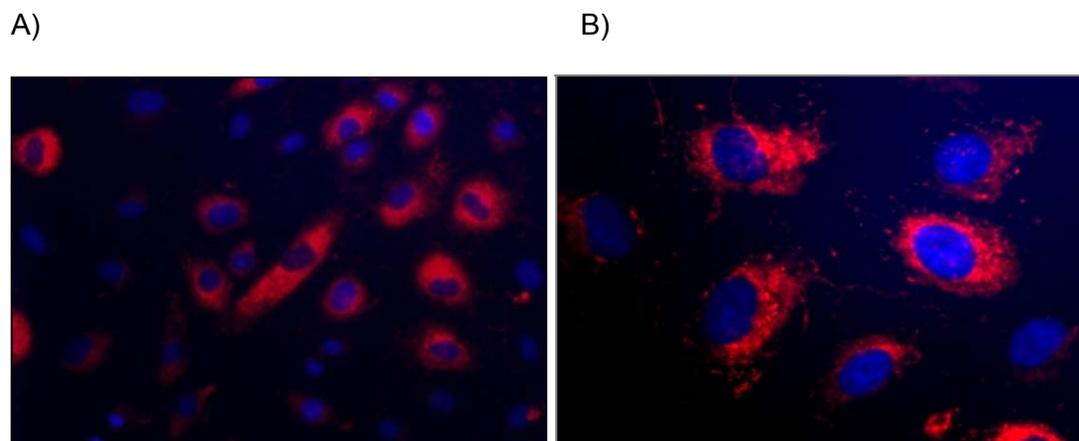


Figura 11. (A) Caracterización de HUVEC por inmunofluorescencia indirecta mediante marcaje de Factor VIII. 200X, (B) Detalle del patrón de expresión granular del factor VIII característico de endotelio. 1.000X .

5. Determinación de la actividad NADPH-oxidasa en células endoteliales.

Una vez establecidos cultivos celulares confluentes, las HUVEC, cultivadas en un medio con 5,5 ó 22 mM de D-glucosa, se trataron durante 30 minutos con 2,5 ng/ml de IL-1 β , en presencia o en ausencia de 150 μ g/ml de anakinra (AK), 30 μ M I de apocinina y/ó 2 mM de 6-ANAM.

La actividad de la NADPH-oxidasa se determinó en los cultivos de HUVEC sometidas a distintos tratamientos, a través del método de quimioluminiscencia. El reactivo lucigenina (nitrato de bis-N-metilacridinio) es un compuesto aromático que capta electrones de alta energía emitidos por las especies reactivas de oxígeno producidas por la actividad de la enzima NADPH- oxidasa, la emisión de luz (fotones) puede ser detectada por un luminómetro. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos, al

alcanzar la confluencia se ayunaron durante 24 horas con DMEM-0,1% de BSA y se incubaron durante 30 minutos con los tratamientos correspondientes. Cada tratamiento fue realizado por triplicado. Concluido el tiempo de tratamiento, se extrajeron las proteínas, para lo cual las células se lavaron con una solución de PBS frío y se rasparon con un rascador de plástico utilizando 600 μ l de PBS, a continuación se centrifugó la muestra 1 minuto a 13000 rpm a 4°C., se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 100 μ l de tampón de homogenización compuesto por KH_2PO_4 50 mM, EGTA 1 mM y sacarosa 150 mM a un pH de 7. Se homogenizó cada muestra con el micromortero de microtubos en hielo durante 5 minutos. La cantidad de proteína se cuantificó por medio del método colorimétrico del ácido bicinconínico (BCA; Pierce, Rockford, IL, USA). Las muestras obtenidas se almacenaron a -80° C, hasta ser procesadas. Una vez determinada la cantidad de proteína en cada muestra se efectuaron los cálculos para obtener 5 μ g de proteína. Posteriormente se preparó una solución compuesta por PBS sin calcio ni magnesio, una solución de lucigenina 5 μ M y una solución de NADPH 100 μ M, previamente a la realización del experimento la mezcla de estas soluciones se calentó a 37° C. En seguida se transfirió a un tubo de plástico 290 μ l de esta mezcla de soluciones y 10 μ l de lisado que contenía 5 μ g de proteína. Finalmente se tomaron medidas en un luminómetro de tubos (Optocomp IB, Bacterial Systems; GEM Biomedical Inc.) cada 10 segundos durante 5 minutos. Las primeras 5 mediciones se descartaron para permitir la estabilización de las lecturas y a partir de la sexta medición se calculó un promedio de todas las medidas obtenidas. Los datos se expresaron como las unidades de luz relativas (RLU) por μ g de proteína presente en cada muestra sometida a los diferentes tratamientos.

6. Determinación de la actividad NADPH-oxidasa en tejido

Para la obtención de tejidos se emplearon para cada experimento 5 ratas macho SD de 3 meses de edad, correspondientes a los grupos 1, 2, 7 y 8, las cuales fueron sacrificadas por inhalación de CO₂. Posteriormente, se extrajo el mesenterio y con ayuda de una lámpara de microcirugía se obtuvieron los microvasos eliminando el tejido conectivo que rodea los vasos al igual que la vena que circula paralela a la arteria. Los microvasos obtenidos se mantuvieron en una solución de Krebs Henseleit (KH) 5,5 mM de D-glucosa, y se distribuyeron de manera homogénea (8 segmentos arterias por tratamiento) en tubos con 1 ml de KH a 37°C en continuo burbujeo con una mezcla de carbógeno (95% O₂ y 5% de CO₂) que contenían 5,5 ó 22 mM D-glucosa. A continuación, los vasos fueron tratados durante 30 minutos con 2,5 ng/ml IL-1β en presencia o en ausencia de 100 μg/ml AK, 10 μM apocinina ó 2 mg/ml 6-ANAM. En algunos casos, los segmentos arteriales fueron mantenidos en KH 5,5 mM de D-glucosa y tratados durante 30 minutos con 10 μM apocinina ó 2 mM 6-ANAM. Al término del tratamiento, se homogenizó cada muestra con 150 μl de buffer de homogenización en un micromortero de vidrio hasta que los vasos fueron triturados.

Para el análisis, se preparó una solución de 125 μl de lucigenina, 175 μl de buffer de homogenización y 50 μl de muestra. Esta solución se colocó en una placa de 96 pocillos y se realizaron mediciones en un luminómetro de placas (Orion II Microplate Luminometer, Berthold delection systems). Para obtener los valores basales se realizaron (por cada muestra) 29 lecturas cada 40 segundos y durante 11 minutos para obtener los valores basales. Posteriormente, se agregó a cada muestra 25 μl de NADPH y se realizaron mediciones: 29 lecturas por muestra cada 40 segundos durante 11 minutos para determinar la actividad de la enzima NADPH-oxidasa. La actividad enzimática se expresó como unidades relativas de luz (RLU)/ μg de proteína/ min. Mediante BCA se determinó la cantidad de proteína.

7. Determinación de citoquinas en suero de animales DM.

La sangre recolectada mediante punción cardíaca fue centrifugada a 3000 rpm durante 20-30 minutos, tras este tiempo el suero fue recolectado y almacenada a -80°C hasta el análisis. Los niveles de citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β y TNF- α se analizaron en el suero de los animales mediante el ensayo de ELISA (Enzyme-Linked Immunoassay) y de acuerdo con las instrucciones de manufactura (RAT-IL-1 β ELISA KIT; Gen-Probe/Diaclone) y (RAT-TNF α ELISA KIT; Gen-Probe/Diaclone). Las placas fueron leídas en un lector de ELISA (ELx800 BIO-TEK Instruments Inc) a una absorbancia de 450 nm.

8. Soluciones y fármacos empleados.

i. Composición de la solución Krebs-Henseleit expresados en mM.

NaCl	115
KCl	4,6
CaCl ₂	2,5
KH ₂ PO ₄	1,2
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,2
NaHCO ₃	25
EDTA Na ₂ .2H ₂ O	0,01
D-glucosa	5,5, 11, ó 22

ii. Composición de la solución buffer de homogenización expresados en mM.

KH ₂ PO ₄	50 mM
EGTA	1 mM
Sacarosa	150 mM

iii. Fármacos y reactivos empleados.

1400W dihidroclorido (Sigma)
6-ANAM (Sigma)
Acetilcolina cloruro (Sigma)
Ácido cítrico monohidratado (Fluka Chemika)
Ácido L-ascórbico (Merck)
Anakinra (Biovitrum)
Apocinina (Sigma)
CaCl₂ (Merck)
Citrato trisódico (Merck)
EDTA Na₂·2H₂O (Sigma)
EGTA (Sigma)
Estreptozotocina (Sigma)
D-glucosa anhidra (Merck)
Indometacina (Sigma)
IL1-β (PeproTech)
KCl (Merck)
KH₂PO₄ (Merck)
L-NAME (Sigma)
Lucigenina : N,N'-dimetil 9,9' biacridinio dinitrato (Sigma)
MgSO₄·7H₂O (Merck)
NADPH: β-Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato. (Sigma)
NaHCO₃ (Merck)
Noradrenalina clorhidrato (Sigma)
Sacarosa (Panreac Química)
Tempol: 4-hidroxi-TEMPO (Sigma)

Las soluciones de cada fármaco se prepararon en agua destilada, salvo: NA, que se disolvió en solución salina (0,9% NaCl) con ácido ascórbico (0,01% p/v); estreptozotocina, que se disolvió en una solución de citrato trisódico 0,1M ajustada a un pH de 4-4,5 con ácido cítrico 1 M; lucigenina, que se disolvió en una solución de 0,1M EDTA en PBS; y NADPH, que fue disuelta en una solución 10 mM Tris/HCl. Estas soluciones se conservaron a -20°C excepto la estreptozotocina que se preparó en el momento de ser utilizada. El material de plástico estéril para el cultivo de células fue de Techno Plastic Products AGa.

8. Análisis Estadístico.

Los datos fueron expresados como la media \pm error estándar (ES). Para comparar las curvas de respuesta se utilizó el análisis de varianza a dos factores (concentración y grupo). Mediante *t* de student se compararon los valores discretos. Se empleó el programa estadístico *SPSSStatistics 17.0*. Los valores se consideraron significativamente distintos cuando la probabilidad de ser iguales fue menor del 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

1. Reactividad vascular en microvasos mesentéricos de rata SD control (Grupo 1).

1.1 Influencia de la D-glucosa extracelular sobre la relajación a ACh.

La Figura 9 muestra que la incubación de los vasos durante tres horas con diferentes concentraciones de D-glucosa extracelular (5.5 y 22 mM) no modificó ni la contracción originada por NA ni la ulterior respuesta relajadora dependiente de endotelio inducida por dosis crecientes y acumulativas de ACh (1 nM a 10 μ M)

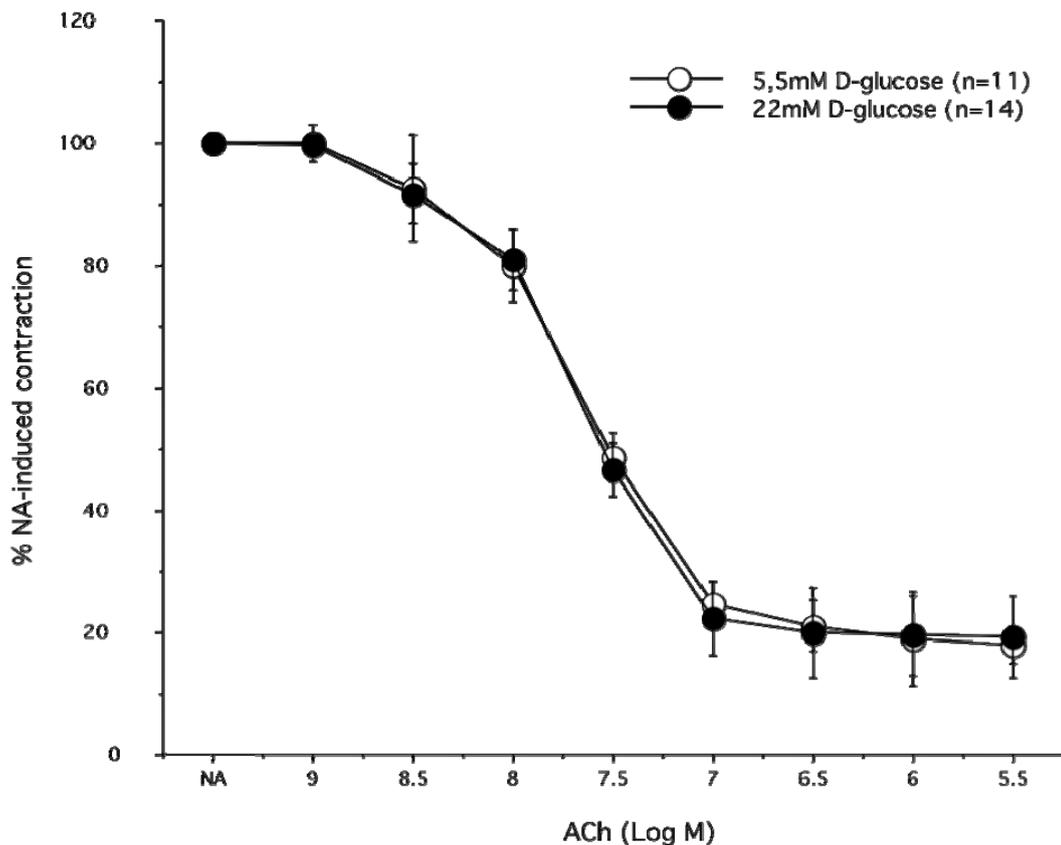


Figura 9. Efecto de la concentración de D-glucosa en el medio extracelular (5,5 y 22 mM) sobre las respuestas vasodilatadoras inducidas por acetilcolina (ACh) en microvasos mesentéricos aislados de rata SD. Los datos se expresan como la media \pm ES del porcentaje de la contracción previa inducida por noradrenalina (NA, 1 μ M), equivalente a $7,75 \pm 0,93$ y $7,79 \pm 0,81$ mNewtons, respectivamente, en presencia de 5,5 ó 22 mM D-glucosa (diferencias estadísticamente no significativas). (n) es el número de segmentos vasculares utilizados en cada curva, obtenidos de 9 animales.

1.2 Efecto de IL-1 β sobre la relajación inducida por ACh. Influencia de la concentración extracelular de D-glucosa.

En los siguientes experimentos, se estudió el efecto de la incubación durante 2 horas con una citoquina pro-inflamatoria como la IL-1 β (1, 2,5, 5 y 10 ng/ml) sobre las respuestas vasodilatadoras dependientes de endotelio inducidas por ACh. En los experimentos realizados en presencia de niveles normales de D-glucosa (5,5 mM), la IL-1 β no modificó la vasoconstricción originada por NA, mientras que produjo un deterioro de la relajación inducida por ACh que fue dependiente de la concentración de citoquina administrada (Fig. 10).

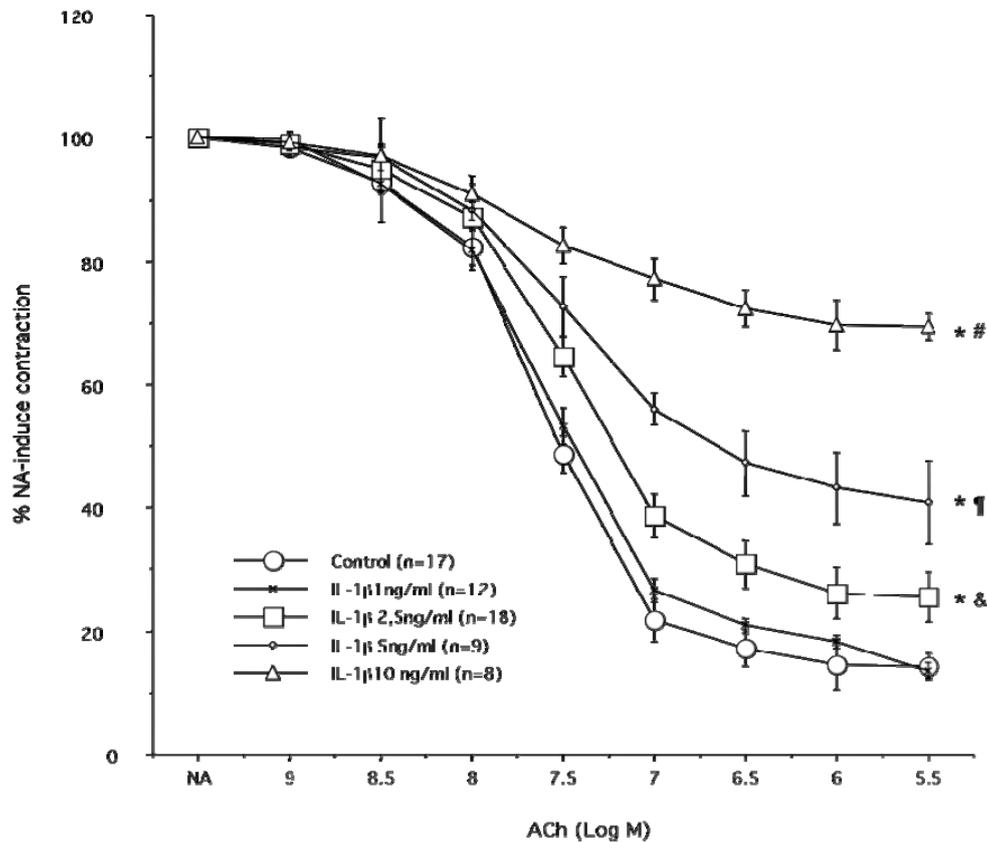


Figura 10. Efecto de IL-1 β (1, 2,5, 5 y 10 ng/ml) sobre las respuestas vasodilatadoras inducidas por acetilcolina (ACh) en microvasos mesentéricos de rata SD incubados un medio conteniendo 5,5 mM de D-glucosa extracelular. Los datos se expresan como la media \pm ES del porcentaje de la contracción previa inducida por noradrenalina (NA, 1 μ M), equivalente a 10,13 \pm 1,51, 9,99 \pm 0,62, 10,25 \pm 1,51, 9,12 \pm 0,32 y 8,84 \pm 1,31 mNewtons, respectivamente (diferencias estadísticamente no significativas. (n) es el número de segmentos vasculares utilizados en cada curva, obtenidos de 9 animales.* p<0,05 frente al grupo control, & p<0,05 frente a 1ng/ml IL-1 β , ¶ p<0,05 frente a 2,5ng/ml IL-1 β , # p<0,05 frente a 5ng/ml IL-1 β .

Cuando la influencia de las diferentes concentraciones de IL-1 β se estudió en un medio con 22 mM de D-glucosa extracelular (Fig. 11), no se observaron cambios en las respuestas producidas por NA, ni tampoco en los efectos sobre la relajación a ACh observadas con la concentración sub-umbral de la citoquina (1 ng/ml) ni con la concentración máxima utilizada (10 ng/ml). Sin embargo, el deterioro de la relajación endotelio-dependiente producido por las concentraciones intermedias de 2,5 y 5 ng/ml de IL-1 β se incrementó significativamente en presencia de 22 mM de D-glucosa. ($p=0,001$ respecto a 2,5 y 5 ng/ml en 5,5 mM D-glucosa, respectivamente).

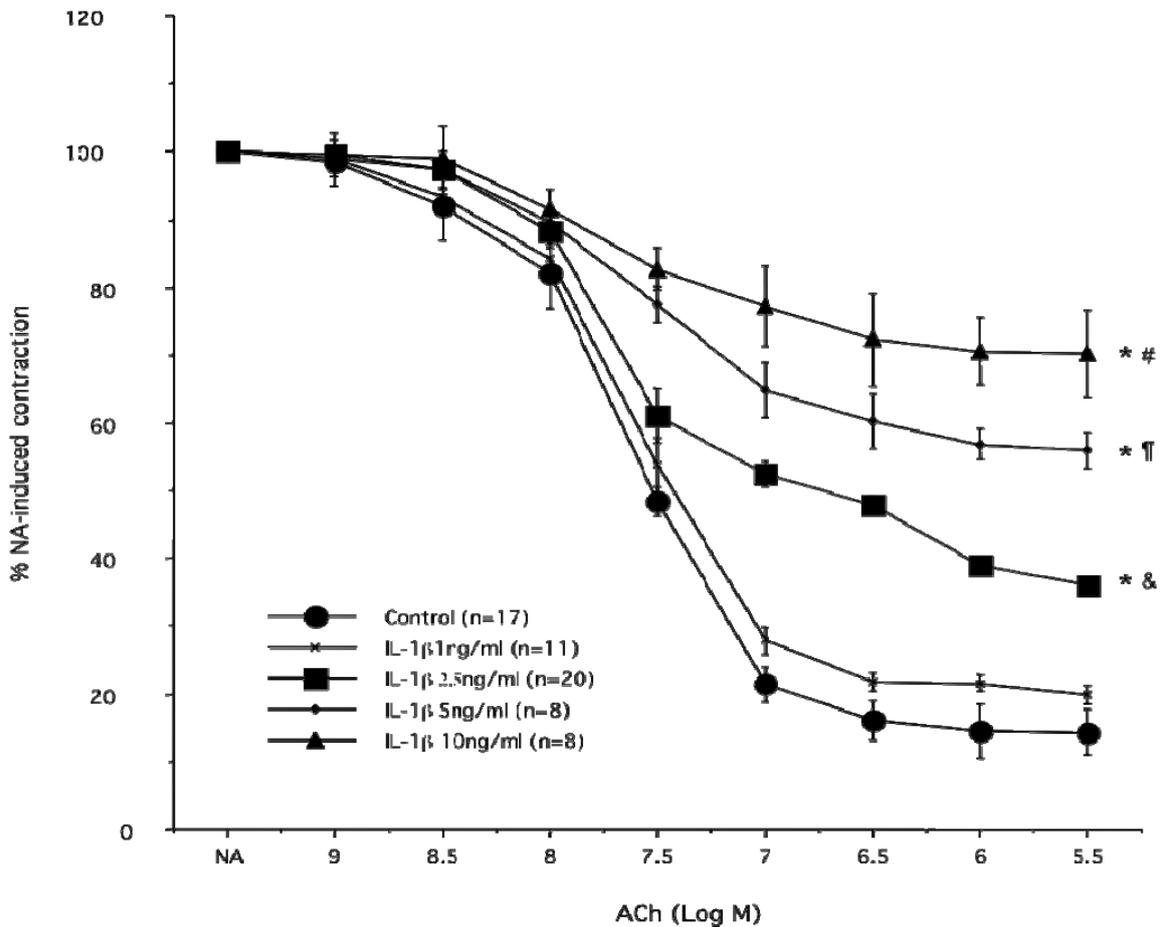


Figura 11 . Efecto de IL-1 β (1, 2,5, 5 y 10 ng/ml) sobre las respuestas vasodilatadoras a acetilcolina (ACh) en microvasos mesentéricos de rata SD en un medio conteniendo 22 mM de D-glucosa extracelular. Los datos se expresan como la media \pm ES del porcentaje de la contracción previa inducida por noradrenalina (NA, 1 μ M), equivalente a 9,67 \pm 1,27, 9,85 \pm 1,5, 8,58 \pm 0,62, 8,44 \pm 0,93 y 8,93 \pm 1,18 mNewtons, respectivamente, en presencia de 22mM D-glucosa (diferencias estadísticamente no significativas). (n) es el número de segmentos vasculares utilizados en cada curva, obtenidos de 7 animales. * $p<0,05$ frente al grupo control, & $p<0,05$ frente a 1ng/ml IL-1 β , ¶ $p<0,05$ frente a 2,5ng/ml IL-1 β , # $p<0,05$ frente a 5ng/ml IL-1 β .

Para comprobar si la duración del periodo de incubación con IL-1 β era relevante en los efectos de la citoquina sobre las respuestas vasodilatadoras, se realizaron experimentos en los que unos segmentos vasculares se trataban durante 2 horas con 2,5 ng/mL de IL-1 β mientras, simultáneamente, otros segmentos se incubaban durante un periodo más corto, de sólo 30 minutos, con la misma concentración de la citoquina. Estos experimentos se realizaron asimismo en presencia de concentraciones normales o elevadas de D-glucosa extracelular (5,5 y 22 mM, respectivamente). Como se muestra en la Figura 12, el deterioro de la relajación endotelio-dependiente producido por el tratamiento durante 30 minutos con 2,5 ng/ml IL-1 β era similar al ocasionado tras 2 horas de incubación con la citoquina. Asimismo, se potenciaba de manera análoga en un medio extracelular con 22 mM de D-glucosa.

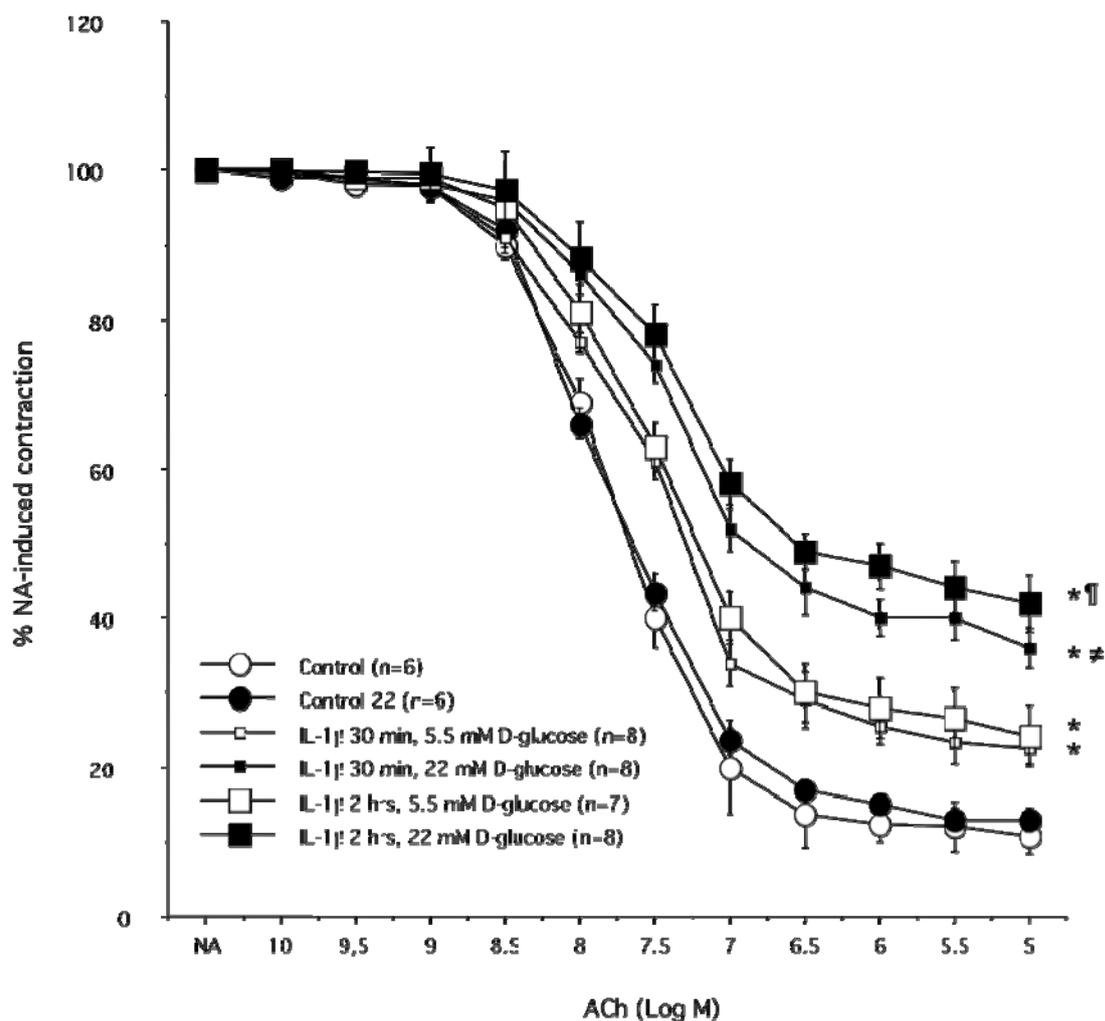


Figura 12. Efecto del tratamiento con 2,5 ng/ml de IL-1 β durante 30 minutos ó 2 horas sobre las respuestas vasodilatadoras a acetilcolina (ACh) en microvasos mesentéricos de rata SD en presencia de 5,5 ó 22 mM de D-glucosa extracelular. Los datos se expresan como la media \pm ES del porcentaje de la contracción previa inducida por noradrenalina (NA, 1 μ M), equivalente a 8,69 \pm 1,32 y 8,62 \pm 1,05 mNewtons (30 min, 5,5 y 22 mM D-glucosa, respectivamente; diferencias estadísticamente no significativas) ó 7,99 \pm 0,62 y 8,58 \pm 0,62 mNewtons, (2 horas, en presencia de 5,5 y 22 mM D-glucosa, respectivamente; diferencias estadísticamente no significativas). (n) es el número de segmentos vasculares utilizados en cada curva, obtenidos de 5 animales, *p<0,05 frente al grupo control, ¶ p<0,05 frente a IL-1 β 2 hrs. en 5,5mM D-glucose, ≠ p<0,05 frente a IL-1 β 30 min. en 5,5mM D-glucose

1.3 Efecto de $IL1-\beta$ sobre la relajación inducida por Nitroprusiato Sódico (NPS). Influencia de la concentración extracelular de D-glucosa.

