

Endotelina-1, óxido nítrico y factor von Willebrand en pacientes hipertensos diabéticos tipo 2

► Susana María Ouviaña^{1*/**}; Luis Palmer^{2**}; Beatriz Sasseti^{1*}

1. Doctora en Ciencias Químicas, UBA.
2. Médico, UBA.

* Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina

** Hospital Churrucá-Visca, Buenos Aires, Argentina.

Resumen

La disfunción endotelial se ha definido como un desbalance entre factores vasorrelajantes y vasoconstrictores y se la ha implicado en la fisiopatología de varios desórdenes cardiovasculares, hipertensión y diabetes. Se evaluaron los niveles plasmáticos de endotelina-1, óxido nítrico (NO), factor von Willebrand (FvW), hemoglobina glicosilada, glucemia, insulinemia (I), fibrinógeno, perfil lipídico y tensión arterial en 30 pacientes hipertensos diabéticos tipo 2 y 25 controles sanos comparables en edad, sexo, índice de masa corporal y hábitos alimentarios y de fumar, con el fin de estudiar la relación entre estas variables en la diabetes tipo 2. Se encontraron elevados los niveles plasmáticos de endotelina-1, óxido nítrico, factor von Willebrand y fibrinógeno en los pacientes respecto del grupo control ($p < 0,05$). Dentro del grupo de pacientes se halló una correlación directa y significativa entre NO e I ($p < 0,05$) y entre NO y FvW ($p < 0,05$). Los resultados obtenidos sugieren que el estado protrombótico en estos pacientes estaría determinado por la menor biodisponibilidad de óxido nítrico, los niveles aumentados de endotelina-1 y el estado inflamatorio y de daño endotelial reflejados por los altos niveles de fibrinógeno y de factor von Willebrand asociados a la dislipemia y al estado de insulino-resistencia.

Palabras clave: endotelina-1 * óxido nítrico * factor von Willebrand * disfunción endotelial * diabetes tipo 2.

Summary

ENDOTHELIN-1, NITRIC OXIDE AND von WILLEBRAND FACTOR IN HYPERTENSIVE TYPE 2 DIABETIC PATIENTS

Endothelial dysfunction has been defined as an imbalance between relaxing and contracting factors and has been implicated in the pathophysiology of several cardiovascular disorders, hypertension and diabetes. Plasmatic levels of endothelin-1, nitric oxide, von Willebrand factor, fibrinogen, glycated haemoglobin, glycaemia, Insulinaemia, lipid profile and blood pressure in 30 hypertensive and type II diabetic patients and 25 healthy subjects matched in age, sex, body mass index and smoking and dietary habits, were evaluated in order to study the relationship among these variables in the diabetic prothrombotic state. Endothelin-1, nitric

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

oxide, von Willebrand factor and fibrinogen levels were higher in patients than in controls ($p < 0.05$). There was a significant positive correlation between nitric oxide and insulinemia ($p < 0.05$) and between nitric oxide and von Willebrand factor ($p < 0.05$) in the group of patients. These data suggest that the prothrombotic state in these patients could be determined by the increased levels of endothelin-1, the high but less bioavailable nitric oxide values, the endothelial damage and inflammatory state reflected by high von Willebrand factor and fibrinogen levels associated with dyslipidemia and the insulin-resistance state.

Key words: *endothelin-1 * nitric oxide * von Willebrand factor * endothelial dysfunction * type 2 diabetes.*

Introducción

Las células endoteliales liberan factores relajantes y constrictores que modulan el tono del músculo liso vascular. Bajo condiciones fisiológicas hay una liberación balanceada de estos factores (1) (2).

La disfunción endotelial se ha definido como un desbalance entre los factores relajantes y constrictores y se la ha implicado en la fisiopatología de varios desórdenes cardiovasculares, hipertensión y diabetes (3-5).