Para verificar si los efectos de $IL1-\beta$ afectaban a las respuestas relajadoras no dependientes del endotelio vascular, se realizaron experimentos con nitroprusiato sódico (NPS), un vasodilatador que actúa directamente sobre el músculo liso vascular de manera independiente del endotelio. En las Figuras 13 y 14 se observa que las diferentes concentraciones de $IL1-\beta$ no modificaron la relajación inducida por NPS tanto en glucosa normal como en presencia de alta glucosa, por lo que se puede confirmar que el deterioro en la relajación producido por esta citoquina ocurre a nivel endotelial.

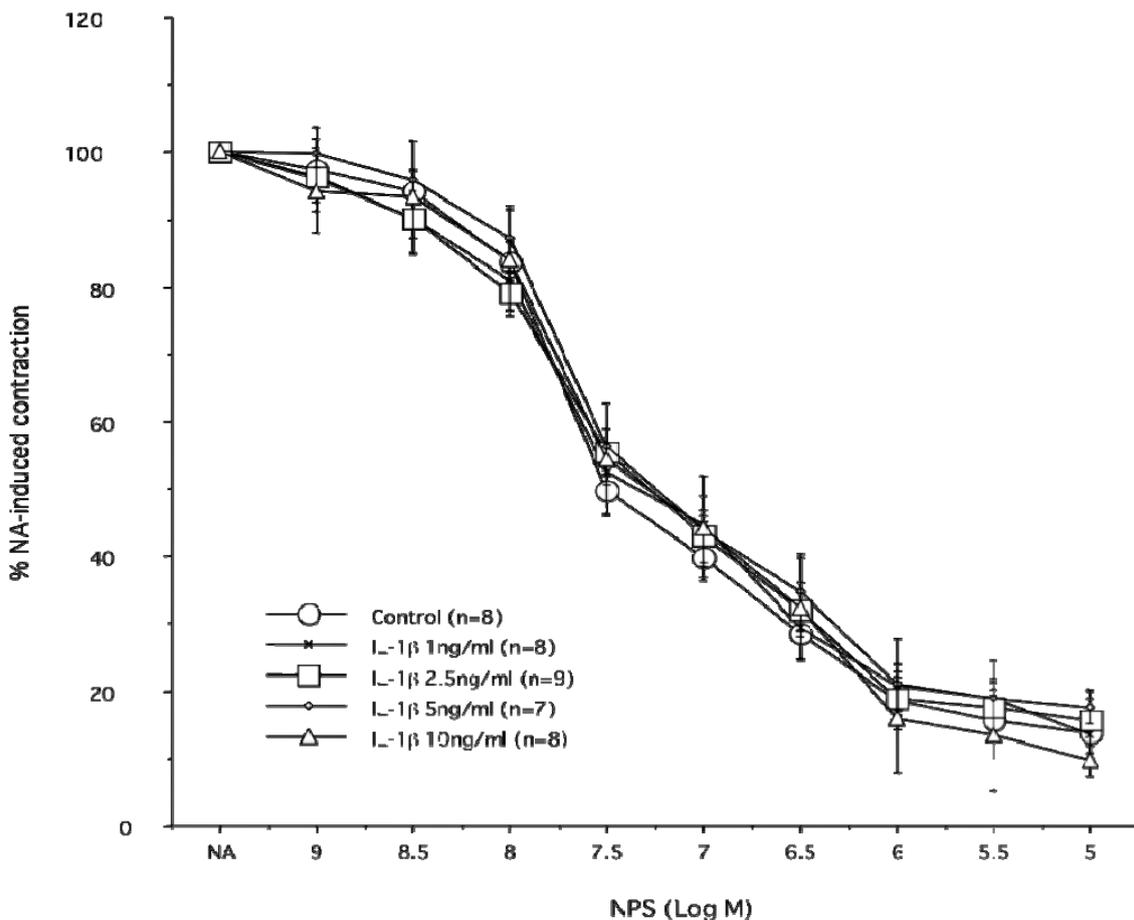


Figura 13. Efecto de $IL1-\beta$ (1, 2,5, 5 y 10 ng/ml) sobre las respuestas vasodilatadoras a nitroprusiato sódico (NPS) en microvasos mesentéricos de rata SD en un medio conteniendo 5,5 mM de D-glucosa extracelular. Los datos se expresan como la media \pm ES del porcentaje de la contracción previa inducida por noradrenalina (NA, 1 μ M), equivalente a 7,77 \pm 1,07, 6,55 \pm 0,85, 7,58 \pm 1,31, 7,64 \pm 1,87 y 6,93 \pm 2,11 mNewtons, respectivamente (diferencias estadísticamente no significativas). (n) es el número de segmentos vasculares utilizados en cada curva, obtenidos de 5 animales.

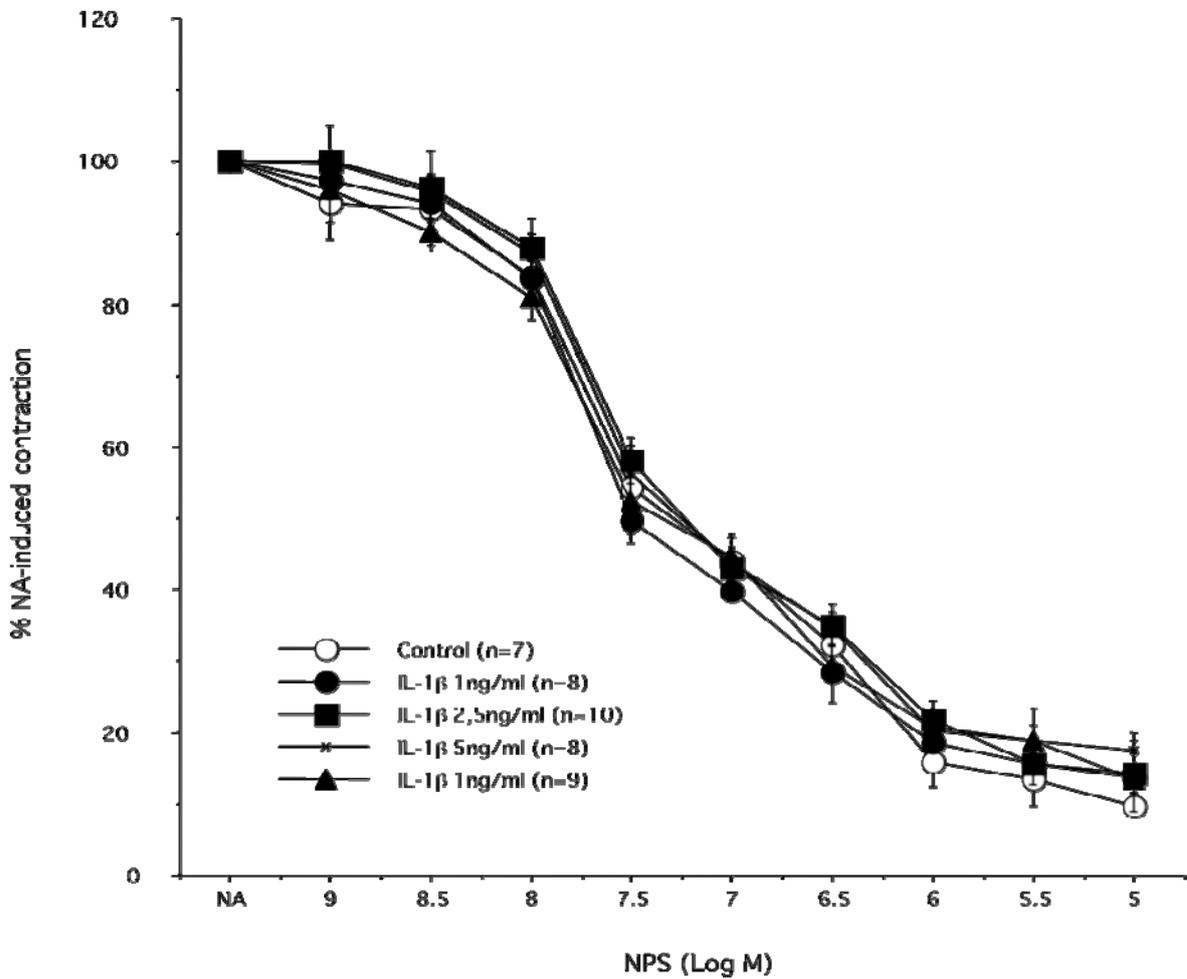


Figura 15. Efecto de IL-1 β (1, 2,5, 5 y 10 ng/ml) sobre las respuestas vasodilatadoras a nitroprusiato sódico (NPS) en microvasos mesentéricos de rata SD en un medio conteniendo 22 mM de D-glucosa extracelular. Los datos se expresan como la media \pm ES del porcentaje de la contracción previa inducida por noradrenalina (NA, 1 μ M), equivalente a 8,23 \pm 1,43, 7,53 \pm 2,05, 7,23 \pm 1,01, 8,64 \pm 2,07 y 9,92 \pm 2,82 mNewtons, respectivamente (diferencias estadísticamente no significativas). (n) es el número de segmentos vasculares utilizados en cada curva, obtenidos de 5 animales.

1.4 Interferencia farmacológica del efecto de IL-1-β sobre la relajación a ACh.

1.4.1 Efecto de anakinra (AK)

Inicialmente, se estudió el efecto de un bloqueante selectivo de los receptores para interleuquina-1 (IL-1), como anakinra (AK, 10, 50 y 100 µg/ml). En experimentos preliminares, se demostró que el tratamiento con este agente durante los 30 minutos previos en los controles no tenía efecto *per se* sobre la contractilidad a NA ni sobre la relajación inducida por ACh (Fig. 16).

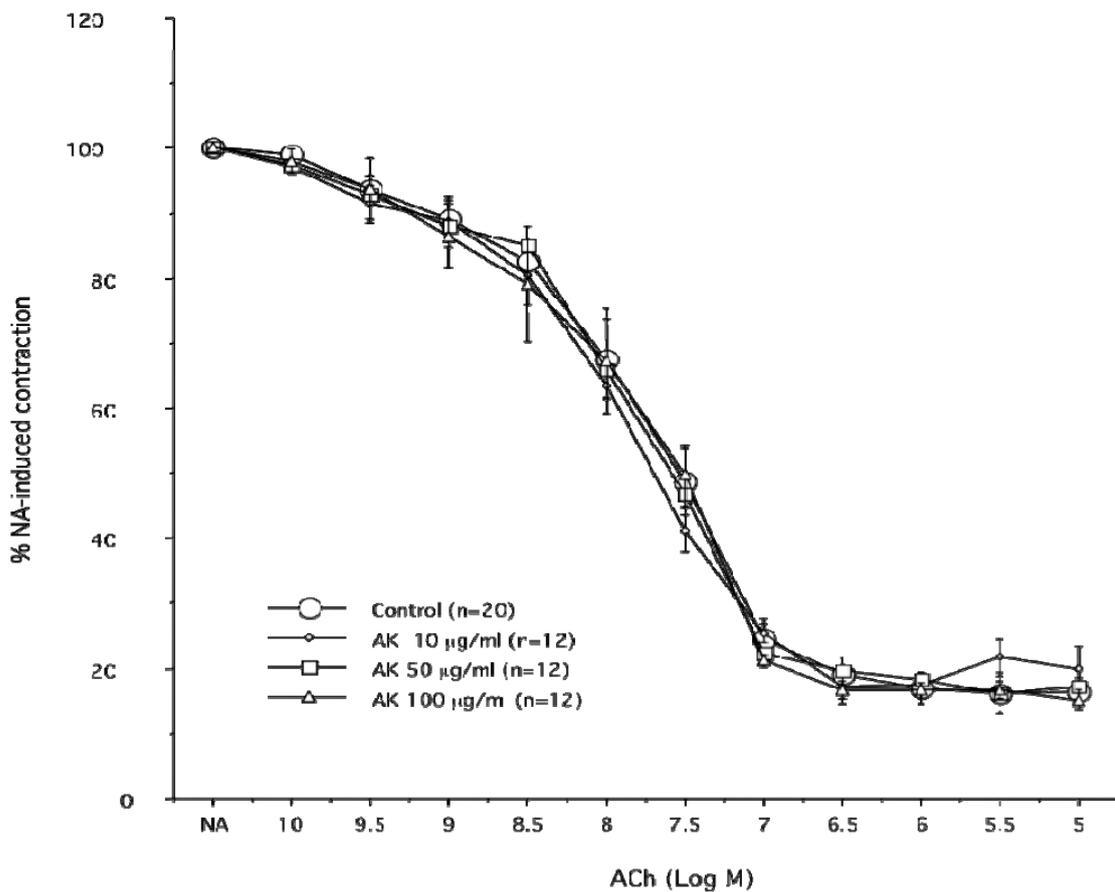


Figura 16. Efecto de AK (10, 50 y 100 µg/ml) sobre las respuestas vasodilatadoras a acetilcolina (ACh) en microvasos mesentéricos de rata SD en presencia de un medio conteniendo 5,5 mM de D-glucosa extracelular. Los datos se expresan como la media±ES del porcentaje de la contracción previa inducida por noradrenalina (NA, 1 µM), equivalente a 8,30±1,12, 7,84±0,62, 7,47±1,04 y 7,48±0,86 mNewtons, respectivamente (diferencias estadísticamente no significativas). (n) es el número de segmentos vasculares utilizados en cada curva, obtenidos de 8 animales.

Sin embargo, la disfunción endotelial provocada por 2.5 ng/ml IL-1 β era revertida por (AK) de manera dependiente de la concentración. La dosis más baja utilizada de AK (10 μ g/ml) no mejoró la relajación a ACh, mientras que 50 μ g/ml de AK revirtió parcialmente la disfunción endotelial inducida la citoquina y 100 μ g/ml AK la revirtió por completo, de modo que la relajación a ACh fue similar a la obtenida en situación control (Fig. 17).

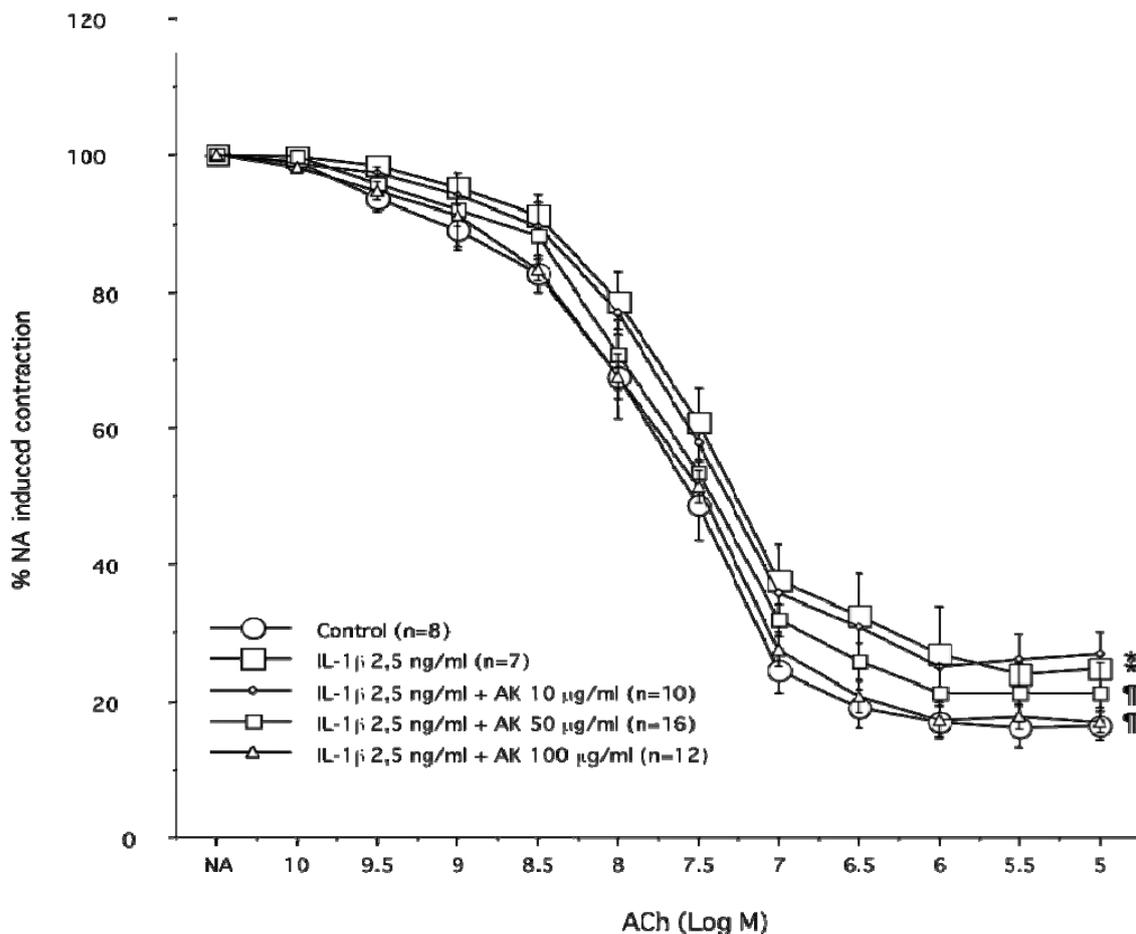


Figura 17. Efecto de AK (10, 50 y 100 μ g/ml) sobre la disfunción endotelial (menor respuesta vasodilatadora a ACh) originada por 2,5 ng/ml de IL-1 β en microvasos mesentéricos de rata SD en presencia de una concentración de 5,5 mM de D-glucosa extracelular. Los datos se expresan como la media \pm ES del porcentaje de la contracción previa inducida por noradrenalina (NA, 1 μ M), equivalente a 10,3 \pm 1,12, 10,41 \pm 2,03, 11 \pm 026, 10,21 \pm 0,54 y 9,97 \pm 1,23 mNewtons, respectivamente (diferencias estadísticamente no significativas). (n) es el número de segmentos vasculares utilizados en cada curva, obtenidos de 8 animales. * p<0,05 frente al grupo control, ¶ p<0,05 frente a IL-1 β .

Es interesante resaltar que el tratamiento con AK tuvo efectos análogos para prevenir la disfunción endotelial producida por 2.5 ng/ml IL-1 β cuando estaba potenciada en un medio con 22 mM de D-glucosa extracelular (Fig. 18). Es decir, el bloqueo de los

receptores para IL-1 antagonizó no sólo los efectos de la citoquina en glucosa normal, sino su potenciación en alta glucosa.

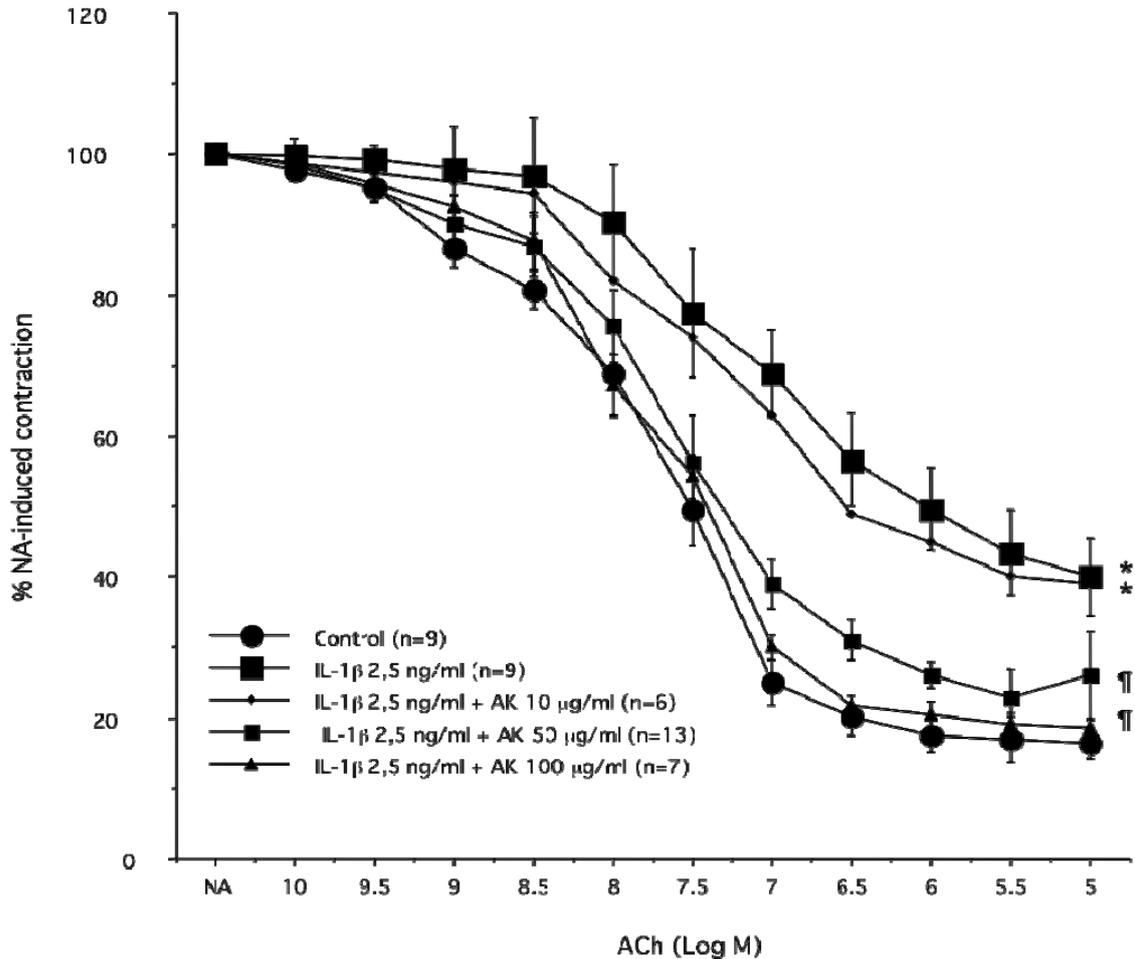


Figura 18. Efecto de AK (10, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$) sobre la disfunción endotelial (menor respuesta vasodilatadora a ACh) originada por 2,5 ng/ml de IL-1 β en microvasos mesentéricos de rata SD en presencia de una concentración de 22 mM de D-glucosa extracelular. Los datos se expresan como la media \pm ES del porcentaje de la contracción previa inducida por noradrenalina (NA, 1 μM), equivalente a 6,58 \pm 1,38, 7,03 \pm 1,41, 6,98 \pm 1,39, 7,21 \pm 0,76 y 7,05 \pm 1,31 mNewtons, respectivamente (diferencias estadísticamente no significativas). (n) es el número de segmentos vasculares utilizados en cada curva, obtenidos de 6 animales. * $p < 0,05$ frente al grupo control, ¶ $p < 0,05$ frente a IL-1 β .

1.4.2 Efecto de indometacina.

El tratamiento de los microvasos mesentéricos durante 30 minutos con el inhibidor inespecífico de la COX indometacina (10 μM) no modificó la respuesta vasoconstrictora inducida por NA ni la relajación endotelio-dependiente a ACh en la situación control (Fig. 19). Adicionalmente, la indometacina tampoco alteró la disfunción endotelial provocada

por 2,5 ng/ml de IL-1 β . Estos resultados no apoyan la participación de los derivados de la COX en la alteración de la función endotelial inducida por la citoquina.

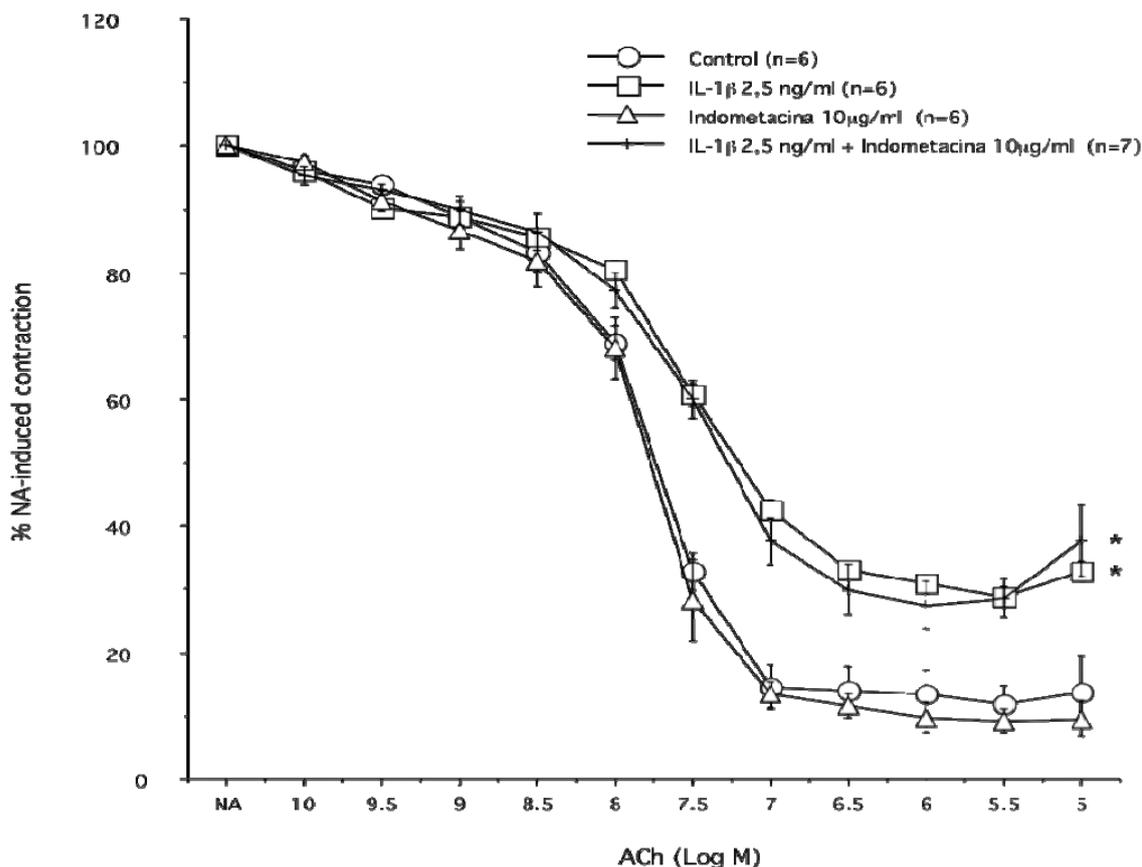


Figura 19. Efecto de 10 μ M Indometacina sobre la disfunción endotelial (menor respuesta vasodilatadora a ACh) originada por 2,5 ng/ml de IL-1 β en microvasos mesentéricos de rata SD en presencia de una concentración de 5,5 mM de D-glucosa extracelular. Los datos se expresan como la media \pm ES del porcentaje de la contracción previa inducida por noradrenalina (NA, 1 μ M), equivalente a 9,02 \pm 0,98, 7,18 \pm 1,33, 8,12 \pm 1,13 y 9,06 \pm 1,27 mNewtons, respectivamente (diferencias estadísticamente no significativas). (n) es el número de segmentos vasculares utilizados en cada curva, obtenidos de 5 animales * p<0,05 frente al grupo control.

1.4.3 Efecto de 1400W.

El tratamiento de los microvasos mesentéricos durante 30 minutos con el inhibidor específico de la sintasa inducible de NO 1400W (10 μ M) no modificó la respuesta vasoconstrictora inducida por NA ni la relajación endotelio-dependiente a ACh en la situación control (Fig. 20). Adicionalmente, este agente tampoco alteró la disfunción

endotelial provocada por 2,5 ng/ml de IL-1 β . Estos resultados no sugieren una participación de la iNOS en la alteración de la función endotelial inducida por la citoquina.