La endotelina (ET) es el vasoconstrictor endógeno más potente conocido a la fecha y tiene una acción fisiológica prolongada. Existe una familia de tres iso péptidos similares de endotelina-1 (ET-1, -2 y -3), cada uno codificado por genes distintos en los cromosomas 6, 1 y 20, respectivamente (6). La ET-1 es producida en las células endoteliales y en las células musculares lisas vasculares. La ET-2 es producida predominantemente en el riñón y en el intestino (7). La secreción de ET-1 ocurre en minutos luego de la exposición a estímulos inductores tales como catecolaminas, angiotensina II, glucocorticoides, citoquinas, radicales libres, *shear stress* e hipoxia. Las células vasculares pueden así, rápidamente, ajustar la producción de ET para regular el tono vascular (8) (9).

El óxido nítrico (NO), un potente vasodilatador endógeno, es sintetizado por la oxidación del grupo guanidino del aminoácido L-arginina a L-citrulina y NO. Esta reacción es catalizada por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) (10). Hay tres isoformas de esta enzima: neuronal (nNOS), inducible (iNOS) y endotelial (eNOS). Las isoformas neuronal y endotelial de la NOS son constitutivas y su actividad depende de la cantidad de calcio-calmodulina presente en la célula; eNOS puede ser activada por el *shear stress*, acetilcolina, bradiquinina, histamina, trombina, ADP y ATP. La isoforma iNOS es inducible por lipopolisacáridos y citoquinas proinflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral α (TNF α); los macrófagos en reposo no contienen la enzima, pero la activación de estas células resulta en la aparición irreversible de iNOS (11).

El NO inhibe la agregación plaquetaria, la proliferación de las células musculares lisas, la adhesión de monocitos y la expresión de moléculas de adhesión (12). Se ha descrito una biodisponibilidad reducida de NO en la enfermedad vascular, la hipertensión y la diabetes (13) (14). Niveles elevados de metilargininas se han detectado en el plasma de pacientes con hipercolesterolemia, hipertensión, microangiopatía trombótica, etc. La acumulación de metilarginina endógena sería subyacente a la generación alterada de NO y a la producción aumentada de radicales superóxido (15).

El factor von Willebrand (vWf), una glicoproteína multimérica es sintetizada por las células endoteliales y los megacariocitos, interviene en la adhesión plaquetaria al subendotelio y los niveles plasmáticos de esta proteína han sido relacionados a disfunción endotelial en varios desórdenes vasculares (16) (17).

Se evaluaron los niveles plasmáticos de ET-1, NO, vWf, insulina (I), hemoglobina glicosilada (HbA1c), glucemia (Gl), colesterol total (Ct), HDL y LDL, triglicéridos (Tg), fibrinógeno (Fib) y la presión arterial en 30 pacientes hipertensos diabéticos tipo 2 y en 25 individuos sanos comparables en edad, sexo, índice de masa corporal y hábitos de fumar y alimentarios, con el objetivo de estudiar la relación entre estas variables en el estado protrombótico diabético.

Materiales y Métodos

PACIENTES

Se obtuvo el consentimiento escrito de los pacientes intervinientes en este estudio.

Se evaluaron 30 pacientes hipertensos (estadios I y II, JNC VI) (18) y diabéticos tipo 2 de $64,9 \pm 1,7$ años, 53% de sexo masculino bajo tratamiento con hipoglucemiantes orales y calcio-antagonistas o diuréticos y 25 controles sanos de $59,1 \pm 2,0$ años, 51% de sexo masculino, comparables en índice de masa corporal y hábitos alimentarios y de fumar. Los criterios de exclu-

sión fueron: velocidad de eritrosedimentación mayor de 20 mm/h, evidencia serológica de hepatitis o infección por HIV, enfermedad aguda o crónica hepática o renal, enfermedades malignas o del tejido conectivo.

Los hemogramas y pruebas basales de coagulación se encontraban dentro de los rangos normales.