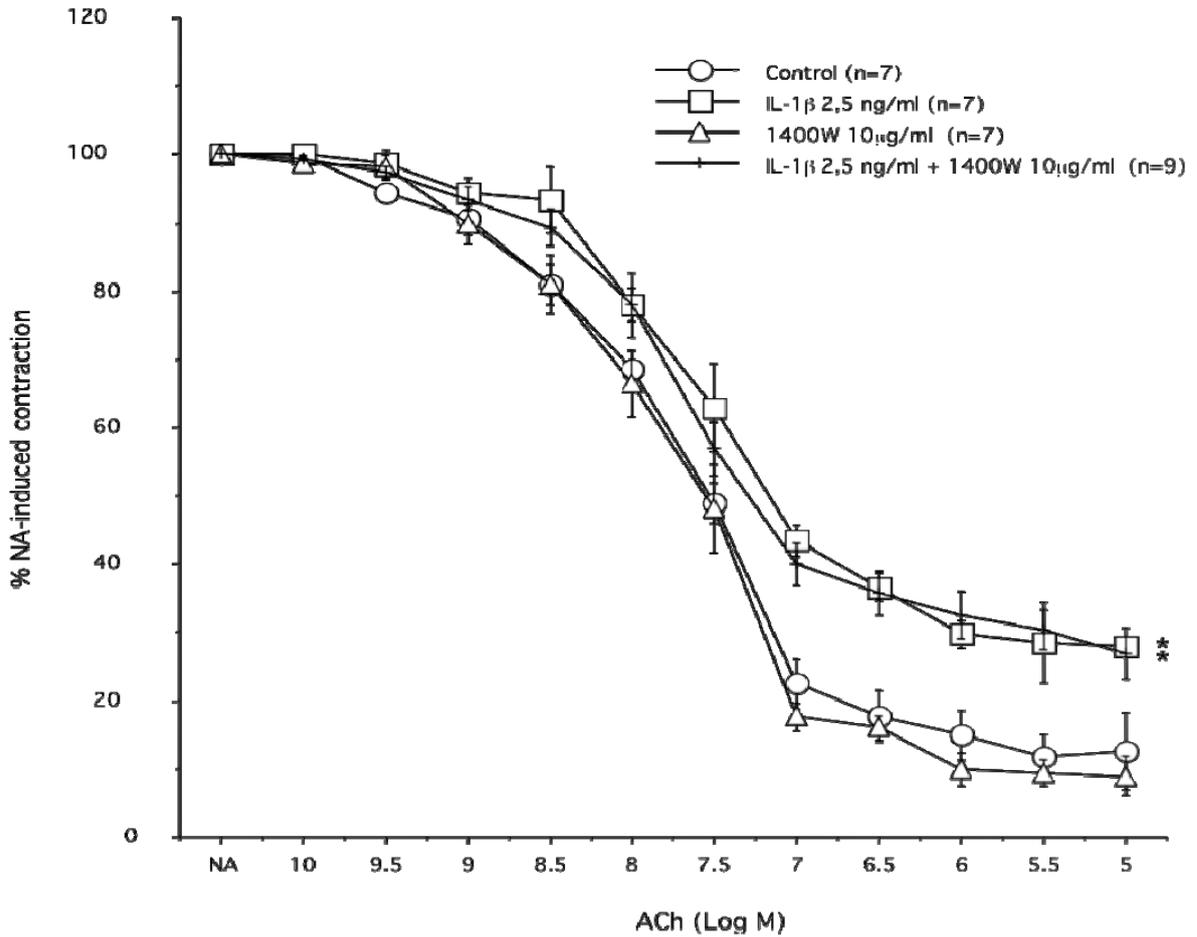


Figura 20. Efecto de 10 μ M 1400W sobre la disfunción endotelial (menor respuesta vasodilatadora a ACh) originada por 2,5 ng/ml de IL-1 β en microvasos mesentéricos de rata SD en presencia de una concentración de 5,5 mM de D-glucosa extracelular. Los datos se expresan como la media \pm ES del porcentaje de la contracción previa inducida por noradrenalina (NA, 1 μ M), equivalente a 9,31 \pm 1,18, 9,49 \pm 1,12, 8,75 \pm 0,98 y 10,87 \pm 1,21 mNewtons, respectivamente (diferencias estadísticamente no significativas). (n) es el número de segmentos vasculares utilizados en cada curva, obtenidos de 5 animales * $p < 0,05$ frente al grupo control.

1.4.4 Efecto de tempol.

El tratamiento de los microvasos mesentéricos durante 30 minutos con el barredor intracelular de aniones superóxido tempol (100 μ M) no modificó la respuesta vasoconstrictora inducida por NA ni la relajación endotelio-dependiente a ACh en la situación control (Fig. 21). Sin embargo, el tempol revirtió parcialmente la disfunción endotelial provocada por 2,5 ng/ml de IL-1 β . Estos resultados sugieren la participación de

especies reactivas de oxígeno, posiblemente aniones superóxido, en la alteración de la función endotelial inducida por IL-1 β .

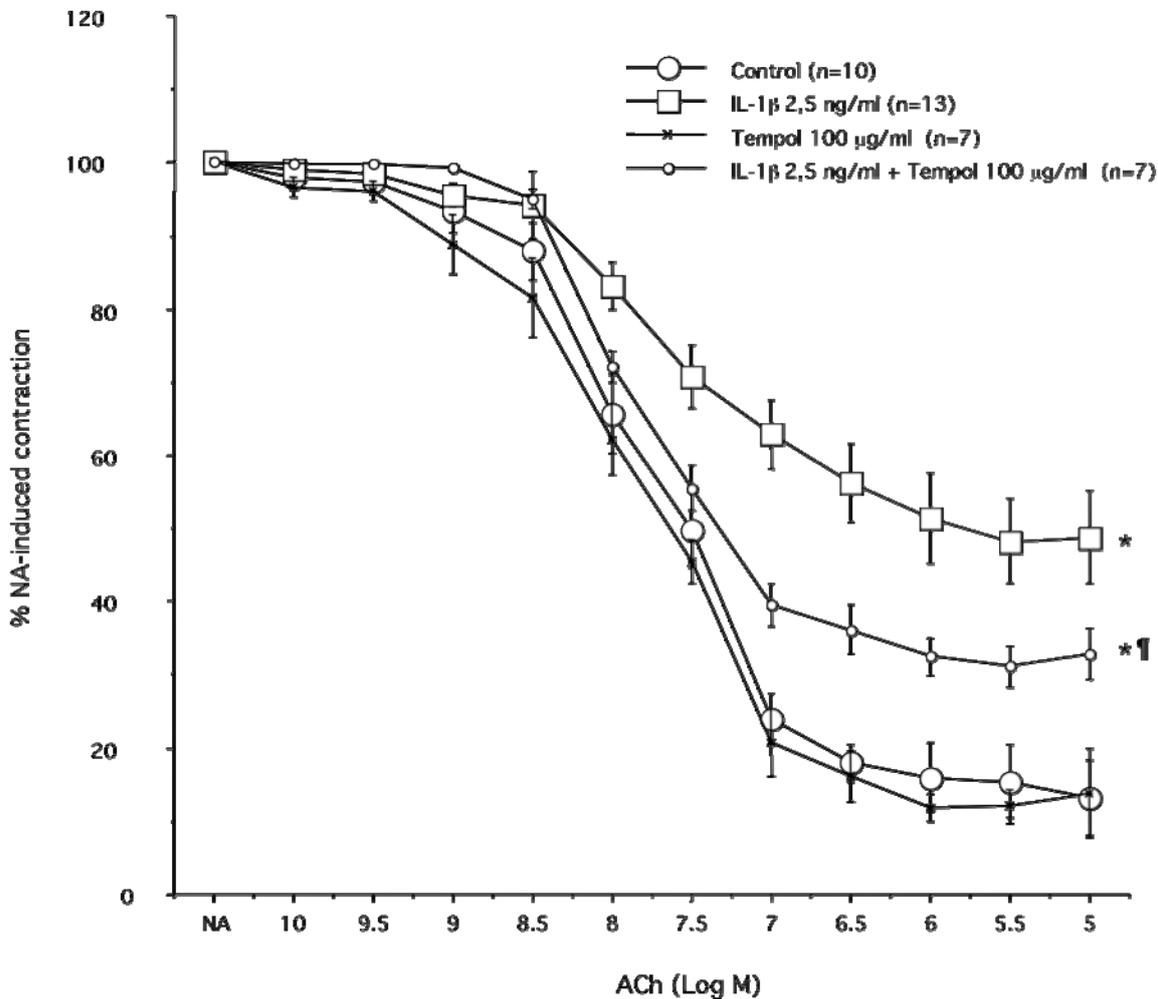


Figura 21. Efecto de 100 μ M de tempol sobre la disfunción endotelial (menor respuesta vasodilatadora a ACh) originada por 2,5 ng/ml de IL-1 β en microvasos mesentéricos de rata SD en presencia de una concentración de 5,5 mM de D-glucosa extracelular. Los datos se expresan como la media \pm ES del porcentaje de la contracción previa inducida por noradrenalina (NA, 1 μ M), equivalente a 6,89 \pm 1,12, 7,31 \pm 2,04, 7,68 \pm 1,19 y 7,79 \pm 0,94 mNewtons, respectivamente (diferencias estadísticamente no significativas). (n) es el número de segmentos vasculares utilizados en cada curva, obtenidos de 7 animales. *p<0,05 frente al grupo control, ¶ p<0,05 frente a IL-1 β .

La capacidad del tempol para restaurar parcialmente la disfunción endotelial originada por 2,5 ng/ml de IL-1 β también se observó en un medio conteniendo 22 mM de D-glucosa (Fig. 22), lo que sugiere que la potenciación del deterioro endotelial producido por la elevación de la D-glucosa extracelular está mediada, al menos en parte, por aniones superóxido.

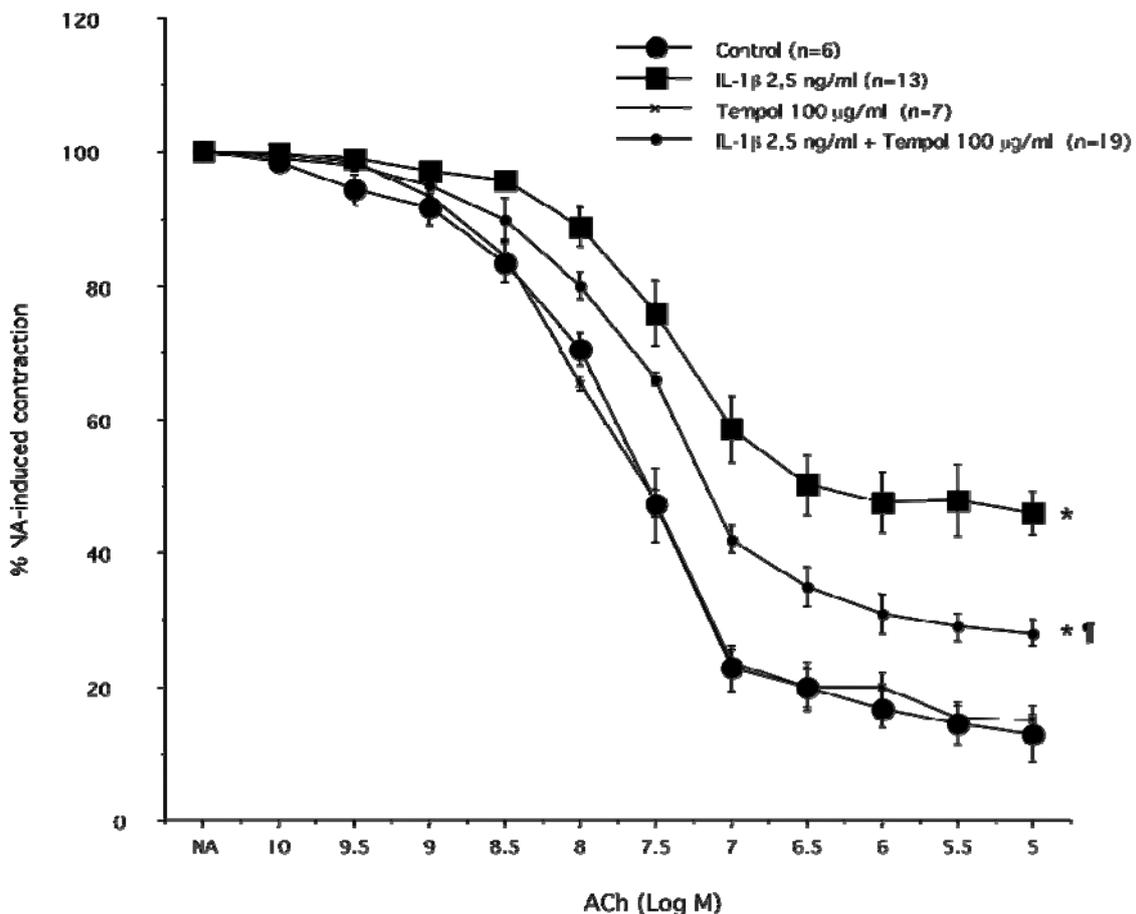


Figura 22. Efecto de 100 μ M de tempol sobre la disfunción endotelial (menor respuesta vasodilatadora a ACh) originada por 2,5 ng/ml de IL-1 β en microvasos mesentéricos de rata SD en presencia de una concentración de 5,5 mM de D-glucosa extracelular. Los datos se expresan como la media \pm ES del porcentaje de la contracción previa inducida por noradrenalina (NA, 1 μ M), equivalente a 7,21 \pm 2,09, 6,52 \pm 1,11, 11,06 \pm 2,21 y 8,52 \pm 1,57 mNewtons, respectivamente (diferencias estadísticamente no significativas). (n) es el número de segmentos vasculares utilizados en cada curva, obtenidos de 5 animales *p<0,05 frente al grupo control, ¶ p<0,05 frente a IL-1 β .

1.4.5 Efecto de Apocinina.

El tratamiento de los microvasos mesentéricos durante 30 minutos con el bloqueante de la enzima NADPH-oxidasa apocinina (10 μ M) no modificó la respuesta vasoconstrictora inducida por NA ni la relajación endotelio-dependiente a ACh en la situación control (Fig. 23). Sin embargo, la apocinina revirtió parcialmente la disfunción endotelial provocada por 2,5 ng/ml de IL-1 β . Estos resultados indican un papel para la enzima NADPH-oxidasa en la alteración de la función endotelial inducida por la citoquina.

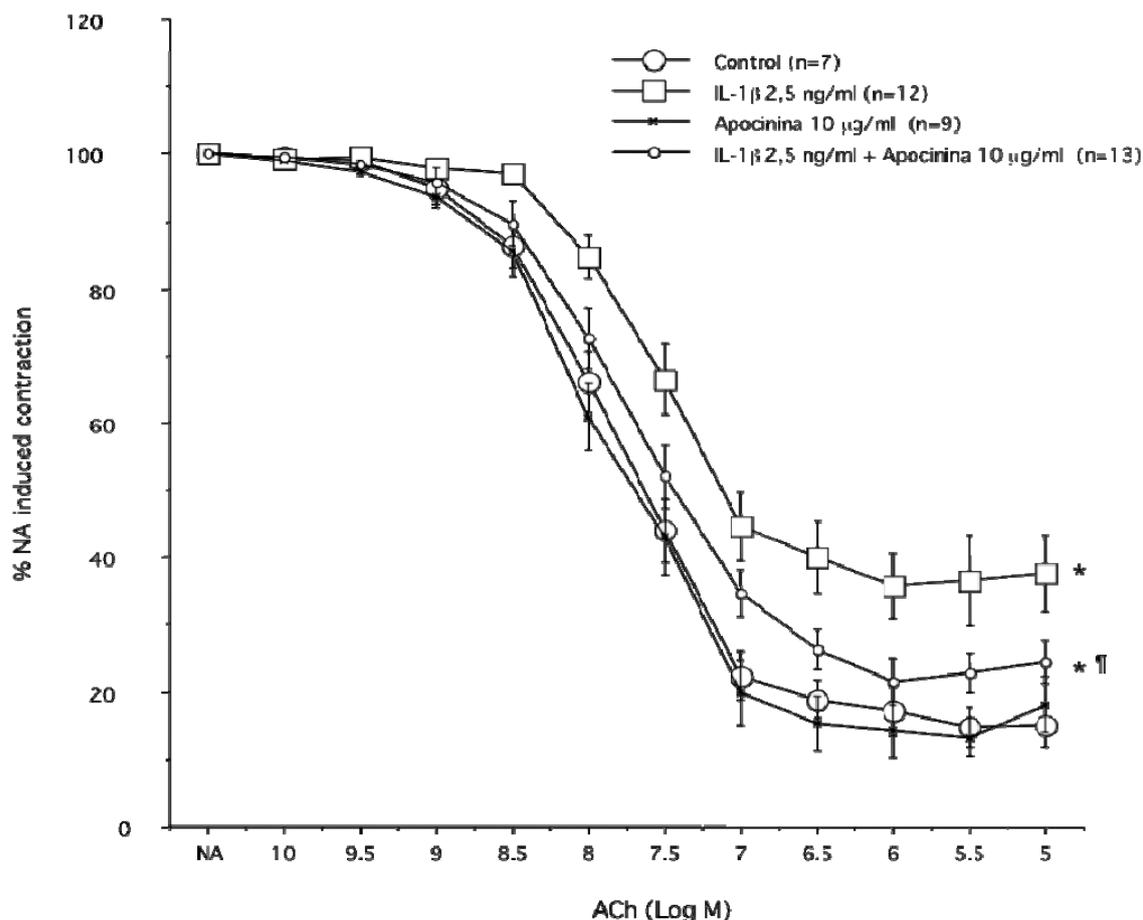


Figura 23 . Efecto de 10 μ M de apocinina sobre la disfunción endotelial (menor respuesta vasodilatadora a ACh) originada por 2,5 ng/ml de IL-1 β en microvasos mesentéricos de rata SD en presencia de una concentración de 5,5 mM de D-glucosa extracelular. Los datos se expresan como la media \pm ES del porcentaje de la contracción previa inducida por noradrenalina (NA, 1 μ M), equivalente a 10,53 \pm 0,87, 9,38 \pm 1,11, 10,39 \pm 1,78 y 9,44 \pm 1,07 mNewtons, respectivamente (diferencias estadísticamente no significativas). (n) es el número de segmentos vasculares utilizados en cada curva, obtenidos de 6 animales. *p<0,05 frente al grupo control , ¶ p<0,05 frente a IL-1 β .

La capacidad de la apocinina para restaurar parcialmente la disfunción endotelial originada por 2,5 ng/ml de IL-1 β también se observó de forma similar en un medio conteniendo 22 mM de D-glucosa (Fig. 24), lo que sugiere que la potenciación del deterioro endotelial producido por la elevación de la D-glucosa extracelular también está mediada por la activación de la enzima NADPH oxidasa (Fig. 24).

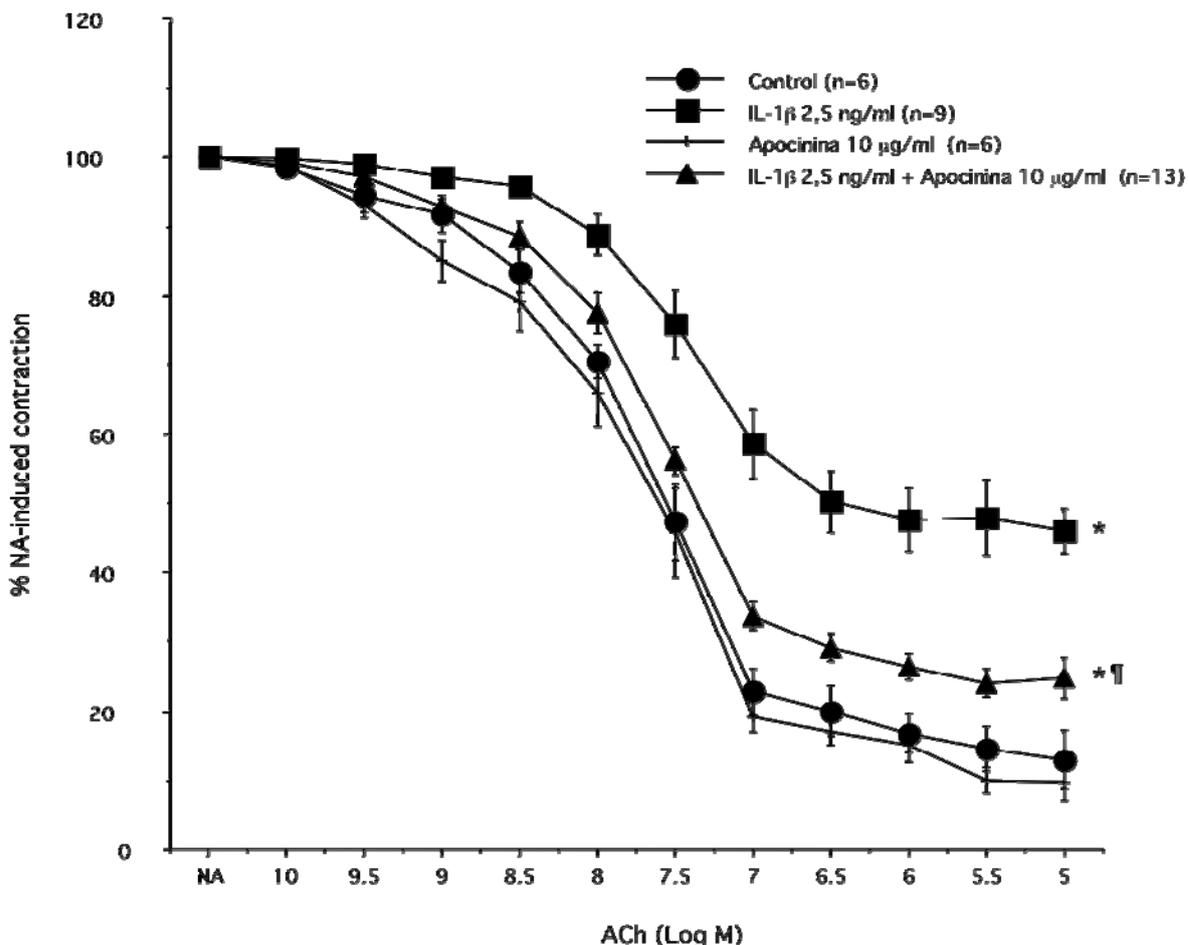


Figura 24. Efecto de 10 μ M de apocinina sobre la disfunción endotelial (menor respuesta vasodilatadora a ACh) originada por 2,5 ng/ml de IL-1 β en microvasos mesentéricos de rata SD en presencia de una concentración de 22 mM de D-glucosa extracelular. Los datos se expresan como la media \pm ES del porcentaje de la contracción previa inducida por noradrenalina (NA, 1 μ M), equivalente a 10,01 \pm 2,21, 9,63 \pm 0,87, 6,81 \pm 3,01 y 10,08 \pm 0,73 mNewtons, respectivamente (diferencias estadísticamente no significativas)., (n) es el número de segmentos vasculares utilizados en cada curva, obtenidos de 5 animales. *p<0,05 frente al grupo control, ¶ p<0,05 frente a IL-1 β .

1.4.5 Efecto de 6-ANAM.

El tratamiento de los microvasos mesentéricos durante 30 minutos con el inhibidor de la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PD), 6-ANAM (2 mM) no modificó la respuesta vasoconstrictora inducida por NA ni la relajación endotelio-dependiente a ACh en la situación control (Fig. 25). Sin embargo, el 6-ANAM revirtió parcialmente la disfunción endotelial provocada por 2,5 ng/ml de IL-1 β . Estos resultados indican un papel para la G6PD como donante del sustrato NADPH para la enzima NADPH-oxidasa en la alteración de la función endotelial inducida por la citoquina.

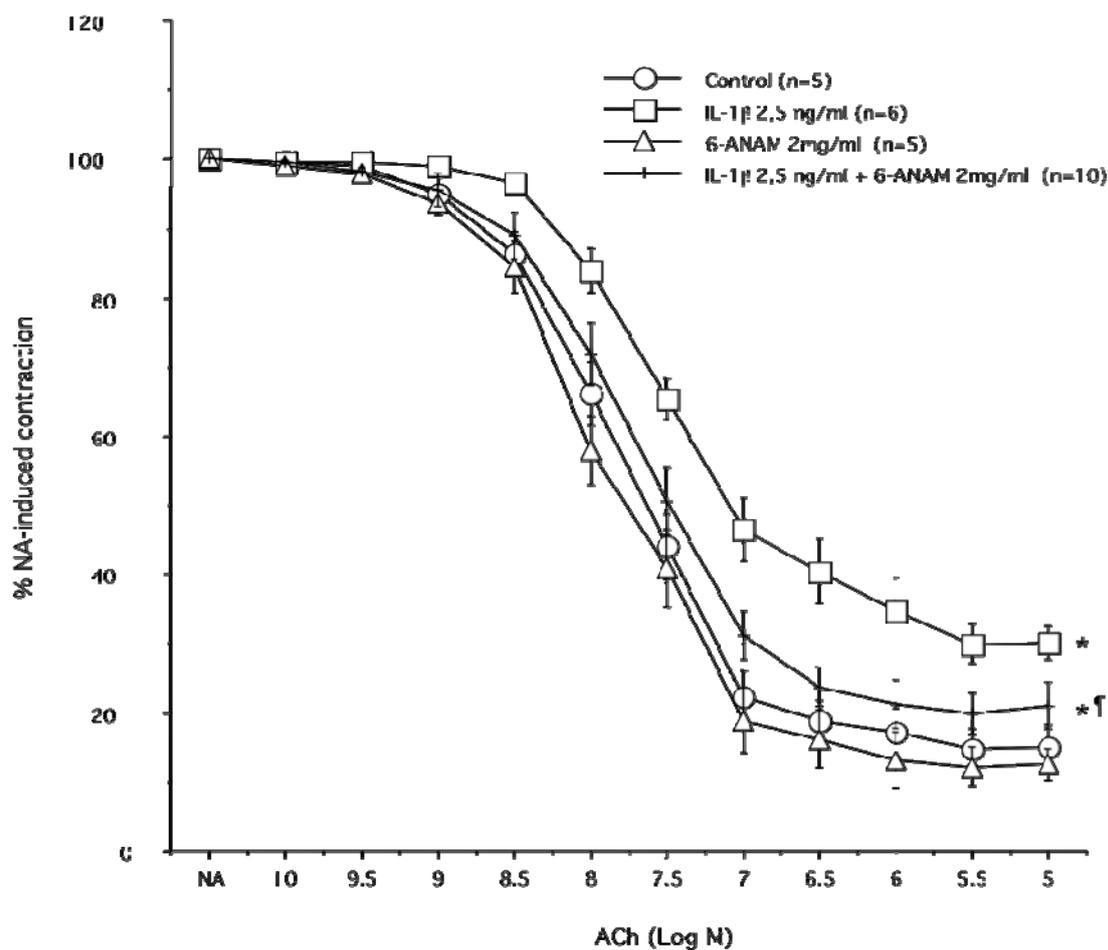


Figura 25. Efecto de 2 mM de 6-ANAM sobre la disfunción endotelial (menor respuesta vasodilatadora a ACh) originada por 2,5 ng/ml de IL-1 β en microvasos mesentéricos de rata SD en presencia de una concentración de 5,5 mM de D-glucosa extracelular. Los datos se expresan como la media \pm ES del porcentaje de la contracción previa inducida por noradrenalina (NA, 1 μ M), equivalente a 11 \pm 1,31, 11,14 \pm 1,09, 7,33 \pm 2,48 y 11,21 \pm 0,87 mNewtons, respectivamente (diferencias estadísticamente no significativas). (n) es el número de segmentos vasculares utilizados en cada curva, obtenidos de 5 animales. *p<0,05 frente al grupo control, † p<0,05 frente a IL-1 β .

La capacidad del 6-ANAM para restaurar parcialmente la disfunción endotelial originada por 2,5 ng/ml de IL-1 β también se observó en un medio conteniendo 22 mM de D-glucosa (Fig. 26), lo que sugiere que la potenciación del deterioro endotelial producido por la elevación de la D-glucosa extracelular también está relacionada con la actividad de la enzima G6PD como fuente de NADPH.