MÉTODOS

Se obtuvieron muestras sanguíneas de los pacientes y controles luego de 10 horas de ayuno. La Gl se midió en un analizador Vita Lab Selectra (Merck, Frankfurt, Alemania), la HbA1c por Glycated Haemoglobin Reagent Pack y la I por Insulinemia Reagent Pack (IMX System, ABBOTT Diagnostic, Pennsylvania, USA). Los niveles plasmáticos de vWf fueron determinados por ELISA (Asserachrom vWf, Diagnostica Stago, Asnières, Francia). El Ct, HDL y Tg fueron determinados enzimáticamente (autoanalizador Beckman, Allendale, NJ, USA). Se determinó la concentración de LDL por la fórmula de Friedewald, cuando el nivel de Tg fue menor de 400 mg/dL (19). Los niveles plasmáticos de creatinina se determinaron por la reacción de Jaffé y la concentración de albúmina urinaria fue medida por inmunturbidimetría. La concentración de fibrinógeno plasmático fue determinada por el método coagulométrico de Clauss. Las tensiones sistólica y diastólica (TAS y TAD) se determinaron 4 veces a intervalos de 5 min utilizando un esfigmomanómetro.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRITO/NITRATO

La concentración de NO fue medida como nitrito + nitrato por el método de Griess (20). Brevemente, 100 µL de suero fueron incubados durante 30 min a 37 °C en presencia de 0,2 U/mL de nitrato reductasa de *Aspergillus* spp. (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 50 nM de *buffer* HEPES, 5 µM FAD y 0,1 mM NADPH en un volumen total de 500 µL. Luego de la incubación, 5 µL de lactato de hidrogenasa (1.500 U/mL) y 50 µL de ácido pirúvico 100 mM se agregaron a cada tubo y se incubaron durante 10 min a 37 °C. Finalmente, 1 mL del reactivo de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de naftiletildiamina en 2,5% de ácido fosfórico) se agregó a cada tubo. Después de 10 min de incubación a temperatura ambiente, se leyó la absorbancia a 540 nm.

DETERMINACIÓN DE ENDOTELINA-1

Se determinó ET-1 con un equipo comercial de ELISA (R&D System, Abingdon, UK). Se realizó la extracción de ET-1 a partir de 1 mL de suero con 1,5 mL de solvente de extracción (acetona: 1N HCl: agua (40:1:5)) y se realizó una centrifugación durante 20 min a 2.000 x g en una centrifuga refrigerada a 2-8 °C. Se decantaron

los sobrenadantes en tubos de polipropileno y se llevaron a sequedad en un evaporador centrífugo a 37 °C. Los *pellets* fueron reconstituidos en 0,25 mL del diluyente de muestra e inmediatamente ensayados (ELISA BioReaderXL). La concentración mínima detectable fue 0,1 pg/mL.

Resultados

Las características de los pacientes y de los controles se detallan en la Tabla I.

Se encontraron los niveles de ET-1 y de NO elevados en los pacientes respecto de los controles ($p < 0,001$ y $0,05$; respectivamente) (Fig. 1) (Fig. 2). A pesar de los elevados niveles de NO hallados en los pacientes, el estado hipertensivo permanece debido a que las especies reactivas de oxígeno reducen la biodisponibilidad de éste.

Las proteínas reactantes de fase aguda vWf y Fib también estaban significativamente aumentadas ($p < 0,05$) en el grupo de pacientes, reflejando un estado inflamatorio y daño endotelial.