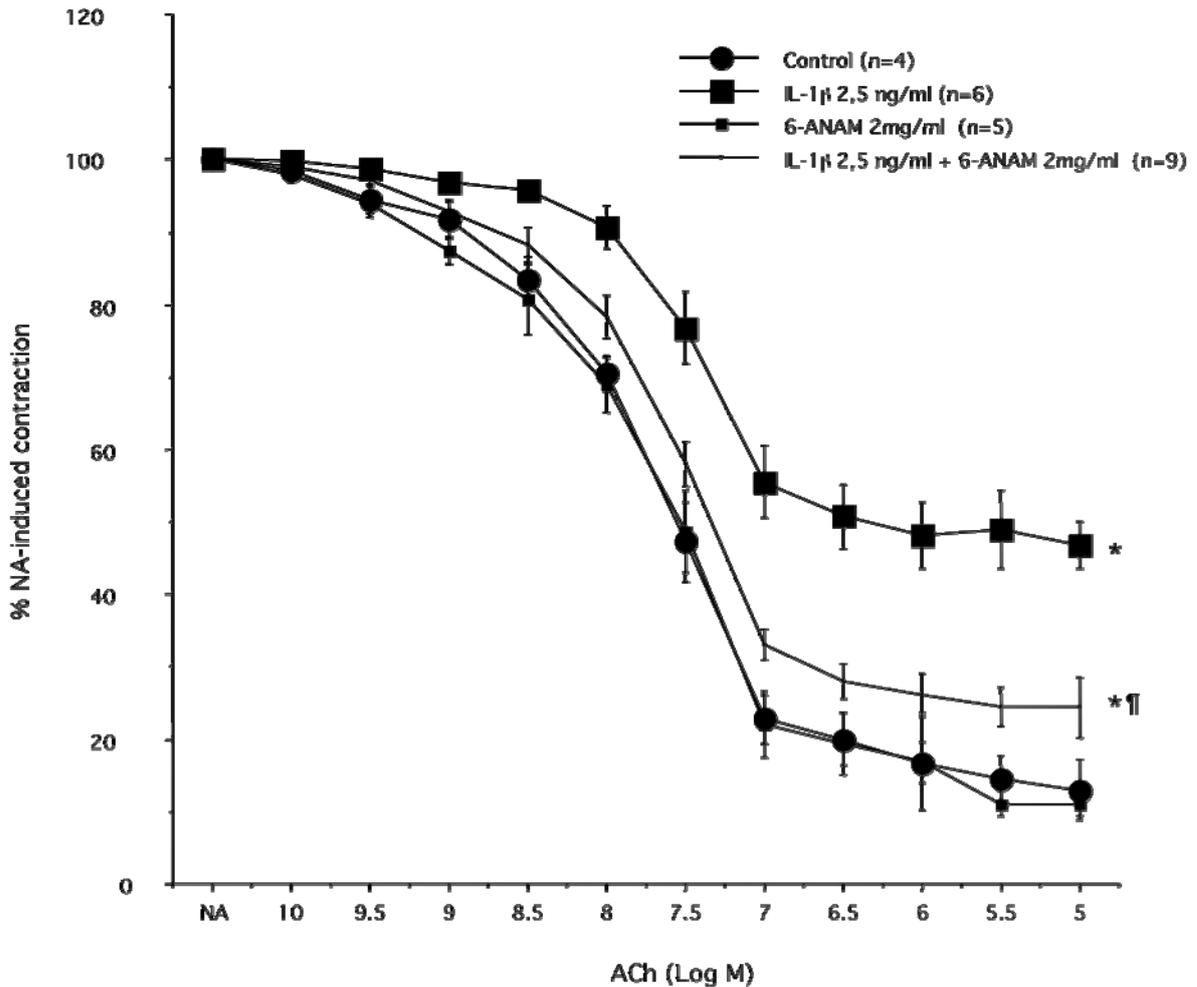


Figura 26. Efecto de 2 mM de 6-ANAM sobre la disfunción endotelial (menor respuesta vasodilatadora a ACh) originada por 2,5 ng/ml de IL-1 β en microvasos mesentéricos de rata SD en presencia de una concentración de 22 mM de D-glucosa extracelular. Los datos se expresan como la media \pm ES del porcentaje de la contracción previa inducida por noradrenalina (NA, 1 μ M), equivalente a 9,82 \pm 0,32, 9,61 \pm 1,20, 11,57 \pm 2,01 y 10,13 \pm 1,54 mNewtons, respectivamente (diferencias estadísticamente no significativas). (n) es el número de segmentos vasculares utilizados en cada curva, obtenidos de 5 animales. *p<0,05 frente al grupo control, ¶ p<0,05 frente a IL-1 β .

2. Actividad de la enzima NADPH oxidasa.

2.1 Actividad NADPH oxidasa en cultivos celulares.

La actividad de la NADPH-oxidasa se determinó en los cultivos confluentes de HUVEC sometidas a distintos tratamientos, a través del método de quimioluminiscencia. Como se puede observar en la Figura 27 el tratamiento durante 30 minutos con 2,5 ng/ml de IL-1 β aumentó la actividad NADPH-oxidasa de manera significativa. Esta actividad se

potenció en presencia de altas concentraciones de D-glucosa (22mM) (Fig. 27). Por otra parte, el tratamiento con 150 μ g/ml de anakinra (AK), 30 μ M de apocinina ó 2 mM de 6-ANAM disminuyó la activación de la enzima inducida por la citoquina, tanto en un medio conteniendo 5,5 como 22 mM D-glucosa.

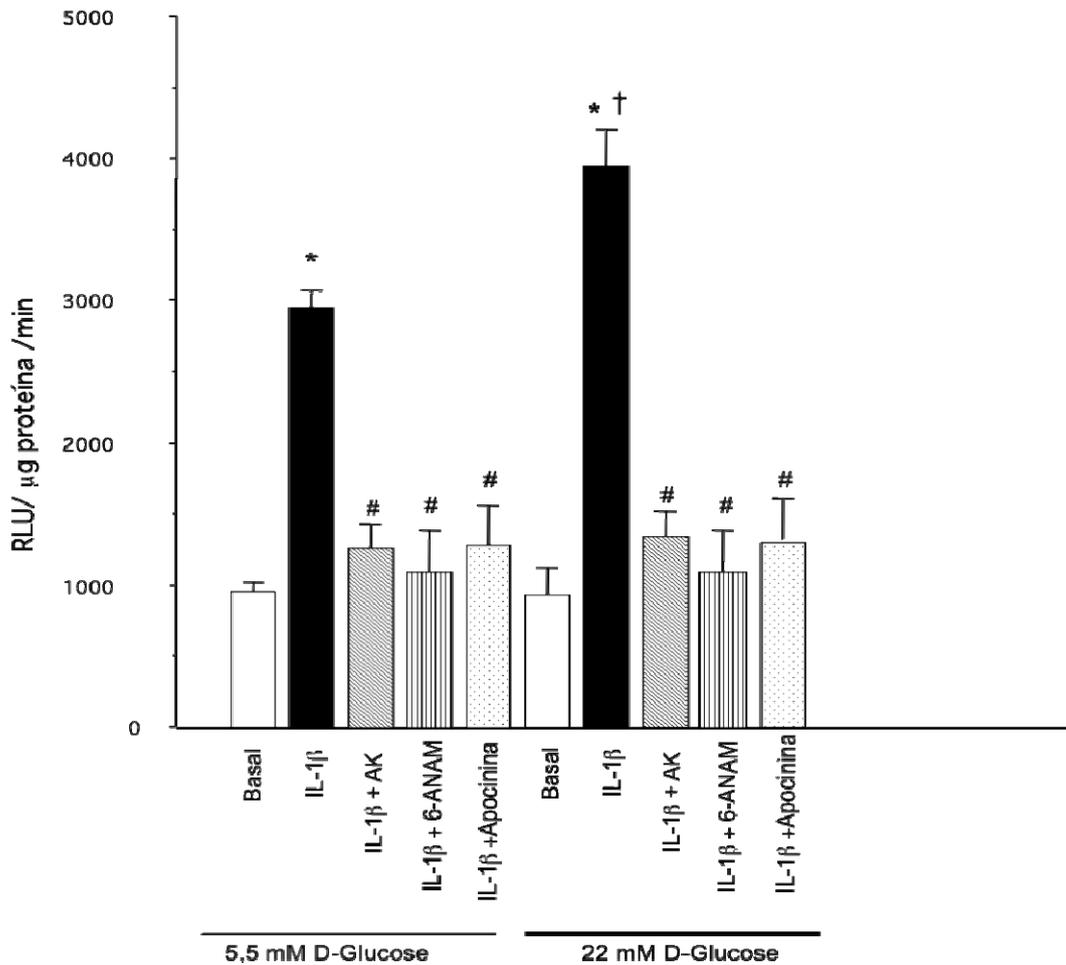


Figura 27. Activación de la enzima NADPH-oxidasa en células endoteliales humanas de vena de cordón umbilical (HUVEC) estimuladas durante 30 min con IL-1 β (2,5ng/ml), anakinra (AK) (150 μ g/ml), apocinina (30 μ M) y/ó 6-ANAM (2 mM) en un medio con de 5,5 ó 22 mM D-glucosa. Los datos se expresan como la media \pm ES de 5 experimentos realizados por triplicado. * $p < 0,05$ frente al grupo control, # $p < 0,05$ frente a IL-1 β , † frente a IL-1 β en 5,5 mM D-Glucosa

En ausencia del estímulo inflamatorio con IL-1 β , la incubación con 150 μ g/ml de anakinra (AK), 30 μ M de apocinina ó 2 mM de 6-ANAM, no alteró la actividad de la NADPH-oxidasa en HUVEC (Fig. 28).

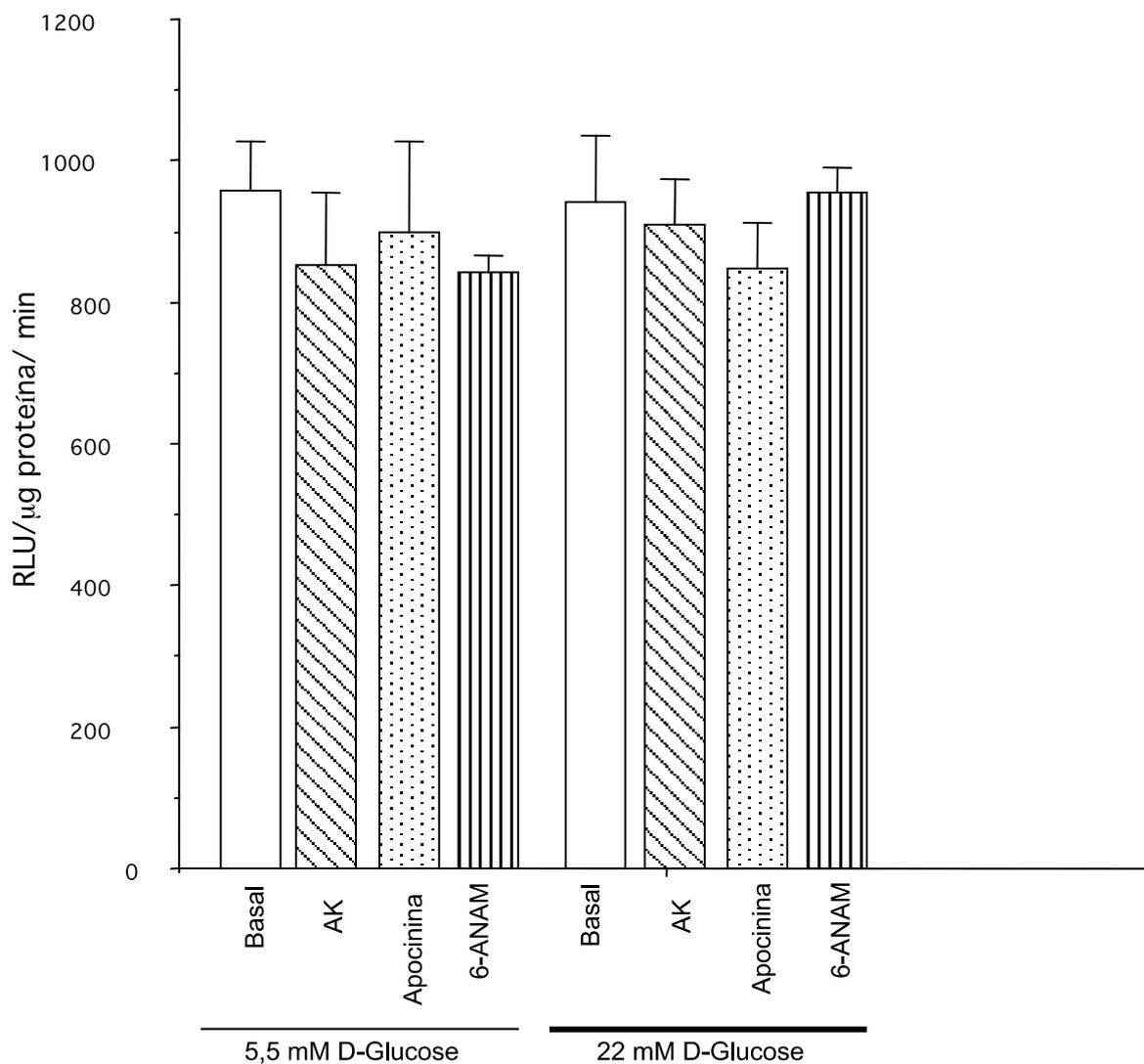


Figura 28. Activación de la enzima NADPH-oxidasa en células endoteliales humanas de vena de cordón umbilical (HUVEC), en ausencia de IL-1 β e incubadas durante 30 min con anakinra (AK) (150 μ g/ml), apocinina (30 μ M) y/ó 6-ANAM (2 mM) en un medio con de 5,5 ó 22 mM D-glucosa. Los datos se expresan como la media \pm ES de 5 experimentos realizados por triplicado.

2.2 Actividad NADPH oxidasa en microvasos mesentéricos aislados de rata SD no diabética (Grupo 1).

De igual forma, la actividad de la NADPH-oxidasa se determinó en microvasos mesentéricos de rata SD no diabética sometidos a distintos tratamientos. Como se puede observar en la Figura 29, el tratamiento durante 30 minutos con 2,5 ng/ml de IL-1 β aumentó la actividad NADPH-oxidasa de manera significativa. Esta actividad se potenció

en presencia de altas concentraciones de D-glucosa (22mM). Asimismo, el tratamiento con 100 μ g/ml de anakinra (AK), 10 μ M de apocinina ó 2 mM de 6-ANAM disminuyó la activación de la enzima inducida por 2,5 ng/ml de IL-1 β , tanto en un medio con 5,5 o con 22 mM D-glucosa.

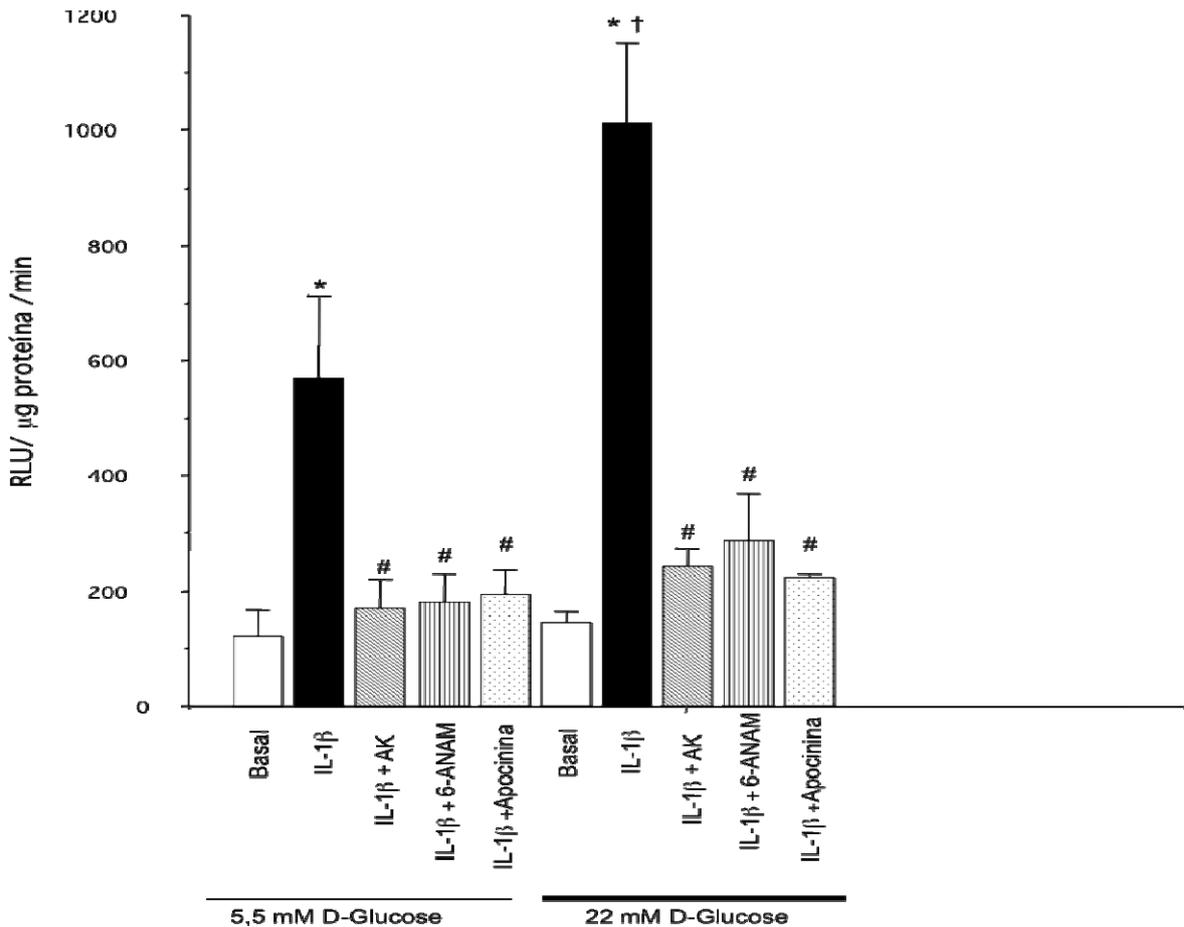


Figura 29. Activación de la enzima NADPH-oxidasa en preparaciones microvasculares de rata SD estimuladas durante 30 min con IL-1 β (2,5ng/ml), sola o en presencia de anakinra (AK) (100 μ g/ml), apocinina (10 μ M) y/ó 6-ANAM (2 mM) en un medio con 5,5 ó 22 mM D-glucosa. Los datos se expresan como la media \pm ES de 6 experimentos independientes cada uno, con segmentos obtenidos de 8 animales. * $p < 0,05$ frente al grupo control, # $p < 0,05$ frente a IL-1 β , † frente a IL-1 β en 5,5 mM D-Glucosa

En ausencia del estímulo inflamatorio con IL-1 β , la incubación con 150 μ g/ml de anakinra (AK), 30 μ M de apocinina ó 2 mM de 6-ANAM, no alteró la actividad de la NADPH-oxidasa en los microvasos mesentéricos de rata no diabética (Fig. 30).

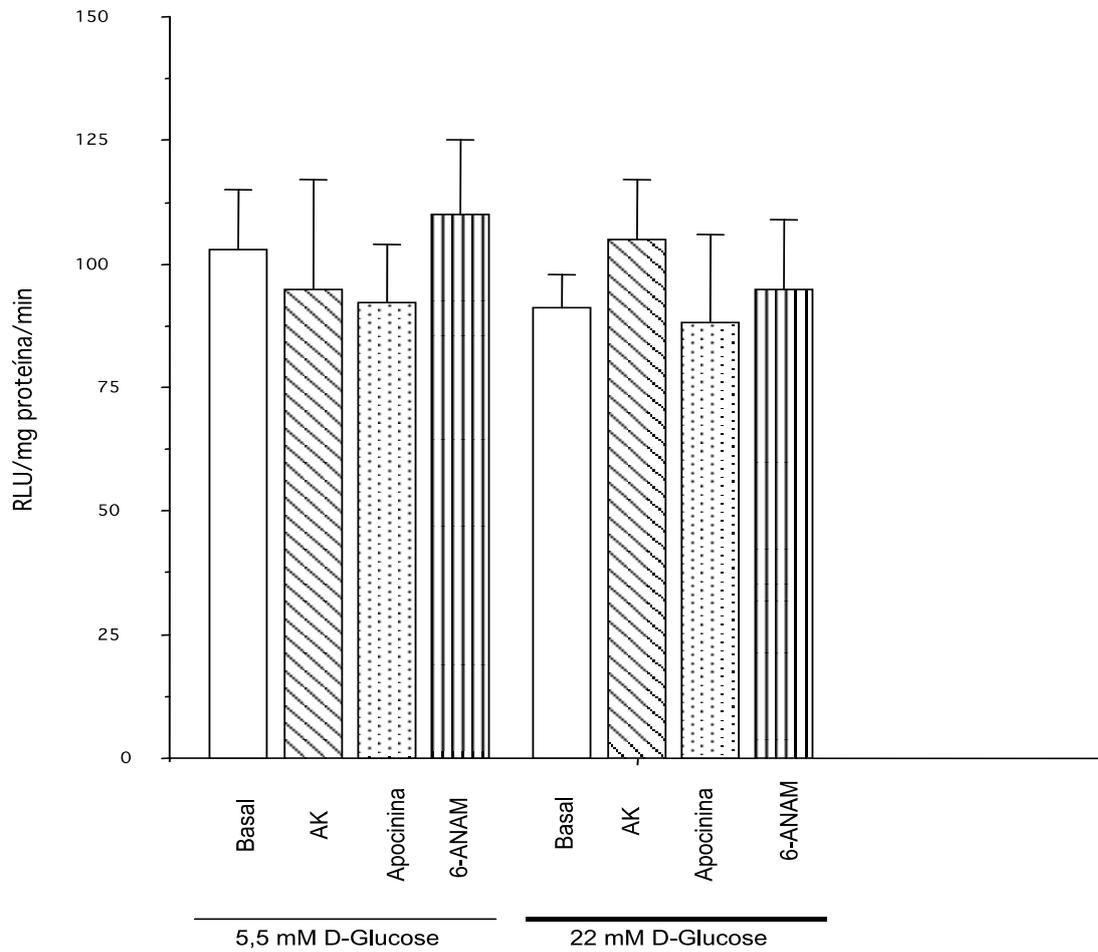


Figura 30. Activación de la enzima NADPH-oxidasa en preparaciones microvasculares de rata SD en ausencia de IL-1 β e incubadas durante 30 min anakinra (AK) (100 μ g/ml), apocinina (10 μ M l) y/ó 6-ANAM (2 mM) en un medio con 5,5 ó 22 mM D-glucosa. Los datos se expresan como la media \pm ES de 6 experimentos independientes cada uno, con segmentos obtenidos de 8 animales. * p<0,05 frente al grupo control, # p<0,05 frente a IL-1 β , † frente a IL-1 β en 5,5 mM D-Glucosa

3. Reactividad vascular en microvasos mesentéricos de rata con DM inducida con STZ (Grupo 2).

3.1 Disfunción endotelial en ratas SD con DM inducida por STZ.

Inicialmente, se analizó la relajación inducida por ACh en microvasos mesentéricos procedentes de ratas con DM inducida por STZ (Grupo 2) de 1, 2 ó 3 semanas de evolución, estudiada en un medio con concentraciones normales de glucosa (5,5 mM). Durante la primera semana de evolución de la diabetes, no se observaron alteraciones en la relajación inducida por ACh. No obstante, los animales con dos semanas de diabetes presentaron una menor vasodilatación inducida por ACh, al igual que aquellos con una enfermedad de tres semanas de evolución (Fig. 31)

La menor relajación a ACh se debía al deterioro de la función endotelial asociada a la DM, ya que en estos vasos la relajación inducida por NPS (un vasodilatador independiente de endotelio), no se afectó (datos no mostrado), de acuerdo con lo previamente descrito en este modelo experimental (Rodríguez-Mañaz, 2003).

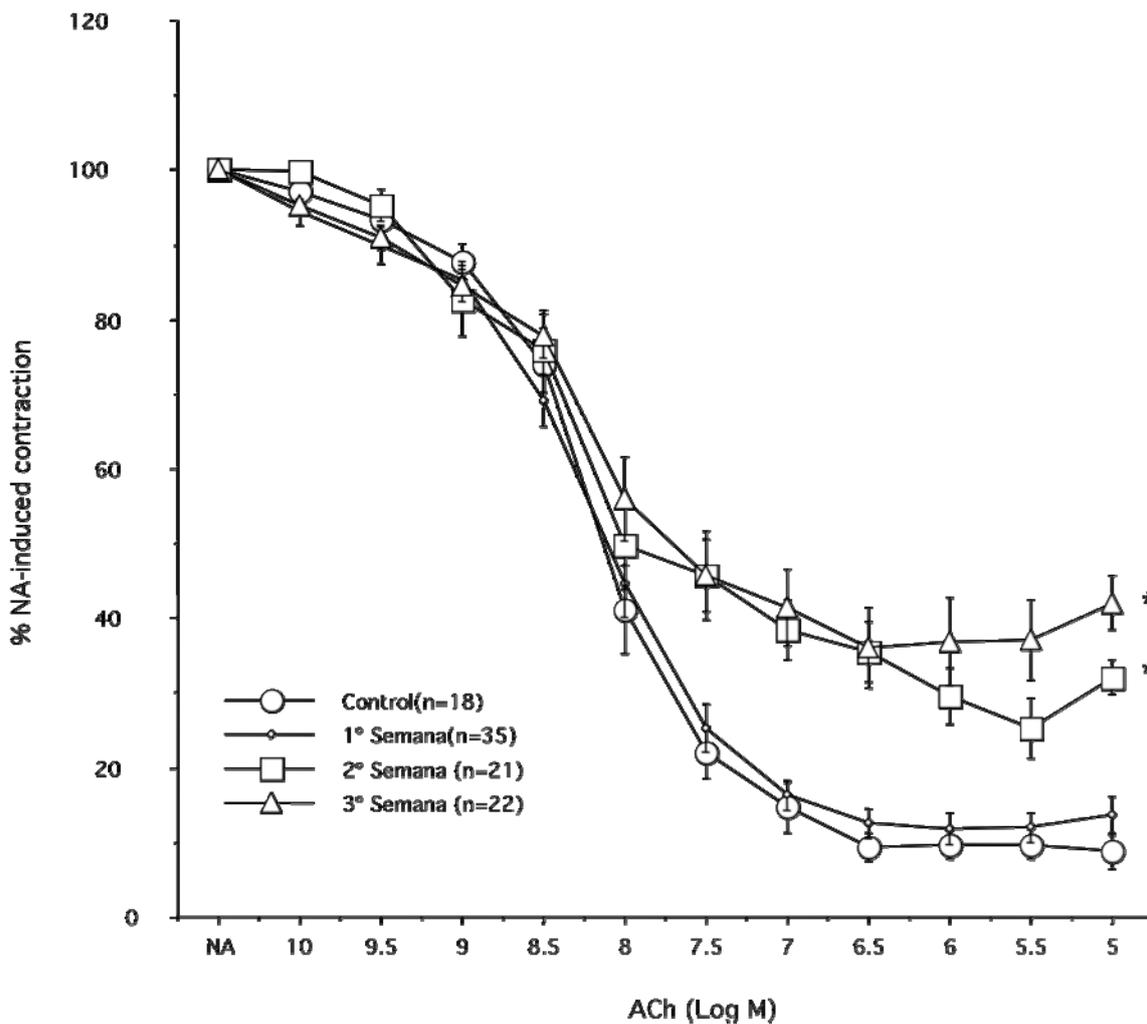


Figura 31. Efecto de la evolución de la primera, segunda y tercera semana de diabetes sobre las respuestas vasodilatadoras a acetilcolina (ACh) en microvasos mesentéricos de rata en 5,5 mM extracelular de D-glucosa. Los datos se expresan como la media \pm ES del porcentaje de la contracción previa inducida por noradrenalina (NA, 1 μ M), equivalente a $7,83 \pm 1,22$, $6,13 \pm 0,89$, $7,44 \pm 2,21$ y $6,09 \pm 1,73$ mNewtons, respectivamente (diferencias estadísticamente no significativas). (n) es el número de segmentos vasculares utilizados en cada curva, obtenidos de 6 animales. * $p < 0,05$ frente al grupo control.

Quando las respuestas vasodilatadoras a ACh en microvasos de animales diabéticos se analizaron en un medio con glucosa extracelular alta (22mM), no se observaron cambios adicionales sobre los obtenidos en un medio con glucosa normal (5,5 mM). (Fig 32).