Tabla I. Parámetros plasmáticos de los pacientes y de los controles

	Pacientes n = 30	Controles n = 25	p
Edad (años)	64,9 ± 1,7	59,1 ± 2,0	NS
Sexo (F/M)	14/16	12/13	NS
ET-1 (pg/mL)	4,10 ± 0,04	1,10 ± 0,03	< 0,001
NO (µM)	62,6 ± 0,6	35,7 ± 0,6	< 0,05
FvW (IU/mL)	1,65 ± 0,05	1,09 ± 0,04	< 0,05
HbA1c (%)	9,8 ± 0,3	5,5 ± 0,1	< 0,05
Gl (mg/dL)	153,2 ± 0,7	96,1 ± 0,6	< 0,05
I (U/mL)	16,9 ± 0,3	8,4 ± 0,2	< 0,001
Tg (mg/dL)	148,6 ± 1,7	77,9 ± 1,0	< 0,05
Ct (mg/dL)	225,6 ± 1,5	177,3 ± 1,0	< 0,001
HDL (mg/dL)	41,8 ± 0,5	54,9 ± 0,6	< 0,05
LDL (mg/dL)	159,0 ± 1,3	114,6 ± 1,2	< 0,05
Fib (mg/dL)	368,8 ± 2,9	274,6 ± 1,8	< 0,001
TAS (mmHg)	155,3 ± 0,5	128,0 ± 0,9	< 0,05
TAD (mmHg)	95,2 ± 0,3	81,0 ± 0,1	< 0,05

Los resultados están expresados como media ± S.E.M.

Abreviaturas: ET-1: endotelina-1, NO: óxido nítrico, vWf: factor von Willebrand, HbA1c: hemoglobina glicosilada, Gl: glucemia, I: insulinemia, Tg: triglicéridos, Ct: colesterol total, HDL: lipoproteína de alta densidad, LDL: lipoproteína de baja densidad, Fg: fibrinógeno, TAS: tensión arterial sistólica, TAD: tensión arterial diastólica.

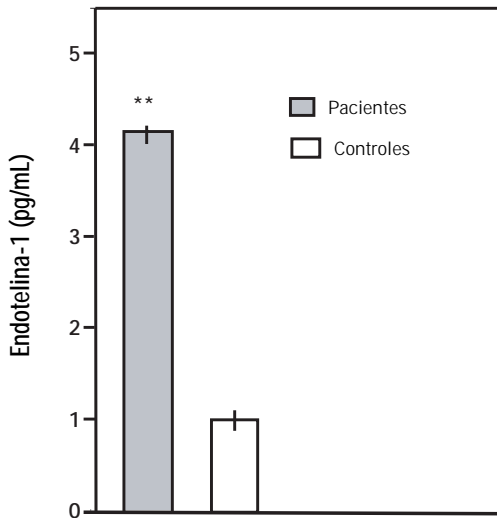


Figura 1. Endotelina-1: niveles plasmáticos de los pacientes y de los controles * * $p < 0,001$.

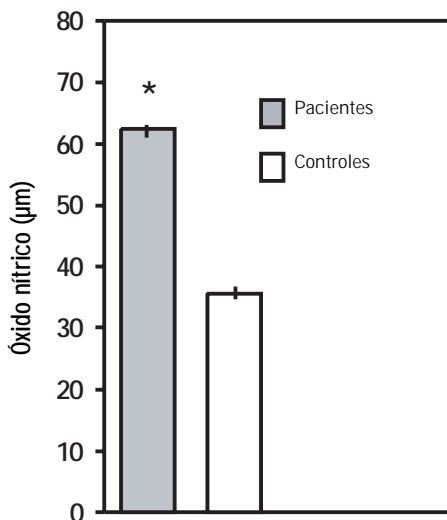


Figura 2. Óxido Nítrico: niveles plasmáticos de los pacientes y de los controles * $p < 0,05$.

Se halló el perfil lipídico alterado, con niveles elevados de Ct, Tg y LDL elevados respecto de los controles ($p < 0,001$, $0,05$ y $0,05$ respectivamente) y niveles disminuidos de HDL ($p < 0,05$).

A pesar de que todos los pacientes se encontraban bajo tratamiento farmacológico, el resto de los parámetros medidos estaban también significativamente más elevados respecto de los controles (Tabla I).