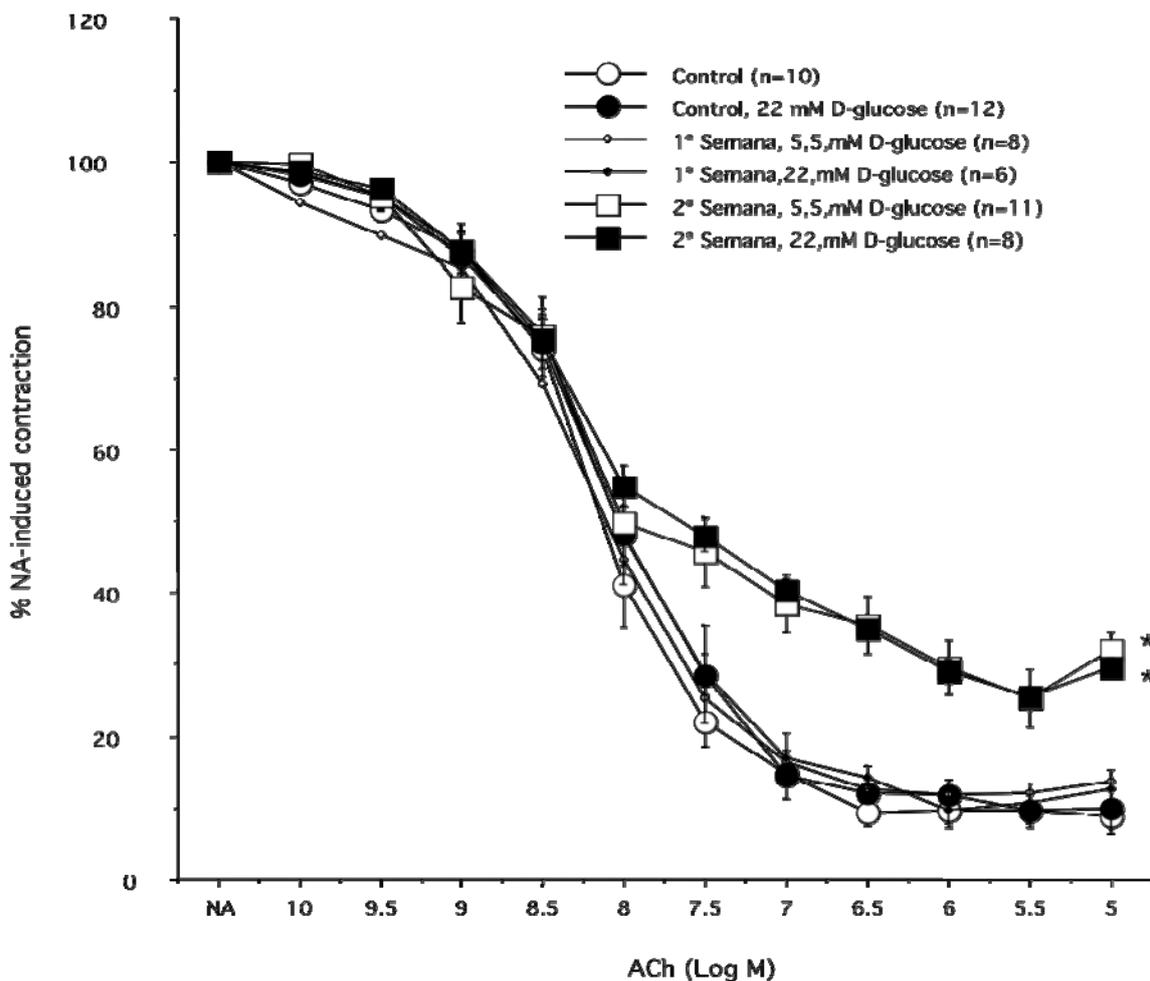


Figura 32. Efecto del aumento de la D-glucosa extracelular (5,5 ó 22mM) en la evolución de la primera, segunda y tercera semana de diabetes sobre las respuestas vasodilatadoras a acetilcolina (ACh) en microvasos mesentéricos de rata. Los datos se expresan como la media \pm ES del porcentaje de la contracción previa inducida por noradrenalina (NA, 1 μ M), equivalente a 8,69 \pm 0,82, 8,27 \pm 1,59, 7,83 \pm 1,12, 8,84 \pm 1,08, 6,13 \pm 0,89 y 6,09 \pm 1,73 mNewtons, respectivamente (diferencias estadísticamente no significativas). (n) es el número de segmentos vasculares utilizados en cada curva, obtenidos de 5 animales * p<0,05 frente al grupo control.

3.2 Interferencia farmacológica de la disfunción endotelial en ratas SD diabéticas.

A continuación, se estudió el papel que juega el estrés oxidativo en la disfunción endotelial observada en nuestro modelo animal experimental de DM. Los microvasos se incubaron previamente durante 30 minutos con 100 μ M tempol, para a continuación realizar la curva concentración dependiente a ACh. El tempol revirtió

parcialmente la disfunción endotelial observada en los microvasos mesentéricos de los animales diabéticos. (Fig. 33)

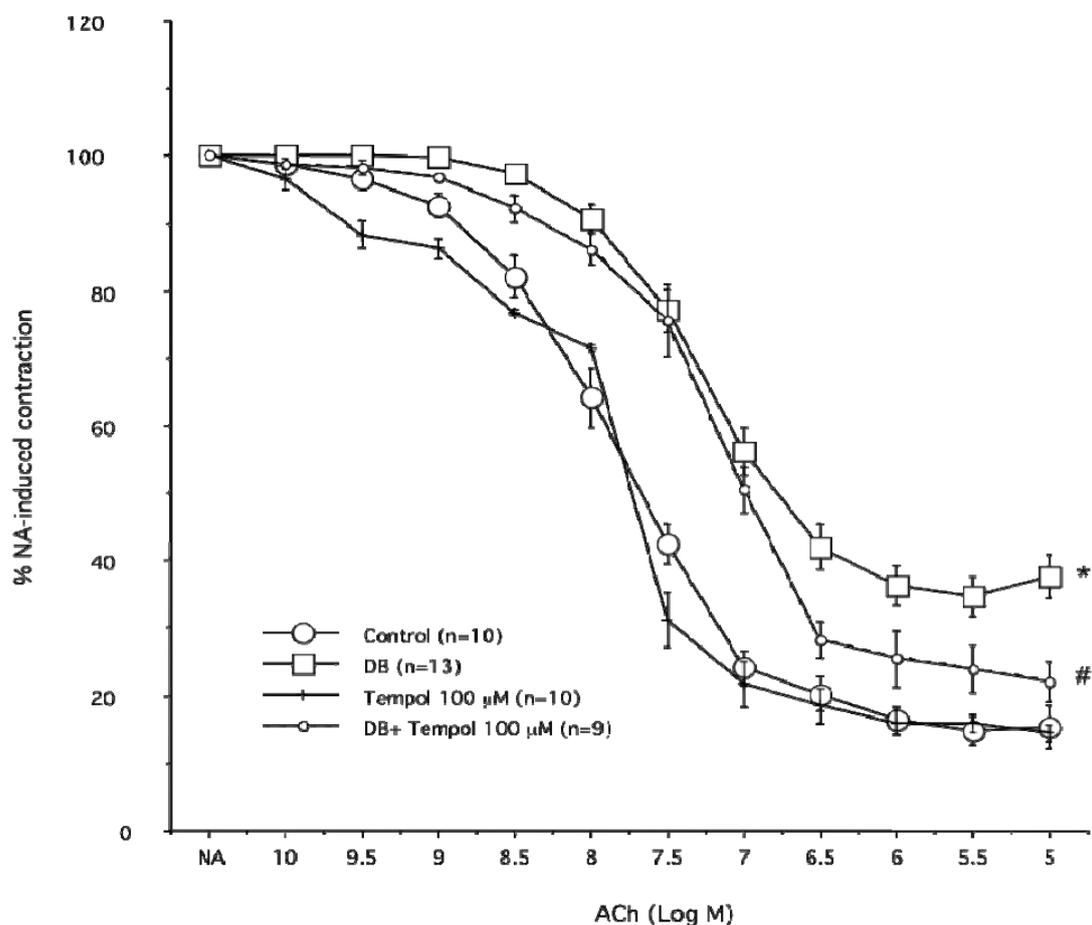


Figura 33. Efecto de 100 µM tempol sobre las respuestas vasodilatadoras a acetilcolina (ACh) en microvasos mesentéricos de rata diabética de dos semanas de evolución, en un medio conteniendo 5,5 mM D-glucosa. Los datos se expresan como la media ± ES del porcentaje de la contracción previa inducida por noradrenalina (NA, 1µM), equivalente a 10,3 ± 0,82, 10,07 ± 0,79, 10,47 ± 1,47 y 10,48 ± 1,15 mNewtons, respectivamente (diferencias estadísticamente no significativas). (n) es el número de segmentos vasculares utilizados en cada curva, obtenidos de 6 animales * p<0,05 frente al grupo control # p<0,05 frente a diabéticas (DB).

Además, se investigó el papel de la enzima NADPH oxidasa en la disfunción endotelial diabética, mediante la incubación previa de los microvasos durante 30 minutos con el inhibidor de la enzima apocinina (10 µM). En la Figura 34 se observa que la apocinina revirtió parcialmente la disfunción endotelial observada en los vasos de animales diabéticos.

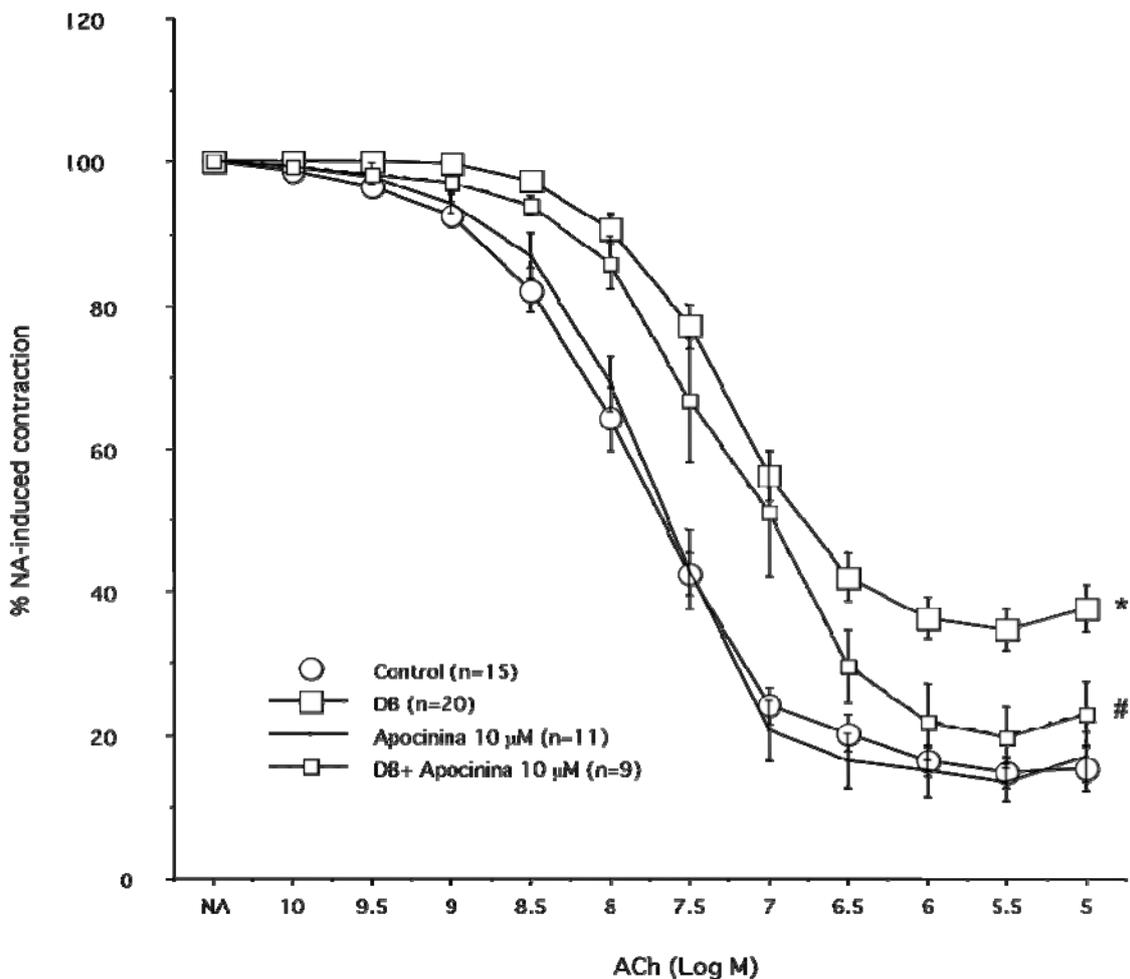


Figura 34. Efecto de 10 μ M apocinina sobre las respuestas vasodilatadoras a acetilcolina (ACh) en microvasos mesentéricos de rata diabética de dos semanas de evolución. Los datos se expresan como la media \pm ES del porcentaje de la contracción previa inducida por noradrenalina (NA, 1 μ M), equivalente a $10,3 \pm 1,22$, $10,07 \pm 0,89$, $10,53 \pm 1,33$ y $10,37 \pm 1,11$ mNewtons, respectivamente (diferencias estadísticamente no significativas). (n) es el número de segmentos vasculares utilizados en cada curva, obtenidos de 7 animales. * $p < 0,05$ frente al grupo control # $p < 0,05$ frente a diabéticas (DB).

En la siguiente tanda de experimentos, se estudió el papel de la enzima G6PD en la disfunción endotelial diabética, mediante la incubación durante 30 min. de los vasos con el inhibidor de la enzima 6-ANAM, (2 mM). En la Figura 35 se observa que 6-ANAM también revirtió parcialmente la disfunción endotelial observada en los microvasos mesentéricos de los animales diabéticos.

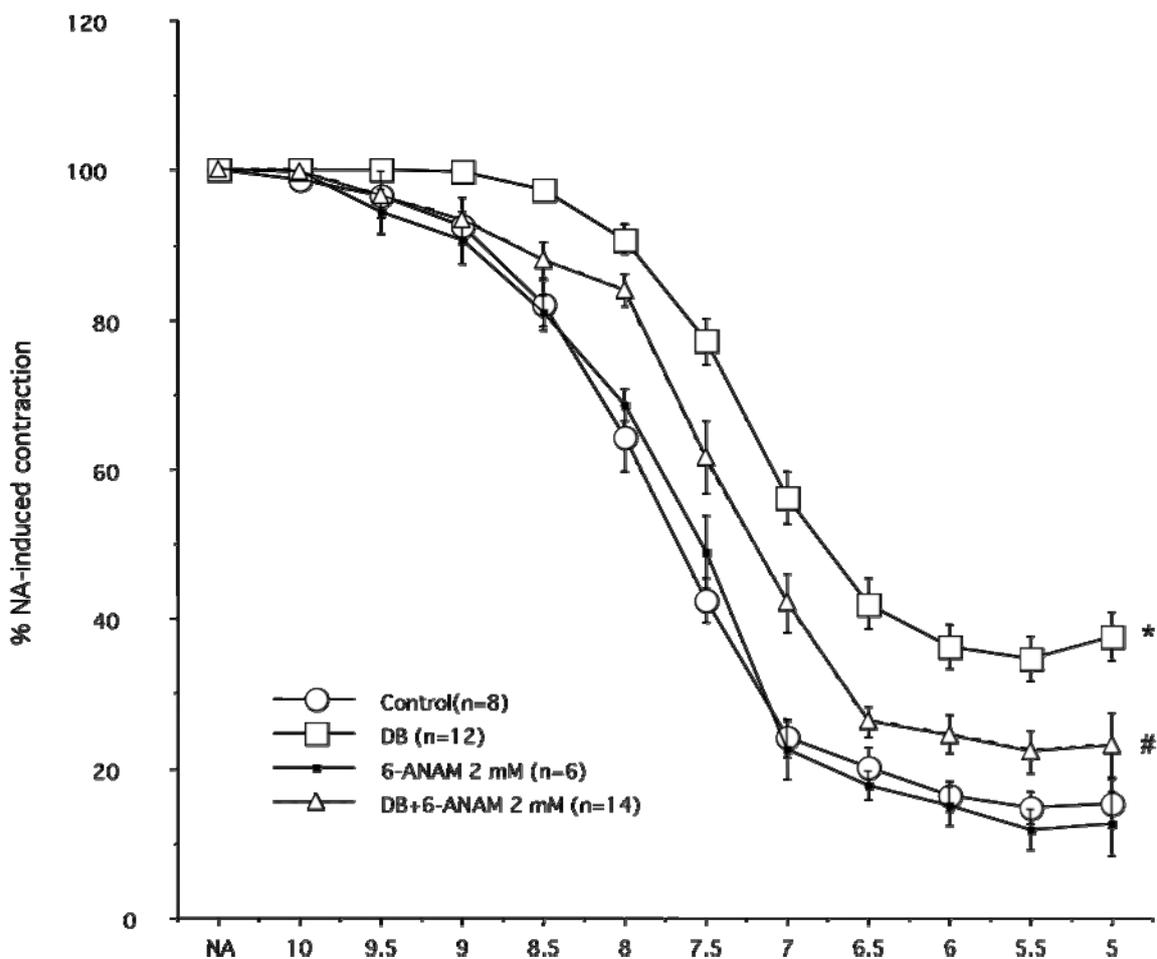


Figura 35. Efecto de 2 μM 6-ANAM sobre las respuestas vasodilatadoras a acetilcolina (ACh) en microvasos mesentéricos de rata diabética de dos semanas de evolución. Los datos se expresan como la media \pm ES del porcentaje de la contracción previa inducida por noradrenalina (NA, 1 μM), equivalente a $10,3 \pm 1,22$, $10,07 \pm 0,89$, $7,78 \pm 3,01$ y $10,71 \pm 0,91$ mNewtons, respectivamente (diferencias estadísticamente no significativas). (n) es el número de segmentos vasculares utilizados en cada curva, obtenido de 4 animales. * $p < 0,05$ frente al grupo control # $p < 0,05$ frente a diabéticas (DB).

Por último, se estudió el posible papel de enzimas pro-inflamatorias, como COX e iNOS, en la disfunción endotelial diabética. En la Figura 36 se observa que la incubación previa con indometacina ó 1400W, bloqueantes respectivos de COX e iNOS, no modificó la disfunción endotelial observada en los animales diabéticos.

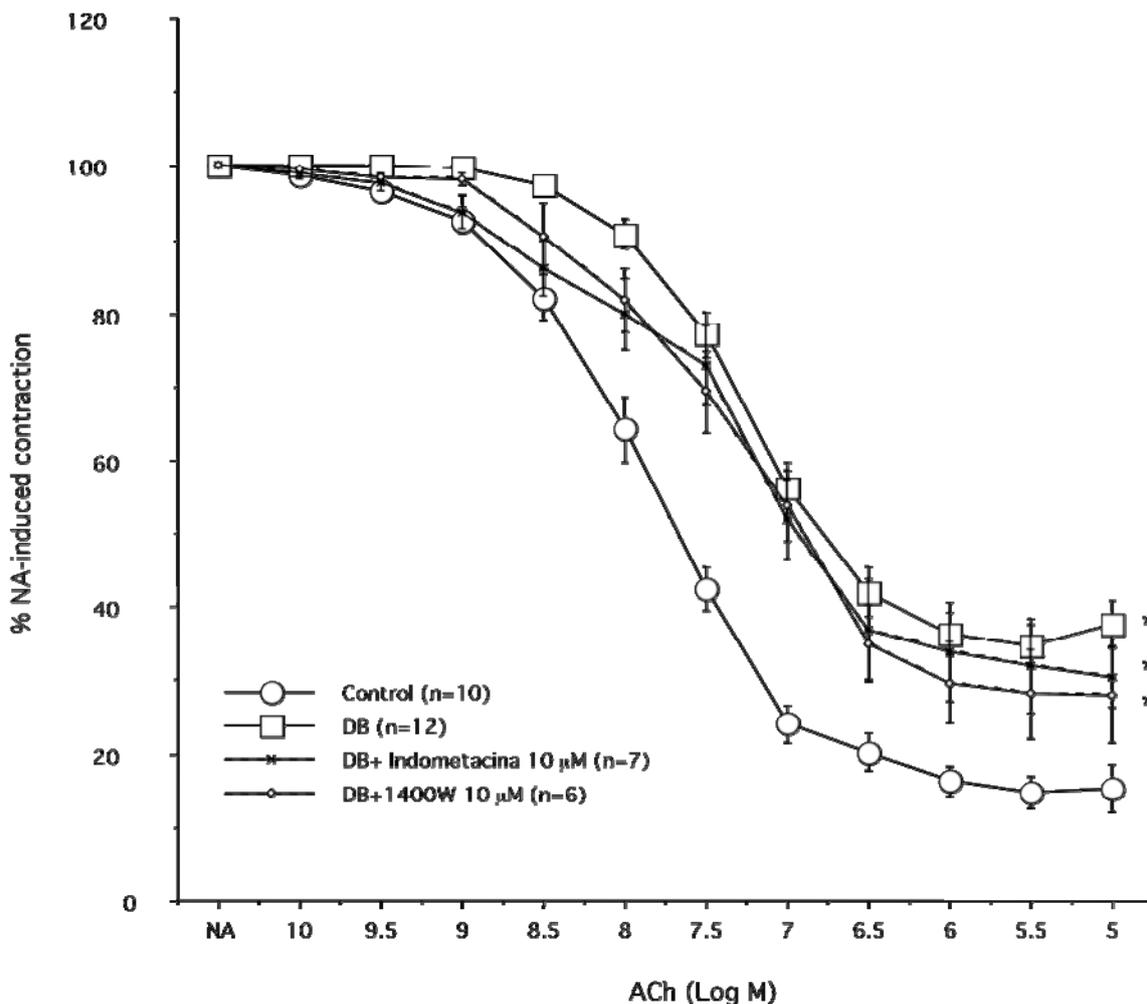


Figura 36. Efecto de 10 μ M indometacina y 10 μ M 1400W sobre las respuestas vasodilatadoras a acetilcolina (ACh) en microvasos mesentéricos de rata diabética de dos semanas de evolución. Los datos se expresan como la media \pm ES del porcentaje de la contracción previa inducida por noradrenalina (NA, 1 μ M), equivalente a $10,3 \pm 1,22$, $10,07 \pm 0,89$, $9,73 \pm 1,65$, y $11,53 \pm 1,05$ mNewtons, respectivamente (diferencias estadísticamente no significativas). (n) es el número de segmentos vasculares utilizados en cada curva, obtenido de 5 animales. * $p < 0,05$ frente al grupo control.

3.3 Influencia del bloqueo de los receptores de IL-1 con Anakinra sobre la disfunción endotelial diabética.

Una serie de ratas SD controles (Grupo 3) y con diabetes inducida con STZ de 2 semanas de evolución (Grupo 4), se trataron mediante la administración intraperitoneal de anakinra (100 mg/kg peso/24h) durante los 3 días previos al sacrificio. Otros grupos análogos (Grupo 5 y 6) recibieron la misma dosis de anakinra los 7 días previos al sacrificio. En ambos casos, se observó una reversión parcial de la disfunción endotelial

diabética, que fue similar, independientemente de la duración del tratamiento (Figs. 37 y 38).

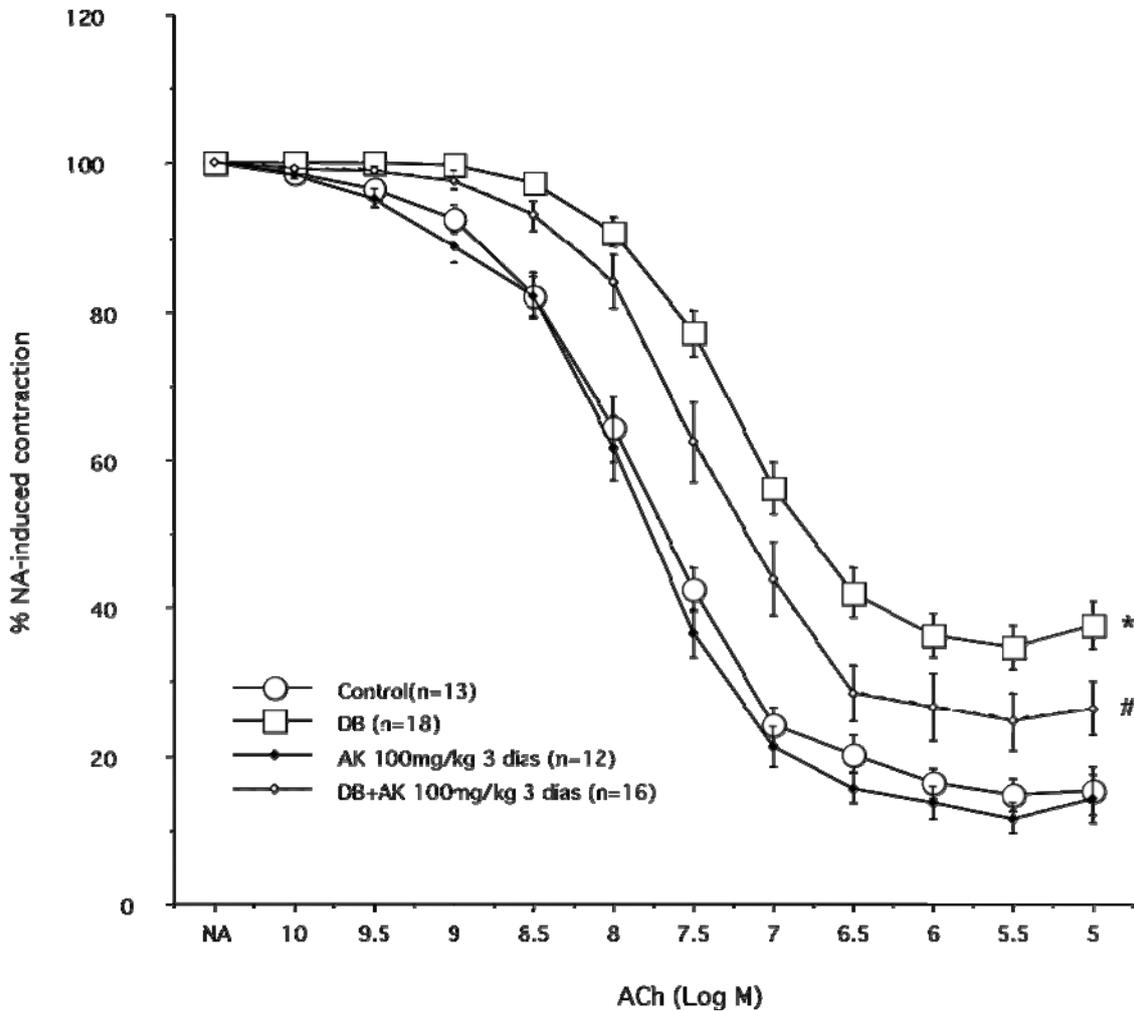


Figura 37 . Efecto de la administración intraperitoneal de 100 mg/kg Anakinra (AK) 3 días antes del sacrificio, sobre las respuestas vasodilatadoras a acetilcolina (ACh) en microvasos mesentéricos. Los datos se expresan como la media \pm ES del porcentaje de la contracción previa inducida por noradrenalina (NA, 1 μ M), equivalente a 10,07 \pm 0,06, 9,78 \pm 1,23 y 9,75 \pm 0,91 mNewtons, (diferencias estadísticamente no significativas). (n) es el número de segmentos vasculares utilizados en cada curva, obtenido de 10 animales. * p<0,05 frente al grupo control # p<0,05 frente a diabéticas (DB).

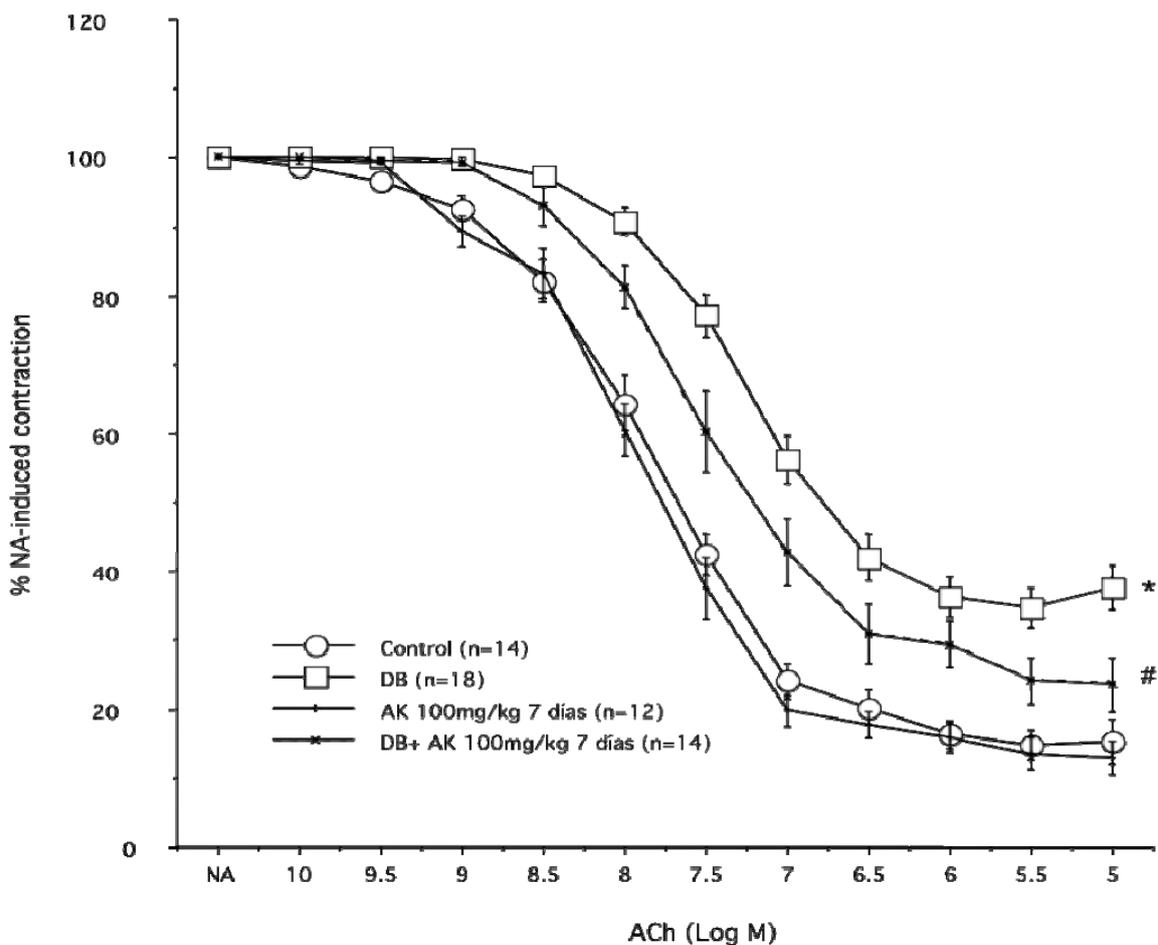


Figura 38 . Efecto de la administración intraperitoneal de 100 mg/kg Anakinra (AK) 7 días antes del sacrificio, sobre las respuestas vasodilatadoras a acetilcolina (ACh) en microvasos mesentéricos. Los datos se expresan como la media \pm ES del porcentaje de la contracción previa inducida por noradrenalina (NA, 1 μ M), equivalente a $10,07 \pm 0,06$, $9,78 \pm 1,23$, $7,53 \pm 1,22$ y $10,10 \pm 1,76$ mNewtons, (diferencias estadísticamente no significativas). (n) es el número de segmentos vasculares utilizados en cada curva, obtenido de 10 animales. * $p < 0,05$ frente al grupo control # $p < 0,05$ frente a diabéticas (DB).

Finalmente, otros grupos de ratas controles y diabéticas (Grupos 7 y 8) recibieron una dosis de 160/mg/kg peso/24hrs de anakinra, los tres días previos al sacrificio. Con este tratamiento, se observó un reversión completa de la disfunción endotelial diabética, ya que la respuesta a ACh en los microvasos de los animales diabéticos fue similar a la de los controles (Fig. 39).

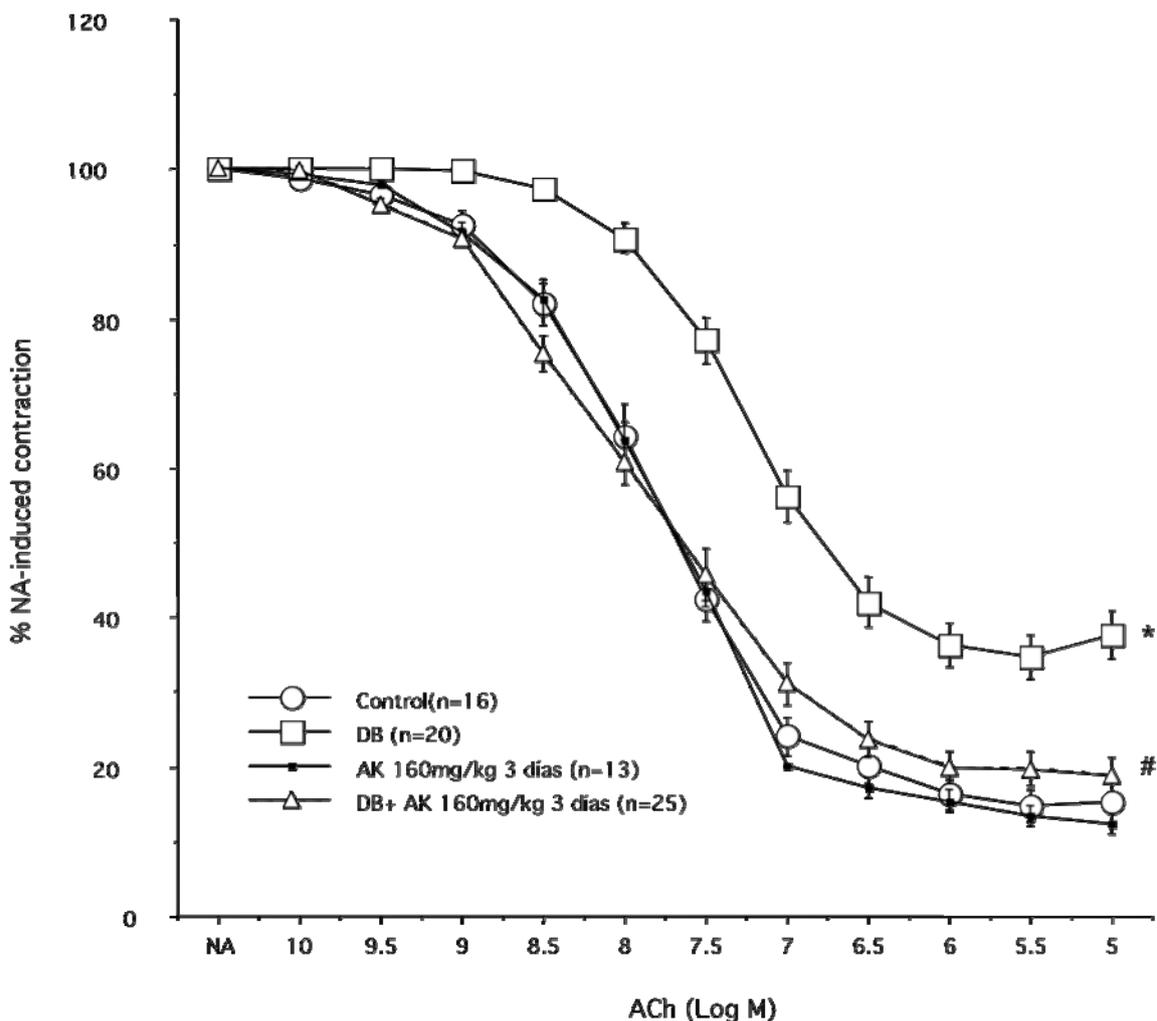


Figura 39. Efecto de la administración intraperitoneal de 160 mg/kg Anakinra (AK) 3 días antes del sacrificio, sobre las respuestas vasodilatadoras a acetilcolina (ACh) en microvasos mesentéricos. Los datos se expresan como la media \pm ES del porcentaje de la contracción previa inducida por noradrenalina (NA, 1 μ M), equivalente a $10,07 \pm 0,06$, $9,78 \pm 1,23$, $10,64 \pm 2,43$ y $11,54 \pm 2,76$ mNewtons, (diferencias estadísticamente no significativas). (n) es el número de segmentos vasculares utilizados en cada curva, obtenidos en 10 animales. * $p < 0,05$ frente al grupo control # $p < 0,05$ frente a diabéticas (DB).

En algunos microvasos mesentéricos de ratas diabéticas tratadas con AK 160mg/kg/24hrs (Grupo 8), se analizó también el efecto de 100 μ M tempol, 10 μ M apocinina ó 2 mM 6-ANAM. En estas condiciones, al igual que ocurría en animales controles no diabéticos, los distintos fármacos empleados no tuvieron efecto significativo sobre la relajación inducida por ACh (Fig. 40).

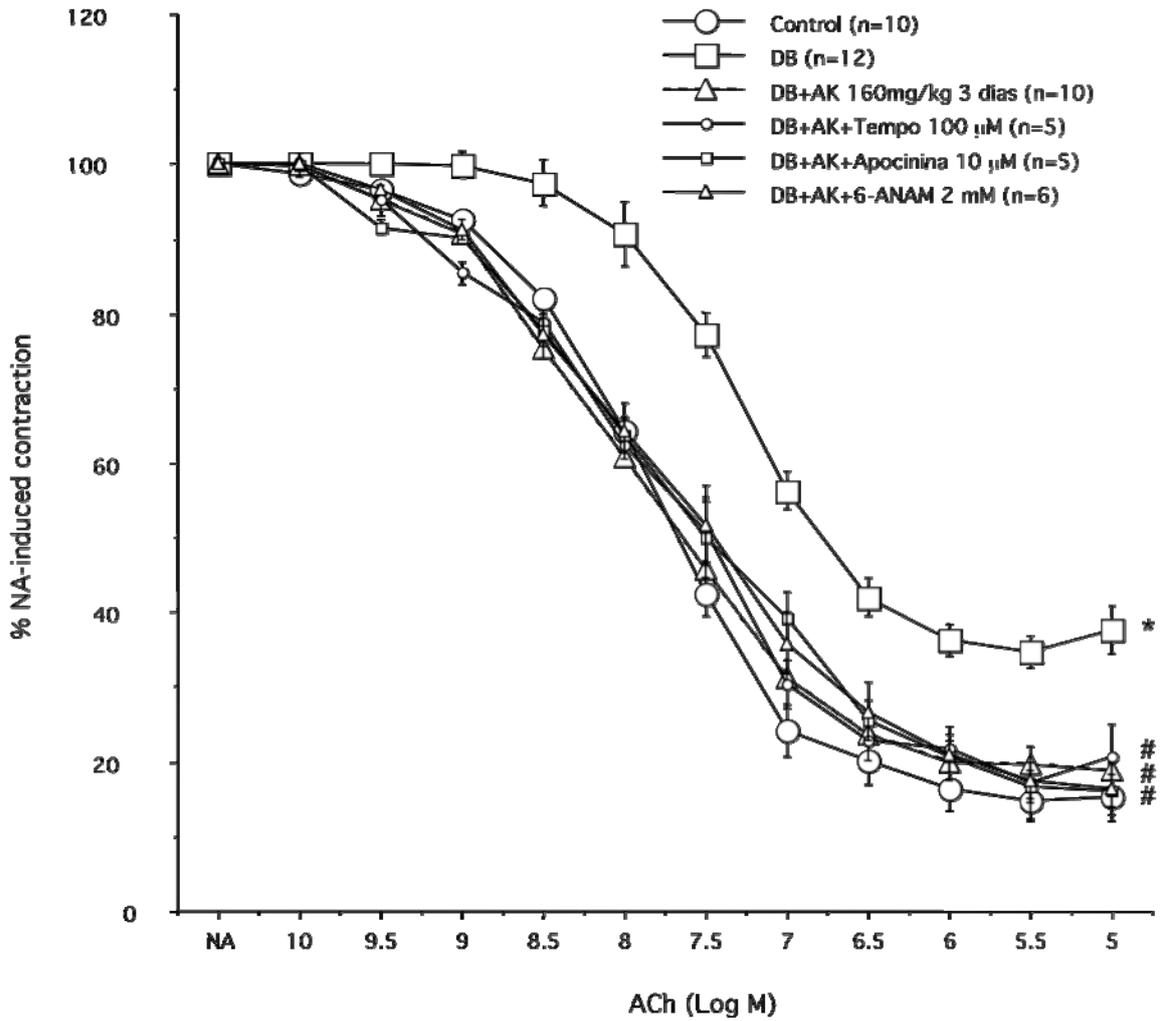


Figura 40. Efecto de 100 µM tempol, 10 µM apocinina y 2 mM 6-ANAM sobre las respuestas vasodilatadoras a acetilcolina (ACh) en microvasos mesentéricos de rata diabética tratada durante 3 días previos al sacrificio con AK 160 mg/kg/24 hrs. Los datos se expresan como la media \pm ES del porcentaje de la contracción previa inducida por noradrenalina (NA, 1µM), equivalente a $10,07 \pm 0,66$, $9,78 \pm 1,23$, $8,93 \pm 0,93$, $11,58 \pm 0,76$, $9,79 \pm 1,11$ y $10,30 \pm 0,68$ mNewtons, (diferencias estadísticamente no significativas). (n) es el número de segmentos vasculares utilizados en cada curva, obtenido de 5 animales * $p < 0,05$ frente al grupo control # $p < 0,05$ frente a diabéticas (DB).

4. Actividad de NADPH oxidasa en microvasos mesentéricos de animales diabéticos.

La actividad de la enzima NADPH-oxidasa se determinó en microvasos mesentéricos de rata SD diabética de dos semanas de evolución tratadas ó no con 160 mg/kg/24hrs durante 3 días previos al sacrificio (Grupos 7 y 8), así como en sus respectivos controles no diabéticos (Grupo 1). Como se puede observar en la Figura 41, los microvasos de animales diabéticos presentaron un aumento significativo de la activación de la enzima NADPH-oxidasa respecto a los animales controles. En los vasos procedentes del grupo de animales que había recibido el tratamiento con AK (160mg/kg/24hrs) la activación de la NADPH-oxidasa se redujo de forma significativa.

Por otro lado, la incubación durante 30 min con 10 μ M de apocinina (bloqueante de la NADPH oxidasa) ó con 2 mM de 6-ANAM (inhibidor de la vía de las pentosas) originó una importante reducción de la actividad NADPH oxidasa en los microvasos de animales diabéticos (Fig. 41). Es interesante destacar que en animales tratados previamente con anakinra, ni la apocinina ni el 6-ANAM tuvieron un efecto adicional sobre la actividad NADPH oxidasa (Fig. 41). Estos tratamientos tampoco modificaron la actividad NADPH oxidasa en animales controles (Fig. 42).

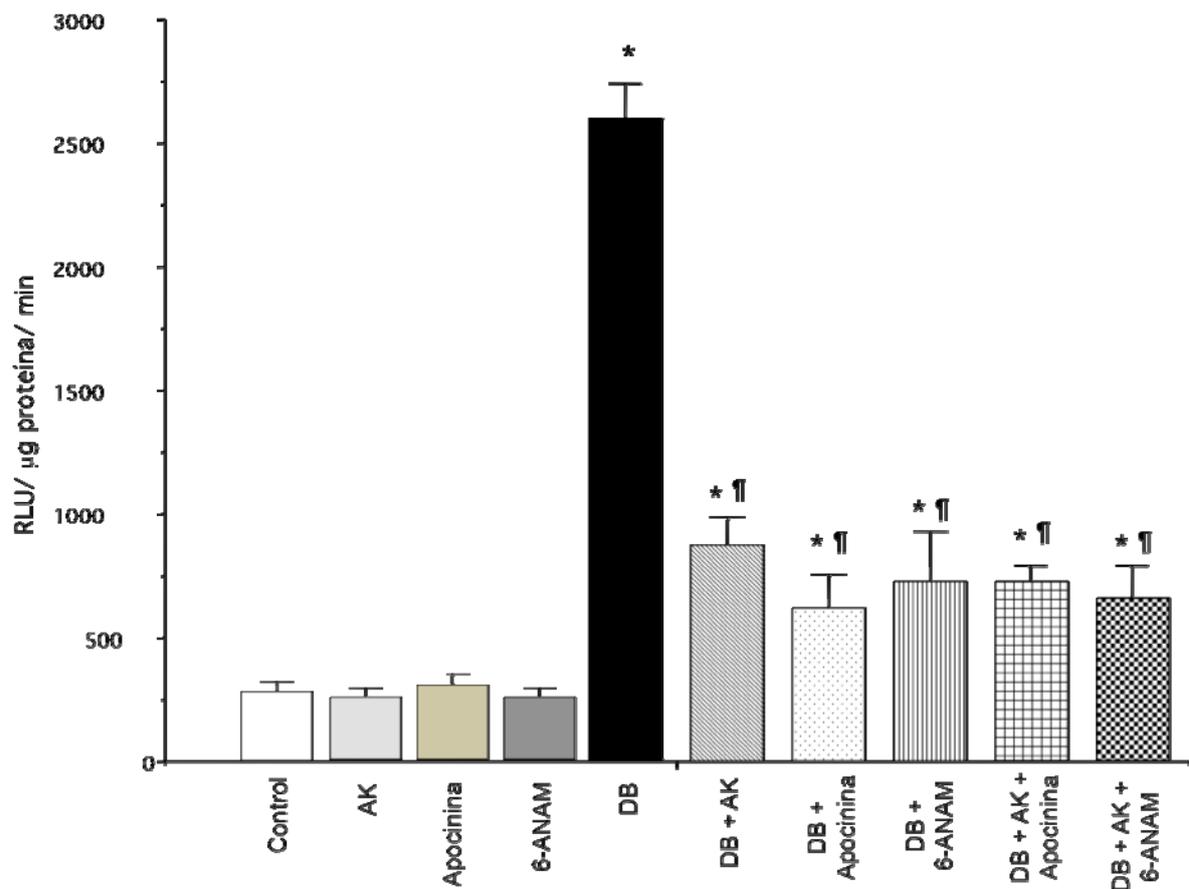


Figura 41. Activación de la enzima NADPH-oxidasa en preparaciones microvasculares de rata control y rata diabética de dos semanas de evolución (DB) tratadas o no durante 3 días previos al sacrificio con anakinra (AK) 160 mg/kg/24hrs. También se muestra el efecto de la incubación durante 30 min. con apocinina (10 µg/ml) ó 6-ANAM (2 mg/ml). Los datos se expresan como la media \pm ES de 6 experimentos independientes cada uno con segmentos obtenidos de 8 animales. * $p < 0,05$ frente al grupo control, ¶ $p < 0,05$ frente a grupo DB.

5. Determinación de citoquinas pro-inflamatorias circulantes en ratas SD diabéticas.

Los niveles séricos de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β y TNF- α , determinados mediante ELISA, en los diferentes grupos de animales estudiados en este trabajo figuran en la Tabla 2. Las ratas con una evolución de dos semanas de DM inducida por estreptozotocina no presentaron variaciones significativas de las concentraciones de citoquinas. Por su parte, la administración de distintas dosis de anakinra tampoco modificó los niveles de IL-1 β y TNF- α en condiciones basales, aunque redujo significativamente la concentración de ambas citoquinas en animales diabéticos.

Grupo	Tratamiento	IL-1 β pg/ml	TNF- α pg/ml
1	Controles	82,11 \pm 1,38	11,52 \pm 2,71
2	Diabéticas (DM) sin tratamiento	83,78 \pm 2,99	11,22 \pm 2,05
3	No diabéticas con 100 mg/kg AK, 3 días	78,49 \pm 2,02	12,82 \pm 3,08
4	No diabéticas con 100 mg/kg AK, 7 días	77,75 \pm 2,81	12,39 \pm 1,30
5	No diabéticas con 160 mg/kg AK, 3 días	90,34 \pm 2,92	10,21 \pm 4,34
6	DM con 100 mg/kg AK, 3 días	57,01 \pm 3,75 * ¶	8,26 \pm 2,13
7	DM con 100 mg/kg AK, 7 días	45,06 \pm 3,09 * ¶	3,48 \pm 0,823 * ¶
8	DM con 160 mg/kg AK, 3 días	42,79 \pm 2,34 * ¶	3,43 \pm 1,27 * ¶

Tabla 2. Concentraciones de IL-1 β y TNF- α en el plasma de los distintos grupos de ratas SD. Los datos se expresan como la media \pm ES de 5 animales. *p<0,05 frente al grupo control, ¶ p<0,05 frente al respectivo grupo DB.

DISCUSIÓN

Disfunción endotelial producida por D-glucosa e IL-1 β

Las enfermedades cardiovasculares aparecen con una mayor incidencia en la población diabética (Beckman *et al.*, 2002), situando la vasculopatía diabética como la principal causa de morbimortalidad entre los pacientes diabéticos (Stratton *et al.*, 2000). La hiperglucemia característica de los pacientes diabéticos es considerada desde hace tiempo como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de las complicaciones vasculares asociadas a la diabetes (DCCT, 2003). Se ha descrito que tanto la hiperglucemia basal como la postprandial son capaces de promover un estado oxidativo e inflamatorio en el sistema vascular, y han sido propuestas como factores de riesgo directos para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Esposito *et al.*, 2002; Ceriello, 2005). Sin embargo, aunque la hiperglucemia es un factor claramente asociado al desarrollo de la enfermedad vascular, no está claro su papel en la patogénesis de las complicaciones vasculares.

La disfunción endotelial es una de las complicaciones vasculares características de la diabetes humana y experimental (Ding H y Triggle CR., 2005). Entre los mecanismos propuestos para explicar esta disfunción endotelial ocupa un lugar destacado la hipótesis de que las concentraciones elevadas de D-glucosa, por sí mismas, son capaces de alterar las respuestas vasodilatadoras-dependientes de endotelio. Así, los estudios iniciales *in vitro* en aorta de conejo y rata describieron una disminución de las relajaciones mediadas por el endotelio cuando los vasos se incubaban en concentraciones muy elevadas de D-glucosa (22 ó 44 mM) (Tsfamariam *et al.*, 1991; Tsfamariam y Cohen, 1992; Pieper *et al.*, 1995), a través de mecanismos que incluían la activación de la PKC y la vía de los polioles, así como la producción de radicales libres (Tsfamariam *et al.*, 1991; Tsfamariam *et al.*, 1992; Tsfamariam y Cohen, 1992). En aorta de cobayo, incubada en presencia de 50 mM de D-glucosa, también se ha descrito una menor relajación endotelio-dependiente mediada por radicales libres y por activación de la COX (Dorigo *et*

al, 1997). Experimentos similares realizados en microvasos mesentéricos de rata indican que la incubación de los mismos con 20 ó 44 mM de D-glucosa produce disfunción endotelial, por mecanismos que incluyen la producción de radicales libres, la vía de los polioles y la activación de la COX (Taylor y Poston, 1994). Un estudio reciente, también en microvasos mesentéricos de rata incubados con 30 ó 40 mM de D-glucosa, sugiere que la disfunción endotelial está mediada por un aumento intracelular de metilglioxal, un producto de glicosilación avanzada (Browsers *et al*, 2010).

Otros estudios en humanos sanos, realizados con la técnica de pletismografía del antebrazo, también sugieren que el aumento de la glucosa plasmática puede inducir directamente disfunción endotelial (Williams *et al*, 1998), a través de la producción de aniones superóxido o de la activación de la PKC (Beckman *et al*, 2001; Beckman *et al*, 2002). Sin embargo, estos resultados no han sido confirmados en los estudios realizados por otros grupos, en los que no se observan cambios significativos en la función endotelial, analizada mediante pletismografía, en diversos grupos de sujetos sanos (Houben *et al*, 1996; Charkoudian *et al*, 2002; Reed *et al*, 2004). De hecho, dos estudios realizados por el mismo grupo, que estudian la capacidad de una sobrecarga oral de glucosa para inducir disfunción endotelial en sujetos sanos, presentan resultados contrapuestos: en individuos de mediana edad se describe una menor relajación dependiente de endotelio (Ihlemann *et al*, 2003), mientras que en sujetos jóvenes no se observa ninguna modificación significativa (Major-Pedersen *et al*, 2008).

Por otra parte, la capacidad de la D-glucosa para alterar la función endotelial también se ha cuestionado en estudios *in vitro*, al menos con niveles de D-glucosa extracelular no excesivamente incrementados. Así, el aumento de la D-glucosa en el medio extracelular a 20 mM no produce disfunción endotelial significativa en microvasos humanos aislados, mesentéricos o subcutáneos (MacKenzie *et al*, 2008). Los resultados obtenidos en este trabajo en microvasos mesentéricos de rata también apuntan en este sentido, ya que la elevación de la D-glucosa extracelular a niveles importantes (22 mM),

pero no desproporcionados, no modificó la relajación-dependiente de endotelio, que alcanzó una respuesta similar a la que se obtenía en presencia de concentraciones basales. Por tanto, nuestros datos sugieren que la hiperglucemia, por sí misma, no produce disfunción endotelial. Datos previos de nuestro grupo apoyan esta hipótesis, ya en ratas con diabetes tipo 1 inducida por estreptozotocina de una semana de evolución y una hiperglucemia muy elevada (en el rango de 25 mM), no se observa todavía disfunción endotelial ni en la aorta ni en el lecho microvascular mesentérico (Rodríguez-Mañas *et al.*, 2003).

En los últimos años, se ha propuesto que los niveles circulantes de citoquinas pro-inflamatorias, incluida la IL-1 β , se encuentran elevados tanto en modelos animales de diabetes (El-Seweidy *et al.*, 2002) como en pacientes diabéticos (Pickup *et al.*, 2000; Arnalich *et al.*, 2000; Erbagci *et al.*, 2001; Moriwaki *et al.*, 2003). Además, se ha descrito en pacientes diabéticos un incremento agudo en la liberación de citoquinas pro-inflamatorias durante la hiperglucemia postprandial (Esposito *et al.*, 2002; Nappo, 2002), lo que se relaciona con un mayor riesgo cardiovascular (Esposito *et al.*, 2002; Ceriello *et al.*, 2005). Aunque las fuentes de dichas citoquinas circulantes en la diabetes son probablemente múltiples (Alexandraki *et al.*, 2006), el tejido adiposo es uno de los principales fuentes propuestas, tanto por los adipocitos como por los macrófagos infiltrados, lo que le confiere un papel relevante en la diabetes tipo 2 asociada con resistencia a insulina, obesidad y síndrome metabólico (Alexandraki *et al.*, 2006; Hotamisligil, 2006).

Existen datos previos sobre la capacidad de las citoquinas pro-inflamatorias, como que TNF- α , IL-1 β e IL-6, para producir disfunción endotelial (Vila y Salaices, 2005; Sprague y Khalil, 2009). En microvasos mesentéricos de rata, la administración de IL-1 β puede producir una marcada alteración de la vasodilatación endotelial (Briones *et al.*, 2005; Jiménez-Altayó, 2006), o no presentar apenas efectos significativos (Wimalasundera *et al.*, 2003). Posiblemente, este sea un efecto dependiente de la

concentración de IL-1 β utilizada por estos autores. En el presente trabajo experimental, se ensayó un rango de concentraciones de IL-1 β de entre 1 y 10 ng/ml. A la concentración más baja (1 ng/ml), similar a la empleada por Wimalasundera et al. (2003), no se observaron cambios respecto de la relajación endotelio-dependiente obtenida en situación control. Concentraciones superiores (2,5, 5 y 10 ng/ml) produjeron un creciente deterioro de las respuestas vasodilatadoras según la concentración de citoquina utilizada. La máxima concentración empleada (10 ng/ml) indujo una marcada disfunción endotelial, similar a la descrita previamente por otros autores (Briones *et al*, 2005; Jiménez-Altayó *et al*, 2006). La alteración de la función vascular fue específicamente endotelial, ya que ninguna de las concentraciones de IL-1 β utilizadas modificó las respuestas vasodilatadoras independientes del endotelio producidas por NPS.

Un aspecto interesante de nuestra investigación ha sido el tiempo de incubación con IL-1 β necesario para producir disfunción endotelial. Algunos autores utilizan periodos de incubación prolongados (14 h), por lo que la disfunción endotelial observada se explica por un desarrollo completo de la respuesta inflamatoria, incluyendo el aumento en la expresión de enzimas pro-inflamatorias, como iNOS y COX (Briones *et al*, 2005; Jiménez-Altayó *et al*, 2006). En otro trabajo, sin embargo, periodos mucho más cortos de estimulación con una citoquina (30 min) producen una disfunción endotelial significativa, lo que sugiere la participación de mecanismos de señalización mucho más tempranos, que no requieren la síntesis de nuevas proteínas (Wimalasundera *et al*, 2003). Nuestros resultados, obtenidos incubando los microvasos mesentéricos de rata durante un periodo relativamente breve (2 h), indican también este tipo de señalización temprana. Además, para confirmar este punto, se realizaron experimentos incubando los segmentos vasculares con 2,5 ng/ml de IL-1 β durante 30 min, lo que produjo resultados similares a los observados con 2 h de incubación, reforzando aun más el posible papel de los mecanismos tempranos de señalización en el desarrollo de la disfunción endotelial.