En el grupo de pacientes se observó una correlación positiva entre NO e I ($p < 0,05$) (Fig. 3), entre NO y FvW ($p < 0,05$) (Fig. 4) y entre Fib y vWf ($p < 0,05$).

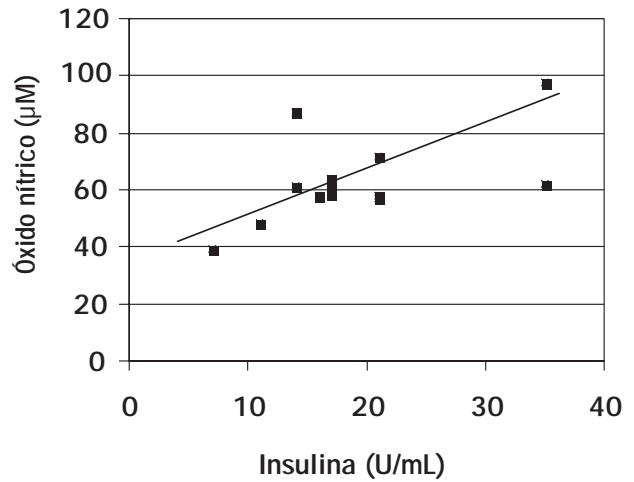


Figura 3. Correlación entre NO e I en pacientes hipertensos diabéticos tipo 2.

Coefficiente de correlación de Pearson = $0,9315$
 $R^2 = 0,8498$ $p < 0,05$

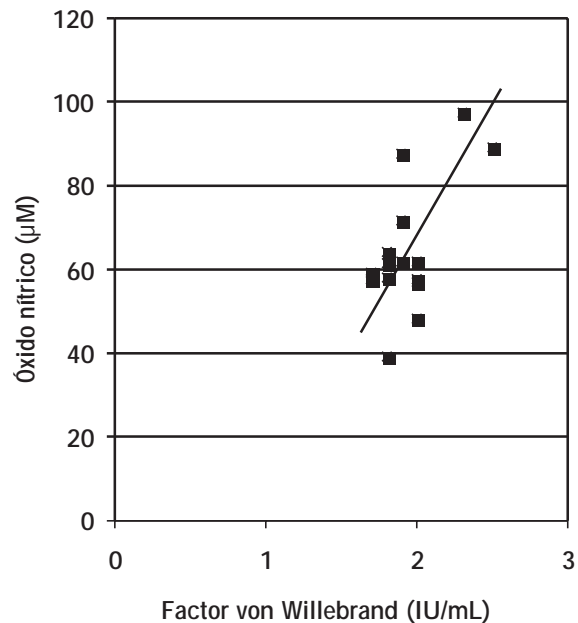


Figura 4. Correlación entre NO y vWf en pacientes hipertensos diabéticos tipo 2.

Coefficiente de correlación de Pearson = $0,8602$
 $R^2 = 0,7821$ $p < 0,05$

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media \pm E.E.M. (Error estándar medio).

Las comparaciones entre grupos se realizaron utilizando el *test* t para muestras pareadas. Se utilizó el análisis de correlación de Pearson. Las pruebas estadísticas fueron realizadas con el programa Epi Info 6.

Discusión

Varios estudios han demostrado la presencia de disfunción endotelial, caracterizada por una respuesta endotelio-dependiente alterada, en la diabetes tipo 2 (21) (22). Sin embargo, la patogénesis de la disfunción endotelial no está completamente dilucidada.

La hipertensión está caracterizada por un incremento en la resistencia vascular periférica, la cual se considera resultado de un aumento en el tono vascular de las pequeñas arterias (23).

El NO contribuye al mantenimiento de la estructura y el tono vascular en la microcirculación a través de la interacción con ET-1. La activación relativa y la potencia de estos mediadores y su interacción determina la respuesta vascular (24).