Otro hecho relevante de nuestra investigación fue la capacidad de la D-glucosa

extracelular para potenciar las respuestas inducidas por IL-1 β . Como se ha indicado anteriormente, las concentraciones elevadas de D-glucosa en el medio no modificaron las respuestas vasodilatadoras dependientes del endotelio. Tampoco alteraron las respuestas observadas en presencia de concentraciones sub-umbrales de IL-1 β (1 ng/ml) ni las obtenidas en presencia de concentraciones máximas (10 ng/ml). Sin embargo, la disfunción endotelial producida por concentraciones de 2,5 y 5 ng/ml de IL-1 β en un medio con 5,5 mM de D-glucosa se incrementó significativamente cuando la D-glucosa extracelular aumentó a 22 mM.

Estos resultados confirman datos previos de nuestro grupo en cultivos celulares de músculo liso y endotelio vascular humano que demuestran que las respuestas inflamatorias inducidas por IL-1 β se potencian en presencia de concentraciones altas de D-glucosa, aunque la D-glucosa por sí misma no tiene efectos inflamatorios (Lafuente *et al*, 2008; Azcutia *et al*, 2010). Asimismo, la elevación de la D-glucosa potencia el rodamiento, la adhesión y la migración leucocitarias producidas por IL-1 β y observada mediante microscopia intravital en microvasos mesentéricos de rata, aunque no es capaz de hacerlo por sí misma (Azcutia *et al*, 2010). Junto con los resultados del presente trabajo, estos datos apoyan la hipótesis de que la D-glucosa puede tener un papel modulador muy importante en el daño vascular, al aumentar los efectos inducidos por otros factores pro-inflamatorios. Posiblemente, también pueden explicar las discrepancias descritas en distintos trabajos sobre la capacidad de la D-glucosa para producir daño vascular. Es decir, nosotros pensamos que la disfunción endotelial o el daño vascular en respuesta directa a la hiperglucemia ocurre sólo en vasos ya inflamados por un estímulo previo o concomitante, como ocurre en el caso de la IL-1 β . Como apoyo adicional a esta hipótesis está el hecho de que la administración de anakinra, un antagonista competitivo recombinante para los receptores para IL-1, no solo bloqueó de manera concentración-dependiente la disfunción endotelial producida por IL-1 β , sino que también abolió por completo la potenciación de esta disfunción observada en 22 mM de D-glucosa

extracelular.

Respecto de los mecanismos activados por la IL-1 β y que pueden ser responsables del deterioro de la función endotelial, se ha propuesto que la citoquina aumenta la producción de O $_2^{\cdot-}$ capaces de inactivar el ON endotelial (Jiménez-Altayó *et al*, 2006). Nuestros datos apoyan un papel para los ROS en la disfunción endotelial, ya que el tratamiento de los vasos con el barredor de O $_2^{\cdot-}$ tempol revirtió significativamente los efectos de la citoquina sobre la función endotelial. Por el contrario, ni la inhibición de la COX con indometacina ni el bloqueo de la iNOS con 1400W mejoraron la disfunción endotelial, lo que indica un escaso papel para estas enzimas. En este sentido, la mayor expresión de COX e iNOS inducida por IL-1 β en estos vasos ha sido descrita con periodos de tratamiento con la citoquina más prolongados (Briones *et al*, 2005).

Existe evidencia creciente sobre la participación de la enzima NADPH-oxidasa, como fuente principal de O $_2^{\cdot-}$, en el aumento del estrés oxidativo vascular asociado a la DM, así como a otras enfermedades vasculares que tienen un sustrato inflamatorio (Guzik *et al*, 2000; Guzik *et al*, 2002; Gao y Mann, 2009; Csányi *et al*, 2009; Lassègue & Griendling, 2010). La producción de O $_2^{\cdot-}$ dependiente de NADPH-oxidasa conduce a su vez a otros mecanismos pro-oxidantes, como la oxidación de BH $_4$ y el desacoplamiento de las sintasas de óxido nítrico, con la consiguiente producción de peroxinitrito (Kuzkaya *et al*. 2003).

Es interesante destacar que la respuesta inflamatoria vascular producida por citoquinas como IL-1 β y TNF- α está mediada por el aumento de la actividad de esta enzima, que cataliza la transferencia de electrones desde el NADPH al oxígeno molecular, generando O $_2^{\cdot-}$ y peróxido de hidrógeno (Kaur *et al*, 2004; Miller *et al*, 2007; Gao y Mann, 2009; Selemidis *et al*, 2009). Además, este es un paso crucial en células vasculares para activar el factor de transcripción NF- κ B por IL-1 β , lo que requiere la endocitosis del complejo citoquina/citoquina-receptor y la formación de endosomas de señalización que contienen la isoforma activada de la NADPH-oxidasa Nox-1; el O $_2^{\cdot-}$

resultante se transforma en peróxido de hidrógeno, pasa al citoplasma e induce la translocación del NF- κ B (Miller *et al*, 2007; Lassègue & Griendling, 2010).

En el presente trabajo, la actividad de la enzima NADPH-oxidas se estudió en células HUVEC cultivadas y en homogenados de microvasos mesentéricos de rata. En ambos casos, las preparaciones fueron sometidas a una estimulación con 2,5 ng/ml de IL-1 β durante 30 min. Con este abordaje experimental, se observó un incremento significativo de la actividad de la enzima sobre sus niveles basales, tanto en HUVEC como en microvasos mesentéricos, que fue sensible al bloqueo de los receptores para IL-1 con anakinra, así como a la acción de la apocinina, un fármaco inhibidor de la NADPH oxidasa (Riganti *et al*, 2008). Cuando los experimentos se realizaron en un medio con 22 mM de D-glucosa, la actividad basal de la NADPH-oxidasa no se modificó de forma significativa, mientras que la activación inducida por IL-1 β se potenció claramente, en una respuesta asimismo sensible a anakinra y apocinina. Estos resultados parecen sugerir que la interacción entre la D-glucosa y la IL-1 β implica una mayor activación de la NADPH-oxidasa y, previsiblemente, a un incremento del consiguiente estrés oxidativo.

Los resultados sobre la medida de la actividad enzimática de la NADPH-oxidasa se correspondían con las respectivas respuestas vasoactivas. Como ya se ha descrito, la disfunción endotelial producida por IL-1 β , potenciada en presencia de 22 mM de D-glucosa, resultaba bloqueada en todos los casos por anakinra. Además, el tratamiento con el inhibidor de la NADPH-oxidasa apocinina reducía sensiblemente la disfunción endotelial originada por la citoquina, tanto en un medio con D-glucosa normal como en un medio con niveles altos del monosacárido. Por tanto, nuestros datos sugieren claramente que el mecanismo por el que la IL-1 β produce disfunción endotelial implica la activación de la enzima NADPH-oxidasa, la subsecuente producción de O $_2^{\cdot-}$ y el desencadenamiento de los consiguientes procesos oxidativos ya mencionados. En este sentido, nuestros datos discrepan con resultados previos que sugieren un papel predominante para la

enzima xantino-oxidasa en la disfunción endotelial producida por la IL-1 β (Jiménez-Altayó *et al*, 2006).

La provisión de NADPH necesaria para la producción de O₂⁻ por la NADPH-oxidasa requiere la activación de la ruta de las pentosas fosfato que incluye, entre otras, la enzima G6PD (Gao y Mann, 2003; Selemidis *et al*, 2009). Esta enzima ha sido también implicada en procesos fisiopatológicos cardiovasculares y se ha propuesto que puede tener un papel vasoactivo relevante (Gupte *et al*, 2011). De hecho, la reducción de NADPH secundaria a la inhibición de la ruta de las pentosas con 6-ANAM tiene efecto vasodilatador en aorta y arteria pulmonar de rata (Gupte *et al*, 2002). En el presente trabajo, el bloqueo de la G6PD con 6-ANAM abolió el aumento de la actividad de la NADPH-oxidasa inducido por IL-1 β , de forma similar a lo observado con anakinra y apocinina, tanto en cultivos de células endoteliales como en preparados de microvasos mesentéricos de rata. Una explicación razonable para este hallazgo es que la inhibición de la ruta de las pentosas fosfato puede reducir el aporte de NADPH necesario para la actividad de la enzima, lo que ocurre tanto en D-glucosa normal como en presencia de altas concentraciones del monosacárido. Reforzando esta hipótesis, la disfunción endotelial originada por la IL-1 β mejoró de forma muy significativa en microvasos mesentéricos tratados con 6-ANAM, asimismo en presencia de niveles normales o altos de D-glucosa.

Papel de la IL-1 β en la disfunción endotelial diabética.

En esta segunda parte del trabajo se empleó un modelo temprano de diabetes tipo I, inducido mediante la administración de estreptozotocina, para estudiar la disfunción endotelial asociada a la DM. La presencia de disfunción endotelial en este modelo experimental ha sido descrita desde hace años, tanto en vasos de conductancia como en arterias de resistencia (Fortes *et al*, 1983; Kiff *et al*, 1991; Lash y Bohlen, 1991; Rodríguez-Mañas *et al*, 1998; Angulo *et al*, 1998). El desarrollo de disfunción endotelial requiere un tiempo de evolución de la enfermedad de al menos 8-11 días, según algunos autores (Lash y Bohlen, 1991), mientras que en trabajos previos de nuestro laboratorio se observa un deterioro de las relajaciones dependientes de endotelio a partir de la segunda semana de la inducción de la DM (Vallejo *et al*, 2000; Rodríguez-Mañas *et al*, 2003). Es interesante resaltar el hecho de que a los siete días de la administración de la estreptozotocina todavía no se obtienen modificaciones significativas de las respuestas vasodilatadoras endotelio-dependientes, ni en aorta ni en microvasos mesentéricos, a pesar de que los animales presentan unos niveles de hiperglucemia muy elevados (Rodríguez-Mañas *et al*, 2003). En el presente trabajo obtuvimos resultados análogos, de modo que los animales diabéticos presentaron una disfunción endotelial significativa a partir de la segunda semana de evolución de la enfermedad, por lo que éste fue el protocolo que se utilizó para el resto de los experimentos. En los microvasos mesentéricos procedentes de estos animales, la disfunción endotelial no se modificó por el aumento de la concentración extracelular de D-glucosa en el momento del experimento.

Por otra parte, se comprobó también que el aumento del estrés oxidativo es uno de los mecanismos productores de disfunción endotelial asociada a la diabetes, ya que el barredor de O₂⁻ tempol produjo una reversión parcial de la alteración endotelial, al igual que se ha demostrado previamente con otros agentes antioxidantes (Rodríguez-Mañas *et al*, 1998; Angulo *et al*, 1998; Vallejo *et al*, 2000). Por el contrario, la inhibición de COX o

iNOS no produjo efectos significativos, lo que sugiere que estas enzimas no tienen un papel relevante como mediadoras de la disfunción endotelial diabética, al menos en este modelo experimental.

Como se ha indicado anteriormente, hay evidencia clara de que la actividad de la enzima NADPH-oxidasa, a través de la producción de O_2^- , tiene un papel relevante en el aumento del estrés oxidativo vascular asociado a la DM (Guzik *et al*, 2000; Guzik *et al*, 2002; Gao y Mann, 2009; Csányi *et al*, 2009; Lassègue & Griendling, 2010). Nuestros datos corroboran estos trabajos previos, ya que los homogenados procedentes de microvasos mesentéricos de rata diabética con dos semanas de evolución presentaron un marcado incremento en la actividad NADPH-oxidasa, que se abolió por completo tras el tratamiento con apocinina. Asimismo, la inhibición de la ruta de las pentosas con 6-ANAM inhibió la actividad enzimática, presumiblemente, como antes se ha indicado, al bloquear el aporte de NADPH requerido para dicha actividad. El papel funcional de la NADPH-oxidasa en la disfunción endotelial diabética se confirmó también experimentalmente, ya que la apocinina produjo una mejoría significativa de las relajaciones endotelio-dependientes inducidas por ACh en los microvasos mesentéricos de estos animales.

La capacidad de la apocinina para inhibir la actividad NADPH-oxidasa y revertir la disfunción endotelial se ha descrito tanto en vasos humanos como procedentes de modelos experimentales de hipertensión (Hamilton *et al*, 2002). De hecho, estudios recientes demuestran que el tratamiento *in vivo* con apocinina en ratas hipertensas produce una disminución en la presión sanguínea y en la producción de O_2^- (Ciarcia *et al*, 2010). También se ha descrito la disminución de la actividad NADPH-oxidasa y la mejoría de la disfunción endotelial en respuesta a apocinina en diferentes modelos experimentales de DM, incluyendo tanto modelos genéticos (Zhang *et al*, 2008; Zhang *et al*, 2009), como el de DM inducida por estreptozotocina utilizado en el presente trabajo (López-López *et al*, 2008; Olukman *et al*, 2010; Serizawa *et al*, 2011; Oelze *et al*, 2011).

Las semejanzas entre la disfunción endotelial observada en el modelo de DM inducida por estreptozotocina y la originada por la IL-1 β en microvasos mesentéricos de ratas controles nos llevó a sugerir una posible participación de esta citoquina en la alteración de las relajaciones dependientes del endotelio observadas en el modelo diabético. En este sentido, el papel de las citoquinas pro-inflamatorias como mediadoras de daño vascular asociado a enfermedades metabólicas ha sido propuesto anteriormente (Raine y Ferri, 2005; Zhang *et al*, 2009), aunque la mayor parte de los trabajos se refieren al posible efecto del TNF- α , asociado al síndrome metabólico y la DM tipo 2, como inductor de disfunción endotelial (Rask-Masden *et al*, 2003; Picchi *et al*, 2006; Gao *et al*, 2007). La IL-1 β , por su parte, se ha relacionado con la alteración funcional y la apoptosis de las células β pancreáticas de pacientes con DM tipo 2 (Donath *et al*, 2008). También se ha observado que el tratamiento a largo plazo con IL-1 β o TNF- α es capaz de inducir resistencia a insulina en adipocitos de ratón y humanos (Houstis *et al.*, 2006).

Se ha propuesto que los niveles circulantes de citoquinas pro-inflamatorias, como IL-1 β , se encuentran elevados en modelos animales de diabetes (El-Seweidy *et al.*, 2002) y en pacientes diabéticos (Pickup *et al.*, 2000; Arnalich *et al.*, 2000; Erbagci *et al.*, 2001; Moriwaki *et al.*, 2003). En pacientes con DM tipo 2 se ha descrito un incremento en la liberación de estas citoquinas, especialmente TNF- α , durante la hiperglucemia postprandial (Esposito *et al.*, 2002; Nappo, 2002; Esposito *et al*, 2007). Sin embargo, otros grupos no obtienen diferencias significativas en los niveles de TNF- α o IL-1 β en sujetos con DM (Mooradian *et al*, 1991). También hay varios trabajos que no consiguen detectar incrementos significativos en los niveles plasmáticos de TNF- α (Fidan *et al*, 2005) o IL-1 β (Yazar *et al*, 2011) en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo, en los que la evolución de la enfermedad durante dos semanas no aumentó los niveles plasmáticos de estas citoquinas.

A pesar de ello, el tratamiento de las ratas diabéticas con anakinra, un antagonista de los receptores para IL-1, tuvo consecuencias relevantes sobre la disfunción endotelial en microvasos mesentéricos aislados de estos animales. Un grupo de ratas diabéticas recibió una dosis de 100 mg/Kg/día durante los tres días previos a la realización de los experimentos. En los microvasos mesentéricos procedentes de estos animales, se observó una reversión, claramente significativa pero parcial, de la disfunción endotelial, aunque los niveles de citoquinas plasmáticas no se alteraron de manera significativa. La mejoría de la función endotelial no se incrementó al aumentar la duración del tratamiento a los siete días previos al sacrificio, mientras que cuando la dosis de anakinra se incrementó hasta 160 mg/Kg/día, la reversión de la disfunción endotelial fue completa, ya que los segmentos vasculares ensayados presentaron unas repuestas vasodilatadoras endotelio-dependientes similares a las obtenidas en el grupo de animales controles. En estas condiciones experimentales, los niveles circulantes de IL-1 β o TNF- α se redujeron de forma significativa. Además, en los microvasos procedentes de los animales tratados con 160 mg/Kg/día de anakinra, la actividad NADPH-oxidasa era similar a la observada en los controles, de modo que el bloqueo de la esta enzima con apocinina o la inhibición de la G6PD con 6-ANAM no producía ningún efecto adicional.

En definitiva, nuestros resultados indicaron claramente un papel relevante para citoquinas pro-inflamatorias, de tipo de la IL-1 β , en la disfunción endotelial diabética, al menos en el modelo de DM inducida por estreptozotocina de corta evolución. Posiblemente, el efecto de anakinra sobre la disfunción endotelial se pueda explicar tanto por una acción local, antagonizando los efectos inflamatorios directos de la IL-1 β sobre la pared vascular, como por una acción antiinflamatoria sistémica, ya que los niveles plasmáticos de IL-1 β , pero también de TNF- α , se redujeron por debajo de los valores observados en los animales controles.

En los últimos años han aparecido diversos trabajos analizando el papel de los antagonistas de los receptores para IL-1 en el tratamiento de la diabetes mellitus. En este

sentido, se ha descrito que anakinra mejora la glucemia y la función de las células β -pancreáticas en pacientes con DM tipo 2, así como en modelos animales (Larsen *et al*, 2007; Schwarznau *et al*, 2009; Larsen *et al*, 2009). Además, en modelos experimentales de DM tipo 2 y obesidad, se ha demostrado que el bloqueo de los receptores para IL-1 mejora la homeostasis de la glucosa y reduce la inflamación tisular (Sauter *et al*, 2008; McGillicuddy *et al*, 2009; Ehses *et al*, 2009). También se ha descrito que anakinra mejora las alteraciones de la función cardíaca y vascular asociadas a la inflamación cardiovascular (Crossman *et al*, 2008; Ikonomidis *et al*, 2008). Nuestros datos indican que su acción antiinflamatoria puede asimismo mejorar la disfunción endotelial diabética, que se revela como una alteración estrechamente relacionada con la inflamación.

En conclusión, el presente trabajo sugiere un papel limitado para la hiperglucemia como responsable directo de la disfunción endotelial diabética, como ya hemos demostrado previamente para los mecanismos inflamatorios vasculares (Lafuente *et al*, 2008; Azcutia *et al*, 2010). Por el contrario, este trabajo apoya la idea de que la hiperglucemia sólo promueve el desarrollo de vasculopatía diabética al potenciar una reacción inflamatoria ya establecida, siendo esta inflamación previa un factor crucial en el desarrollo de la DM (Pradhan *et al*, 2001). Desde un punto de vista terapéutico, emerge un concepto potencialmente importante; además de controlar la hiperglucemia, la necesidad de reducir la inflamación crónica a nivel sistémico y/o vascular puede tener gran relevancia a la hora de tratar la diabetes mellitus y prevenir sus complicaciones (Dilley y Little, 2008). En este contexto, aquellas aproximaciones dirigidas a reducir la inflamación sistémica, mediante fármacos, ejercicio físico o dieta (Kasapis y Thompson, 2005), pueden proporcionar un beneficio incrementado para prevenir los eventos cardiovasculares asociados a la diabetes mellitus. Desde el punto de vista estrictamente farmacológico, los bloqueantes de los receptores para IL-1 constituyen un abordaje sumamente interesante para prevenir y/o tratar la vasculopatía diabética, por lo que es

previsible que tengan un importante desarrollo en los próximos años (Larsen *et al*, 2007; Donath y Mandrup-Poulsen, 2009; Maedler *et al*, 2011).

CONCLUSIONES

El objetivo principal de este trabajo ha sido analizar el papel específico que desempeñan la glucosa extracelular y la IL-1 β sobre el desarrollo de disfunción endotelial asociada a la diabetes mellitus, así como analizar los posibles mecanismos implicados y la interacción entre inflamación e hiperglucemia. Las principales conclusiones obtenidas en este trabajo han sido:

1. El mero aumento de las concentraciones extracelulares de D-glucosa no es suficiente para inducir un deterioro en las relajaciones dependientes de endotelio producidas por ACh en microvasos mesentéricos de rata Spargue-Dawley.
2. La pre-incubación de los vasos con la citoquina pro-inflamatoria IL-1 β durante 30 min ó 2 h produce disfunción endotelial en la vasculatura mesentérica de rata de manera concentración-dependiente. Estos efectos son potenciados por un aumento de las concentraciones extracelulares de D-glucosa, sugiriendo que la hiperglucemia modula la alteración de la función endotelial inducida por la IL-1 β .
3. El tratamiento de los microvasos mesentéricos de rata con el antagonista recombinante del receptor de IL-1, anakinra (AK), produce un bloqueo concentración dependiente de la disfunción endotelial causada por IL-1 β , tanto en un medio con D-glucosa normal como en presencia de concentraciones elevadas de la misma.
4. La disfunción endotelial inducida por IL-1 β , así como su potenciación en presencia de alta D-glucosa, está relacionada con un aumento de la actividad de la enzima NADPH-oxidasa, medida mediante estudios de quimioluminiscencia por lucigenina, capaz de producir O₂⁻ e interferir con las relajaciones endotelio-dependientes mediadas por el ON. En este sentido, la disfunción endotelial por IL-1 β mejora con tempol, un barredor de O₂⁻, con el bloqueo de la NADPH-oxidasa con apocinina y mediante la inhibición de la ruta de las pentosas fosfato (necesaria para el suministro de NADPH) con 6-ANAM.

5. En el modelo de diabetes experimental por la administración intraperitoneal de estreptozotocina, se produce un deterioro de la relajación endotelio-dependiente inducida por ACh transcurridas dos semanas de evolución de la enfermedad.
6. La disfunción endotelial observada en estas ratas está mediada por un aumento del estrés oxidativo asociado a la activación de la enzima NADPH-oxidasa, medida mediante estudios de quimioluminiscencia por lucigenina. Al igual que ocurre con la alteración de la función endotelial originada por IL-1 β , la disfunción endotelial diabética mejora con tempol, un barredor de O $_2^-$, con el bloqueo de la NADPH-oxidasa con apocinina y mediante la inhibición de la ruta de las pentosas fosfato (necesaria para el suministro de NADPH) con 6-ANAM.
7. En este modelo agudo de diabetes experimental, la función endotelial de los microvasos mesentéricos se restaura por completo mediante el tratamiento de los animales con el antagonista competitivo de los receptores para IL-1, anakinra. La mejoría de la función endotelial se asocia a una inhibición de la actividad NADPH-oxidasa en los vasos obtenidos de los animales tratados. Por tanto, la citoquina pro-inflamatoria IL-1 β puede tener un papel relevante en la disfunción endotelial asociada a la diabetes mellitus, aunque sus niveles plasmáticos no se incrementan significativamente en los animales diabéticos.

En conjunto, estos hallazgos indican que la hiperglucemia por sí sola no es suficiente para producir directamente disfunción endotelial, aunque puede exacerbar los efectos de una respuesta inflamatoria en curso, producida por citoquinas del tipo de la IL-1 β , que podrían estar mediando la disfunción endotelial asociada a la diabetes mellitus, del mismo modo que participan en distintos procesos inflamatorios relacionados con la enfermedad. El mecanismo activado por estas citoquinas puede ser la enzima NADPH-oxidasa vascular, con el consiguiente aumento en la producción de O $_2^-$. Finalmente, este trabajo sugiere que las aproximaciones terapéuticas para el tratamiento de la vasculopatía diabética deberían no sólo disminuir la hiperglucemia,

sino también reducir el ambiente pro-inflamatorio vascular. En este sentido, los antagonistas de los receptores para IL-1 constituyen una prometedora posibilidad.

CONCLUSIONS

The main objective of this study has been to analyze the specific role of extracellular glucose and the IL-1 β on the development of diabetic endothelial dysfunction, as well as to analyze the possible mechanisms involved and the interaction between inflammation and hyperglycemia. The main conclusions obtained in this work are:

1. The mere increase of extracellular D-glucose concentrations is not sufficient to induce an impairment of the endothelium-dependent relaxations produced by ACh in mesenteric microvessels of Spargue-Dawley rats.
2. The pre-incubation of rat mesenteric microvessels with the pro-inflammatory cytokine IL-1 β during 30 min or 2 h produces endothelial dysfunction in a concentration-dependent manner. These effects are potentiated after increasing the extracellular concentrations of D-glucose, suggesting that the hyperglycemia modulates the alteration of the endothelial function induced by IL-1 β .
3. The incubation of the rat mesenteric microvessels with the recombinant IL-1 receptor antagonist, anakinra (AK), produces a concentration-dependent recovery of the endothelial dysfunction caused by IL-1 β , both in normal D-glucose medium as in the presence of high concentrations of the hexose.
4. The endothelial dysfunction induced by IL-1 β , as well as its enhancement by high D-glucose, is associated with an increase of the NADPH-oxidase enzymatic activity, measured by lucigenin chemiluminescence, which can produce O $_2^-$ that interferes with the endothelium-dependent relaxations mediated by NO. Moreover, the endothelial dysfunction by IL-1 β is improved by treating the vessels with the O $_2^-$ scavenger tempol or the NADPH-oxidase inhibitor apocynin, and by inhibiting the pentose phosphate pathway (necessary for the supply of NADPH) with 6-ANAM.
5. In the experimental model of diabetes mellitus induced by the intraperitoneal administration of streptozotocin, an impairment of the endothelium-dependent relaxation induced by ACh is produced after two weeks of evolution of the disease.

6. The endothelial dysfunction observed in these rats is mediated by an increase of the oxidative stress associated to the activation of the NADPH-oxidase enzyme, measured by lucigenin chemiluminescence studies. As occurs with the alteration of the endothelial function caused by IL-1 β , the diabetic endothelial dysfunction is improved by treating the vessels with the O $_2^-$ scavenger tempol or the NADPH-oxidase inhibitor apocynin, and by inhibiting the pentose phosphate pathway (necessary for the supply of NADPH) with 6-ANAM.

7. In this acute model of experimental diabetes, the endothelial function of the mesenteric microvessels is restored by the treatment of the animals with the competitive antagonist of the IL-1 receptors, anakinra. The improvement of the endothelial function was associated to the inhibition of the NADPH-oxidase activity in the vessels obtained of these treated animals. Therefore, the pro-inflammatory cytokine IL-1 β can have a relevant role in the endothelial dysfunction associated to the diabetes mellitus, although its plasmatic levels are not significantly increased in the diabetic animals.

Taking together, these findings indicate that hyperglycemia by itself is not sufficient to directly produce endothelial dysfunction, although it can potentiate the effects of an ongoing inflammatory response, produced by cytokines like IL-1 β , which could be mediating the endothelial dysfunction associated to the diabetes mellitus, in the same way that occurs in different inflammatory processes related to the disease. The mechanism activated by these cytokines can be the vascular NADPH-oxidase enzyme, with the consequent increase in the production of O $_2^-$. Finally, this study suggests that the therapeutic approaches for the treatment of the diabetic vasculopathy should not only diminish the hyperglycemia, but also reduce the vascular pro-inflammatory environment. The antagonists of the receptors for IL-1 seem to be a promising possibility.

REFERENCIAS

- AGO T, KITAZONO T, OOBOSHI H, IYAMA T, HAN YH, TAKADA J. Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation* 2004;109:227-33.
- ALEXANDRAKI K, PIPERI C, KALOFOUTIS C, SINGH J, ALAVERAS A, KALOFOUTIS A. Inflammatory process in type 2 diabetes: The role of cytokines. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1084: 89-117.
- ALVAREZ B., DEMICHELI V., DURÁN R., TRUJILLO M., CERVEÑANSKY C., FREEMAN B.A., RADI R. Inactivation of human Cu,Zn superoxide dismutase by peroxynitrite and formation of histidinyl radical. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37: 813-822.
- AHMED N. Advanced glycation end products-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2005; 67(1): 3-21.
- ANGULO J., SÁNCHEZ-FERRER C. F., PEIRÓ C., MARÍN J., RODRÍGUEZ-MAÑAS L. Impairment of endothelium-dependent relaxation by increasing percentages of glycosylated human hemoglobin. Possible mechanisms involved. *Hypertension.* 1996; 28(4): 583-592.
- ARNALICH F, HERNANZ A, LOPEZ-MADERUELO D, PENA JM, CAMACHO J, MADERO R, VAZQUEZ JJ, MONTIEL C. Enhanced acute-phase response and oxidative stress in older adults with type II diabetes. *Horm Metab Res* 2000; 32: 407-412
- AZCUTIA V., ABU-YAHA M., ROMACHO T.M VÁZQUEZ-BELLA M., MATESANZA N., LUSCINSKAS F.W., RODRÍGUEZ-MAÑAS L., SANZA M.J., SÁNCHE-FERRER C.F., PEIRÓ C. Inflammation Determines the Pro-Adhesive Properties of High Extracellular D-Glucose in Human Endothelial Cells *In vitro* and Rat Microvessels *In Vivo*. *Plos One.* 2010; 5: e10091.
- BAYNES J. W., THORPE S. R. Role of oxidative stresses in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes care* 1999; 48(1): 1-9
- BECKMAN J.A., CREAGER M.A., LIBBY P. Diabetes and Atherosclerosis Epidemiology, Pathophysiology, and Management et al. *JAMA.* 2002; 287: 2570-2581.
- BRIONES AM, MONTOYA N, GIRALDO J, VILA E. Ageing affects nitric oxide synthase, cyclooxygenase and oxidative stress enzymes expression differently in mesenteric resistance arteries. *Auton Autacoid Pharmacol* 2005; 25:155-162.
- BROWNLEE M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001;414(6865): 813-820.