En la hipertensión, diabetes, hipercolesterolemia y aterosclerosis la disfunción endotelial está relacionada a un desbalance entre los mediadores endoteliales y su acción (25) (26). Se han observado niveles aumentados de NO en los pacientes diabéticos (Fig. 2), lo que concuerda con los resultados de los autores. En la hiperglucemia los productos de glicosilación final avanzados (AGEs) se acumulan en los tejidos en función del tiempo y de la concentración de glucosa, estimulan la liberación de citoquinas proinflamatorias y de especies reactivas del oxígeno a través de receptores específicos y modifican las proteínas intracelulares (27).

A pesar de los niveles elevados de NO encontrados en estos pacientes, el estado hipertensivo permanece debido a que la biodisponibilidad de NO estaría reducida por un mecanismo que involucraría al anión superóxido (O_2^-) en la pared vascular. La interacción de O_2^- con NO es rápida y llevaría a la inactivación parcial de NO y a la producción de peroxinitritos (28) (29). La exposición prolongada a altos niveles de glucosa aumentaría la expresión del gen de eNOS, liberación de NO y un concomitante incremento en la producción de O_2^- en cultivos de células endoteliales humanas (30). La expresión de iNOS puede ser inducida por mediadores inflamatorios como lipopolisacáridos y TNF α ; esta isoforma produciría NO en mayor cantidad que la isoforma eNOS (31).

Se ha reportado que en los pacientes diabéticos hipercolesterolémicos los elevados niveles de NO reflejarían una respuesta compensatoria a una continua inactivación de NO (32); los elevados niveles de NO encontrados concuerdan con estos hallazgos.

La hipercolesterolemia y la aterosclerosis interfieren con la formación de NO en el endotelio y con la respuesta en la célula muscular lisa vascular (33); el perfil lipídico alterado de estos pacientes contribuiría al daño endotelial.

Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la insulina estimula la producción de ET-1 en las células

endoteliales (34). En el grupo de pacientes se encontraron niveles elevados de ET-1 respecto de los sujetos normales (Fig. 1) y de I (Tabla I). En estos pacientes la hiperinsulinemia asociada a insulino-resistencia podría agravar la patología vascular al aumentar la producción y la liberación de ET-1 (35).

Las proteínas reactantes de fase aguda vWf y Fib se encontraron significativamente elevadas en los pacientes respecto de los controles ($p < 0,05$) (Tabla I), reflejando un estado proinflamatorio y daño endotelial (36).

En trabajos realizados previamente en grupos de pacientes hipertensos diabéticos tipo 2 y no diabéticos, se observó una asociación entre los niveles plasmáticos elevados de vWf con incremento en la activación plaquetaria y niveles aumentados de TNF α , respecto de los pacientes hipertensos no diabéticos y de un grupo control sano (37), sugiriendo que el estado de hiperglucemia contribuiría en mayor grado a la disfunción endotelial que la hipertensión.

En este estudio se encontró una correlación directa y significativa entre NO e I ($p < 0,05$) (Fig. 3) y entre NO y FvW ($p < 0,05$) (Fig. 4).

La disfunción endotelial que presentan estos pacientes, caracterizada por una respuesta endotelio-dependiente disminuida, aumento en la síntesis y liberación de ET-1 y el aumento en la activación plaquetaria (38) promueve un estado protrombótico. Los niveles elevados de nitritos y nitratos estarían reflejando un aumento de la producción de NO. Los mismos podrían ser una respuesta compensatoria a los altos niveles de ET-1, liberados por el endotelio y a otros factores asociados a la resistencia vascular frecuente en estos pacientes.

Los resultados encontrados sugieren que el estado protrombótico en estos pacientes podría estar determinado por los niveles elevados de ET-1, la baja biodisponibilidad de NO, el daño endotelial reflejado por los elevados niveles de FvW, y el incremento en la concentración de Fib asociados a la dislipemia y al estado de insulino-resistencia.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado, en parte, con fondos de la Universidad de Buenos Aires, Proyecto UBACYT X077.