BROWNLEE M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005 Jun; 54 (6): 1615-1625.

BROUWERS O., NIESSEN P.M., HAENEN G., MIYATA T., BROWNLEE M., STEHOUWER C.D., DE MEY J.G., SCHALKWIJK C.G. Hyperglycaemia-induced impairment of endothelium-dependent vasorelaxation in rat mesenteric arteries is mediated by intracellular methylglyoxal levels in a pathway dependent on oxidative stress. *Diabetologia*. 2010; 53:989-1000.

BRYAN RM JR, YOU J, GOLDING EM, MARRELLI SP. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a cousin to nitric oxide and prostacyclin. *Anesthesiology* 2003; 102:1261-1277.

CAI H, HARRISON DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87:840-844.

CERIELLO A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy. *Diabetes Care*. 2003 May; 26 (5): 1589-1596.

CERIELLO A Postprandial hyperglycemia and diabetes complications: is it time to treat? *Diabetes* 2005;54: 1-7

CHUNG S. S., HO E. C., LAM K. S., CHUNG S. K. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003; 14(8 Suppl 3): S233-S236.

CIARCIA R, DAMIANO S, PANICO C, SCANNI R, FIORITO F, FLORIO S, WELCH J.W. Apocynin activity in spontaneously hypertensive rats (SHR): preliminary studies in vivo. *Vet Res Commun*. 2010; 34:83-86.

COOPER ME, BONNET F, OLDFIELD M, JANDELEIT-DAHM K. Mechanism of diabetic vasculopathy: an overview. *Am J Hypert*. 2001; 14:475-486.

DARMAUN D., SMITH S. D., SWEETEN S., SAGER B. K., WELCH S., MAURAS N. Evidence for accelerated rates of glutathione utilization and glutathione depletion in adolescents with poorly controlled type 1 diabetes. *Diabetes*. 2005; 54(1): 190-196.

DE VRIESE AN S., VERBEUREN T.J., VAN DE VOORDE J., LAMEIRE N.H., VANHOUTTE P.M. Endothelial dysfunction in diabetes. *J. Pharmacol.* 2000; 130: 963-974.

DÍAZ M, BAIZA LA, IBÁÑEZ MA, PASCOE D, GUZMÁN AM, KUMATE J. Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. *Gac Med Mex* 2004;140(4):437-47.

DILLEY RJ AND LITTLE PJ Another piece of cell biology in the puzzle of inflammation, glucose and diabetic vascular disease. *J Hypertens* 2008;26: 396-398

DING H., TRIGGLE C.R. Endothelial cell dysfunction and the vascular complications associated with type II diabetes: assessing the health of the endothelium. *Vascular Health Risk Management*. 2005; 1:55-71.

DJORDJEVIC T., POGREBNIAC A., VELAIBA R.S., BONELLO S., WOTZLAW C., ACKER H., HESS J., GÖRLACH A. The expression of the NADPH oxidase subunit p22phox is regulated by a redox-sensitive pathway in endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2005; 38:616-630.

DOGNÉ JM, DE LEVAL X, DELAGE J DAVID JL, MASSEREEL B. New trends in thromboxane and prostacyclin modulators. *Curr Med Chem* 2000; 7:609-628.

DONATH M.Y, SCHUMANN D.M, FAULENBACH M, ELLINGSGAARD H, PERREN A, EHSES J.A. Islet inflammation in type 2 diabetes: from metabolic stress to therapy. *Diabetes Care*. 2008; 31(2):S161-S164.

DUSTING G, SELEMIDIS S, JIANG F. Mechanisms for suppressing NADPH oxidase in the vascular wall. *Mem.Inst. Oswaldo Cruz*. 2005; 100(1):97-103.

EHSES JA, LACRAZ G, GIROIX MH, SCHMIDLIN F, COULAUD J, KASSIS N, IRMINGER JC, KERGOAT M, PORTHA B, HOMO-DELARCHE F, DONATH MY. IL-1 antagonism reduces hyperglucemia and tissue inflammation in the type 2 diabetic GK rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:13998-14003.

EL-SEWEIDY MM, EL-SWEFY SE, AMEEN RS, HASHEM RM. Effect of age receptor blocker and/or anti-inflammatory coadministration in relation to glycation, oxidative stress and cytokine production in stz diabetic rats. *Pharmacol Res* 2002; 45: 391-398

ENGLISH F.A., MCCARTHY F.P., ANDERSSON I.J, STANLEY J.L, DAVIDGE S.T., BAJER P.N, WALSH S.K, KENNY L.C. Administration of the PARP inhibitor PJ34 ameliorates the impaired. *Reprod. Sci*. 2012; (in press).

ERBAGCI A.B., TARAKCIOGLU M., COSKUM Y., SIVASLI E., NAMIDURU E. Mediators of inflammation in children with type 1 diabetes mellitus: cytokines in type 1 diabetic children. *Clin Biochem*. 2001; 34:645-650.

ESPER R.J., VILARIÑO J.O., MACHADO R.A., PARAGANO A. Endothelial dysfunction in normal and abnormal glucose metabolism. *Adv Cardiol*. 2008; 45:17-43.

ESPOSITO K, NAPPO F, MARFELLA R, GIUGLIANO G, GIUGLIANO F, CIOTOLA M, QUAGLIARO L, CERIELLO A, GIUGLIANO D Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation* 2000; 106: 2067-2072

ESPÓSITO K., NAPPO F., MARFELLA R., GIUGLIANO G., GIUGLIANO F., CIOTOLA M., QUAGLIARO L., CERIELLO A., GIUGLIANO D. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation*. 2002;106(16): 2067-2072.

FAUCI, EUGENE BRAUNWALD, DENNIS L. KASPER, STEPHEN L. HAUSER, DAN L. LONGO, J. LARRY JAMESON, AND JOSEPH LOSCALZO, EDS. Harrison Principios de Medicina Interna, 17^a edición. 2008.

FELETOU M, VANHOUTTE PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 291:H985-H1002.

FERDINANDY P., DANIAL H., AMBRUS I., ROTHERY R.A., SCHULZ R. Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. *Circ Res*. 2001; 89 295-297.

FUJIWARA H, YOSHIHIRO W, HASHIKAWA-HOBARA N, MAKINO K, TAKATORI S, YOSHITO Z, YOSHIHISA K, HIROMU K. Endothelium-Derived Relaxing Factor-Mediated Vasodilation in Mouse Mesenteric Vascular Beds. *J pharmacol Sci* 2012; 118 373-381.

GARCÍA-SORIANO F., VIRÁG L., JAGTAP P., SZABÓ E., MABLEY J.G., LIAUDET L., MARTON A., HOYT D.G., MURTHY K.G.K., SALZMAN A.L., SOUTHAN G.J., SZABÓ C. Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *Nature Med*. 2001; 7: 108-113.

GAO L, MANN GE. Vascular NAD(P)H oxidase activation in diabetes: a double-edged sword in redox signalling. *Cardiovasc Res*. 2009 Apr 1;82(1):9-20.

GARLAND CJ, PLANE F, KEMP BK, COCKS TM. Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. *Trends Pharmacol Sci* 1995; 16:23-30.

GAUTHIER K.M., DEETER C., KRISHNA U.M., REDDY Y.K., BONDLELA M., FALCK J.R., CAMPBELL W.B. 14,15-Epoxyeicosa-5(Z)-enoic acid: a selective epoxyeicosatrienoic acid antagonist that inhibits endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in coronary arteries. *Hypertension*. 2005; 45:666-671.

GIACCO F, BROWNLEE M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*. 2010 Oct 29;107(9):1058-70.

GIANNATTASIO C., FAILLA M., GRAPPIOLO A., GAMBA P. L., PALEARI F., MANCIA G. Progression of large artery structural and functional alteration in Type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2001; 44(2): 203-208.

GIUGLIANO D.; CERIELLO A., PAOLISSO G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*. 1996; 19: 257-267.

GIUSEPPE G.L., ABBATE A., LUIZZO G., BIASUCCI L.M. Atherothrombosis, Inflammation, and Diabetes. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 2;41: 1071-1077.

GRIENGLING K.K. Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system. *Heart*. 2004; 90:491-493.

GRIENGLING K.K, FRIZGERALD G.A. Oxidative stress and cardiovascular injury: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation*. 2003; 108:1912-1916.

GORLACH A, BRANDES R, NGUYEN K, AMIDI M, DEHGhani F, BUSSE R. A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ Res* 2000;87:26-32.

GUO L, ZHANG Z, GREEN K, STANTON RC. Suppression of interleukin-1 beta-induced nitric oxide production in RINm5F cells by inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry*. 2002 Dec 17;41(50):14726-33.

GUPTE RS, ATA H, RAWAT D, ABE M, TAYLOR MS, OCHI R, GUPTE SA. Glucose-6-phosphate dehydrogenase is a regulator of vascular smooth muscle contraction. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Feb 15;14(4):543-58.

GUPTE RS, VIJAY V, MARKS B, LEVINE RJ, SABBAAH HN, WOLIN MS, RECCHIA FA, GUPTE SA. Upregulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase and NAD(P)H oxidase activity increases oxidative stress in failing human heart. *J Card Fail*. 2007 Aug;13(6):497-506.

GUPTE SA. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a novel therapeutic target in cardiovascular diseases. *Curr Opin Investig Drugs*. 2008 Sep;9(9):993-1000.

GUPTE SA, LI KX, OKADA T, SATO K, OKA M. Inhibitors of pentose phosphate pathway cause vasodilation: involvement of voltage-gated potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 Apr;301(1):299-305.

GUPTE SA, LEVINE RJ, GUPTE RS, YOUNG ME, LIONETTI V, LABINSKY V, FLOYD BC, OJAIMI C, BELLOMO M, WOLIN MS, RECCHIA FA. Glucose-6-phosphate dehydrogenase-

derived NADPH fuels superoxide production in the failing heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2006 Aug;41(2):340-9.

GUZIK TJ, MUSSA S, GASTALDI D. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: Role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2002;105:1656-62.

GUZIK TJ, WEST NE, BLACK E, MCDONALD D, RATNATUNGA C, PILLAI R, CHANNON KM. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res* 2000; 86:E85-90.

HAMILTON C.A, BROSNAN M.J, AL-BENNA S, BER G, DOMINICZAK A.F, NAD(P)H oxidase inhibition improves endothelial function in rat and human blood vessels, *Hypertension.* 2002; 40:755-762.

HATTORI Y., KASAI K., GROSS S.S. NO suppresses while peroxynitrite sustains NF- κ B: a paradigm to rationalize cytoprotective and cytotoxic actions attributed to NO. *Cardiovasc Res.* 2004; 63: 31-40.

HONING ML, SMITS P, MORRIS PJ, RABELINK TJ. Bradykinin-induced vasodilatation of human forearm resistance vessels is primarily mediated by endothelium-dependent hyperpolarization. *Hypertension* 2000; 35:1314-1318.

HOTAMISLIGIL GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006;444: 860-867, doi:10.1038/nature05485

HOUBEN A.J., SCHAPER N.C., DE HAAN C.H.A., HUVERS F.C., SLAAF D.W., LEEUW P.W., KRUSEMAN A.C.N. Local 24-h hyperglycemia does not affect endothelium-dependent or -independent vasoreactivity in humans. *Am J Physiol.* 1996; 270: H2014-H2020.

HOUSTIS N, ROSEN ED, LANDER ES Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 2006;440: 944-948

HOWARD A.B., ALEXANDER RW., NEREM R.M., GRIENGLING K.K. TAYLOR W.R. Cyclic strain induces oxidative stress in endothelial cells. *Am J Physiol.* 1997; 272:C421-C427.

INOUCHI T., SONTA T., TSUBOUCHI H., ETOH T., KAKIMOTO M., SONODA N., SATO N., SEKIGUCHI N., KOBAYASHI K., SUMIMOTO H., UTSUMI H., NAWATA H. Protein Kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003; 14(8 Suppl 3): S227-S232.

JIMÉNEZ-ALTAYÓ F., BRIONES A.M., GIRALDO J., PLANAS A.M., SALAICES M., VILA E. Increased Superoxide Anion Production by Interleukin-1b Impairs Nitric Oxide-Mediated Relaxation in Resistance Arteries. *J Pharmacology*. 2006; 316: 42-52.

KANG KB, VAN DER ZYPP A, IANNAZZO L, MAJEWSKI H. Age-related changes in monocyte and platelet cyclooxygenase expression in healthy male humans and rats. *Transl Res* 2006; 148:289-294.

KASAPIS C AND THOMPSON PD The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers: a systematic review. *J Am Coll Cardiol* 2005;45: 1563-1569

KILPATRICK E.S., RIGBY A.S., ATKIN S.L. Glucose variability and diabetes complication risk: we need to know the answer. *Diabetic Medicine*. 2010; 27:868-871.

KOENIG RJ, PETERSON CM, JONES RL, SAUDEK C, LEHRMAN M, CERAMI A. Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1976; 295:417-420.

KRACHT M., SAKLATVALA J. Transcriptional and post-transcriptional Control of gene Expression in Inflammation. *Cytokine*. 2002; 20: 91-106.

LAFUENTE N, MATESANZ N., AZCUTIA V., ROMACHO T., NEVADO J., RODRIGUEZ-MAÑAS L., MONCADA S., PEIRO C., SANCHEZ-FERRER C.F. The deleterious effect of high concentrations of D-glucose requires pro-inflammatory pre-conditioning. *Hypertension*. 2007; 26:487-485.

LASH J.M., BONHLEN H.G. Structural and functional origins of suppressed acetylcholine vasodilation in diabetic rat intestinal arterioles. *Circ. Res*. 1991; 69: 1259-1268.

LASSÉGUE B, GRIENDLING K.K. NADPH Oxidases: Functions and pathologies in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010; 30:653-661.

LEIVA A., HÂNCU N. Enfermedad cardiovascular en la diabetes mellitus: impacto sanitario y patogenia. *Cardiovascular Risk Factors*, Vol. 10 N° 5, 2001.

LEOPOLD JA, WALKER J, SCRIBNER AW, VOETSCH B, ZHANG YY, LOSCALZO AJ, STANTON RC, LOSCALZO J. Glucose-6-phosphate dehydrogenase modulates vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *J Biol Chem*. 2003b Aug 22;278(34):32100-6.

LI W.G, STOLL L.L, RICE J.B, XU S.P, MILLER FJ JR, CHATTERJEE P, HU L, OBERLEY L.W, SPECTOR A.A, WEINTRAUB N.L. Activation of NAD(P)H oxidase by lipid hydroperoxides:

mechanism of oxidant-mediated smooth muscle cytotoxicity. *Free Radic Biol Med.* 2003; 34:937-946.

LIN N, ZHANG H, SU Q. Advanced glycation end-products induce injury to pancreatic beta cells through oxidative stress. *Diabetes Metab* 2012; (in press).

LOSCALZO J. What We Know and Don't Know About L-Arginine and NO. *Circulation* 2000; 101: 2126-2129.

LU H, RAPTIS M, BLACK E, STAN M, AMAR S, GRAVES DT Influence of diabetes on the exacerbation of an inflammatory response in cardiovascular tissue. *Endocrinology* 2004;145: 4934-4939

LUKSHA L, AGEWALL S, KUBLICKIENE K. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2009; 202:330-344.

MAKITA Z, RAYFIELD E, FUH H, CARTWRIGHT K, FRIEDMAN E, BUCALA R. Hemoglobin-AGE: a novel maker for advanced glycosilation. Decreased levels in diabetic patients after aminoguanidine administration. *Diabetes* 1992;41:81A

MALLIOUX RJ, HARPER ME. Glucose regulates enzymatic sources of mitochondrial NADPH in skeletal muscle cells; a novel role for glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Epub* 2010; 24(7):2495-2450.

MARTIN-GALLAN P., CARRASCOSA A., GUSSINYE M., DOMINGUEZ C. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. *Free. Radic. Biol. Med.* 2003; 34(12): 1563-157.

MARQUES-VIDAL P., BASTARDOT F., VON KANEL R., PACCAUD F., PREISIG M., WAEBER G., VOLLENWEIDER P. Association between circulating cytokine levels, diabetes and insulin resistance in a population-based sample (CoLaus study). *Clin Endocrinol.* 2012; (in press).

MILLER FJ Jr, FILALI M, HUSS GJ, STANIC B, CHAMSEDDINE A, BARNA TJ, LAMB FS. Cytokine activation of nuclear factor kappa B in vascular smooth muscle cells requires signaling endosomes containing Nox1 and CIC-3. *Circ Res.* 2007;101(7):663-71.

MITCHELL JA, ALI F, BAILEY L, MORENO L, HARRINGTON LS. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Exp Physiol* 2008; 93:141-147.

- MOLLNAU H., WENDT M., SZOCS K. Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res.* 2002; 90:58-95.
- MONCADA S, HIGGS A. The l-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-2012.
- MORIWAKI Y., YAMAMOTO T., SHIBUTANI Y., AOKI E., TSUTSUMI Z., TAKAHASI S., OKAMURA H., KOGA M., FUKUCHI M., HADA T. Elevated levels of interleukin-18 and tumor necrosis factor- α in serum of patients with type 2 diabetes mellitus: relationship with diabetes nephropathy. *Metabolism* 2003; 52:605-608.
- MULLER G, MORAWIETZ H, NAD(P)H oxidase and endothelial dysfunction. *Horm Metab Res.* 2009; 41(2): 152-158.
- MULVANY M.J., HALPERN W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ. Res.* 1977; 41:19-26.
- NAKAHATA N. Thromboxane A₂: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol Ther* 2008; 118:18-35
- NAPPO F, ESPOSITO K, CIOFFI M, GIUGLIANO G, MOLINARI AM, PAOLISSO G, MARFELLA R, GIUGLIANO D. Postprandial endothelial activation in healthy subjects and in type 2 diabetic patients: role of fat and carbohydrate meals. *J Am Coll Cardiol* 2000; 39:1145-1150.
- NOUROOZ-ZADEH J., RAHIMI A., TAJADDINI-SARMADI J., TRITSCHLER H., ROSEN P., HALLIWELL B., BETTERIDGE D. J. Relationships between plasma measures of oxidative stress and metabolic control in NIDDM. *Diabetologia* 1997; 40(6): 647-653
- OMS, Organización Mundial de la salud. http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/es/ 2012.
- PACHECO M.E., BELTRÁN A, REDONDO J, MANSO A.M, ALONSO M.JM SALAICES M. *Eur Journal of Pharmacol.* 2006; 24:115-123.
- PACHER P, BECKMAN JS, LIAUDET L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007; 87:315-424.
- PALMER R.M., FERRIGE A.G., MONCADA S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987; 327:524-526.
- PICKUP J. C. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2004; 27(3):813-823.

- PICKUP J.C., CHUSNEY G.D., THOMAS S.M. BURT D. Plasma interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and blood cytokine production in type 2 diabetes. *Life Sci.* 2000; 67:291-300.
- PIEPER G., MEIER D.A., HAGER S.R. Endothelial dysfunction in a model of hyperglycemia and hyperinsulinemia. *Am J Physiol.* 1995; 269: H845-H850.
- POLI G, LEONARDUZZI G, BIASI F, CHIARPOTTO E. Oxidative stress and cell signaling. *Curr Med Chem.* 2004; 11:1163-1182.
- POU S, POU WS, BREDT DS, SNYDER SH, ROSEN GM. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1992;267:24173-24176.
- PRASSAD A., BEKKER P., TSIMIKAS S. Advanced Glycation Endproducts and Diabetic Cardiovascular Disease. *Cardiol Rev.* 2012; (in press).
- RADI R, CASSINA A, HODARA R, QUIJANO C, CASTRO L. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic Biol Med* 2002; 33:1451-1464.
- RIGANTI C, COSTAMAGNA C, DOUBLIER S, MIRGALIA E, POLIMENI M, BOSIA A, CHIGO D. The NADPH oxidase inhibitor apocynin induces nitric oxide synthesis via oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008; 228(3)277-285.
- ROBBINS. Patología estructural y funcional. 8ª edición. Mc Graw Hill Interamericana, 2011.
- RODRÍGUEZ-MAÑAS L., ARRIBAS S., GIRON C., VILLAMAR J., SANCHEZ-FERRER C.F., MARIN J. Interferente of glucosylated human hemoglobin with endothelium- dependent responses. *Circulation.* 1993; 88: 2111-2116.
- RODRÍGUEZ-MAÑAS L., ANGULO J., PEIRÓ C., LLERGO J.L., SÁNCHEZ-FERRER A., LÓPEZ-DORIGA P. Endotelial dysfunction and metabolic control in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Pharmacol.* 1998; 123:1495-1502.
- RODRÍGUEZ-MAÑAS L., LÓPEZ-DORIGA P., PETIDIER R., NEIRA M., SOLIS J., PAVON I., PEIRÓ C., SÁNCHEZ-FERRER C. F. (2003) Effects of glycaemic control on the vascular nitric oxide system in patients with type 1 diabetes. *J. Hypertension.* 2003; 21(6): 1137-1143.
- SAGACH V, BONDARENKO A, BAZILYUK O, KOTSURUBA A. Endothelial dysfunction: Possible mechanisms and ways of correction. *Exp Cli cardiol* 2006; 11:107-10.
- SALVEMINI F, FRANZÉ A, IERVOLINO A, FILOSA S, SALZANO S, URSINI MV. Enhanced glutathione levels and oxidoresistance mediated by increased glucose-6-phosphate dehydrogenase expression. *J Biol Chem.* 1999 Jan 29;274(5):2750-7.

SAUTER NS, SCHULTHESS FT, GALASSO R, CASTELLANI LW, MAEDLER K. The anti-inflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist protects from high-fat diet-induced hyperglycemia. *Endocrinology* 2008; 149:2208-2218.

SHARMA K, JIN Y, GUO J, ZIYADEH FN. Neutralization of TGF-beta by anti-TGF beta antibody attenuates kidney hypertrophy and the enhanced extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. *Diabetes* 1996; 45:522-530.

SCIVITTARO V, GANZ MB, WEISS MF. AGEs induce oxidative stress and activate protein kinase C-beta (II) in neonatal mesangial cells. *Am J Physiol* 2000; 278: F676-F683.

SHIMOKAWA H, FLAVAHAN NA, VANHOUTTE PM. Loss of endothelial pertussis toxin-sensitive G protein function in atherosclerotic porcine coronary arteries. *Circulation* 1991; 83:652-660.

SINGH R, BARDEN A, MORI T, BEILIN L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 2001; 44:129-146.

SORESCU D, WEISS D, LASSEGUE B, CLEMPUS RE, SZOCS K, SORESCU D. Superoxide production and expression of NOX family proteins in human atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105:1429-35.

SPIEKERMANN S, LANDMESSER U, DIKALOV S, BREDT M, GAMEZ G, TATGE H, REEPSCHLÄGER N, HORNING B, DREXLER H, HARRISON DG. Electron spin resonance characterization of vascular xanthine and NAD(P)H oxidase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation* 2003; 107:1383-1389.

SPITALER M.M., GRAIER W.F. Vascular targets of redox signalling in diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2002; 45:476- 494

STANTON RC. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *Life* 2012; 64(5): 362-369.

STRATTON I. M., ALDER A. I., NEIL H. A. W., MATTHEWS D. R., MANLEY S. E., CULL C. A., HADDEN D., TURNER R. C., HOLMAN R. R. ON BEHALF OF THE UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *Br. Med. J.* 2000; 321: 405-412.

SUDANO I, SPIEKER LE, HERMANN F, FLAMMER A, CORTI R, NOLL G, LUSCHER TF. Protection of endothelial function: targets for nutritional and pharmacological interventions. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006; 47:S136-150.

SUBRAMANI J, MARCUS LEO MD, KATHIRVEL K, ARUNADEYJ R, SING TU, PRAKASH VR,

- MISHRA SK. Essential role of nitric oxide in sepsis-induced impairment of endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation in rat pulmonary artery. *Eur Journal of Pharmacol* 2010; 630: 84-91
- TAN K. C., CHOW W. S., TAM S., BUCALA R., BETTERIDGE J. Association between acute-phase reactants and advanced glycation end products in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2004; 27(1): 223-228.
- TANNOUS M., RABINO R.A., VIGNINI A., MORETTI N., FUMELLI P., ZIELINSKI B., MAZZANTI L., MURUS B. Evidence for iNOS-dependent peroxynitrite production in diabetic platelets. *Circ Res*. 1999; 42: 539-544.
- TAYLOR P.D., POSTON L. The effect of hyperglycaemia on function of rat isolated mesenteric resistance artery. *Br J. Pharmacol*. 1994; 113: 801-808.
- THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP. The Effect of Intensive Diabetes Therapy on the Development and Progression of Neuropathy. *Ann. Intern. Med*. 1995; 122: 561-568.
- THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATION TRIAL RESEARCH GROUP. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. Med*. 1993; 329: 977-986.
- THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 2003; 26: 3160-3167.
- TONG P. C., LEE K. F., SO W. Y., NG M. H., CHAN W. B., LO M. K., CHAN N. N., CHAN J. C. White blood cell count is associated with macro- and microvascular complications in Chinese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2004; 27(1): 216-222.
- TOUYZ RM. Reactive oxygen species and angiotensin II signalling in vascular cells-implications in cardiovascular disease. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2004; 37:1263-1273.
- VAN DER LOO B, LABUGGER R, SKEPPER JN, BACHSCHMID M, KILO J, POWELL JM, PALACIOS-CALLENDER M, ERUSALIMSKY JD, QUASCHNING T, MALINSKI T, GYGI D, ULLRICH V, LÜSCHER TF. Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *J Exp Med* 2000; 192:1731-1744.

- TSAI KJ, HUNG IJ, CHOW CK, STERN A, CHAO SS, CHIU DT. Impaired production of nitric oxide, superoxide, and hydrogen peroxide in glucose 6-phosphate-dehydrogenase-deficient granulocytes. *FEBS Lett.* 1998 Oct 9;436(3):411-4.
- VALLEJO S., ANGULO J, PEIRO C., NEVADO J., SANCHEZ-FERRER A., PETIDIER R., SANCHEZ-FERRER C.F., RODRIGUEZ-MAÑAS L. Highly glycated oxyhaemoglobin impairs nitric oxide relaxations in human mesenteric microvessels. *Diabetología.* 2000; 43: 83-90.
- VILLAR IC, FRANCIS S, WEBB A, HOBBS AJ, AHLUWALIA A. Novel aspects endothelium-dependent regulation of vascular tone. *Kidney Int* 2006; 70:840-53.
- WASSMANN S, WASSMANN K, NICKENING G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme and function in vascular cells. *Hypertension* 2004; 44:381-386.
- WILLIAMS S. B., GOLDFINE A.B., TIMIMI F.K., TIING H.H., RODDY M.A., SIMONSON D.C., CREAGER M.A. Acute Hyperglycemia Attenuates Endothelium-Dependent Vasodilation in Humans In Vivo. *Circulation.* 1998; 97: 1695-1701.
- WOLF G, WENZEL UO. Angiotensin II and cell cycle regulation. *Hypertension* 2004; 43:693-698.
- WOODMAN OL, WONGSAWATKUL O, SOBERY CG. Contribution of nitric oxide, cyclic GMP and K⁺ channels to acetylcholine-induced dilatation of rat conductance and resistance arteries. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000; 27:34-40.
- XIA X.D, XU Z.J., HU X.G., WU C.Y., DAI Y.R., YANG L. Impaired iNOS-sGC-cGMP signalling contributes to chronic hypoxic and hypercapnic pulmonary hypertension in rat. *Cell Biochem Funct.* 2012; (in press).
- YETIK-ANACAK G, CATRAVAS JD. Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease. *Vascul Pharmacol* 2006; 45:268-273.
- ZHANG D, GUTTERMAN D. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 292:H2023-H2031.
- ZOU MH. Peroxynitrite and protein tyrosine nitration of prostacyclin synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2007; 82:119127.