CORRESPONDENCIA

DRA. BEATRIZ SASSETTI
Departamento de Química Biológica
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA
Ciudad Universitaria, Pab. II, Piso 4º
1428 BUENOS AIRES, Argentina
Tel/Fax: +54-11-4576-3342
E-mail: sassetti@qb.fcen.uba.ar

Referencias bibliográficas

1. Vapaatalo H, Mervaala E. Clinically important factors influencing endothelial function. *Med Sci Monit* 2001; 7 (5): 1075-85.
2. Cines DB, Polak ES, Buck CA. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998; 91: 3527-61.
3. Cosentino F, Luscher TF. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 32 Suppl 3: S54-61.
4. De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoute PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol* 2000; 130 (5): 963-74.
5. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Salvetti G, Salvetti A. Endothelial dysfunction in hypertension. *J Nephrol* 2000; 13 (3): 205-10.
6. Levin ER. Endothelins. *N Engl J Med* 1995; 333: 356-63.
7. Haynes WG, Webb DJ. The endothelin family of peptides: local hormones with diverse roles in health and disease? *Clin Sci* 1993; 84: 485-500.
8. Cowburn PJ, Cleland JGF. Endothelin antagonists for chronic heart failure: do they have a role? *Eur Heart J* 2001; 22: 1772-84.
9. Hopfner RL, Gopalakrishnan V. Endothelin: Emerging role in diabetic vascular complications. *Diabetologia* 1999; 42: 1383-94.
10. Mayer B, Hemmens B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 477-81.
11. Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 1999; 43: 521-31.
12. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 27: 2002-11.
13. Honing ML, Morrison PJ, Banga JD, Stroes ES, Rabelink TJ. Nitric oxide availability in diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 1998; 14 (3): 241-9.
14. Papapetropoulos A, Rudic RD, Sessa WC. Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 1999; 43: 509-20.
15. Masuda H, Azuma H. Biological and pathophysiological roles of endogenous methylarginines as inhibitors of nitric oxide synthase. (Abstract). *Nippon Yakurigaku Zasshi* 2002; 119: 29.
16. Lip G, Blann A. Von Willebrand factor: a marker of endothelial dysfunction in vascular disorders? *Cardiovasc Res* 1997; 34: 255-65.
17. Morise T, Takeuchi Y, Kawano M, Koni I, Takeda R. Increased plasma levels of immunoreactive endothelin and von Willebrand factor in NIDDM patients. *Diabetes Care* 1995; 18: 87-9.
18. Joint National Committee on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure. The Sixth Report of the Joint National Committee on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure (JNC VI). *Arch Intern Med* 1997; 157: 2.413-46.
19. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499-502.
20. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL. Nitrite and nitrate determination in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem* 1995; 41: 892-6.
21. Schiekofer S, Balletshofer B, Andrassy M, Bierhaus A, Nawroth P. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26: 503-12.
22. Luscher TF, Barton M. Biology of the endothelium. *Clin Cardiol* 1997; 20 (11 Suppl 2): II-3-10.
23. Puddu P, Puddu GM, Zaca F, Muscari A. Endothelial dysfunction in hypertension. *Acta Cardiol* 2000; 55 (4): 221-32.
24. Noll G, Tschudi M, Nava E, Luscher TF. Endothelium and high blood pressure. *Int J Microcirc Clin Exp* 1997; 17 (5): 273-9.
25. Kahler J, Ewert A, Weckmuller J. Oxidative stress increases endothelin-1 synthesis in human coronary artery smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 38 (1): 49-57.
26. Rossi GP, Seccia TM, Nussdorfer GG. Reciprocal regulation of endothelin-1 and nitric oxide: relevance in the physiology and pathology of the cardiovascular system. *Int Rev Cytol* 2001; 209: 241-72.
27. Brownlee M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med* 1995; 46: 223-34.
28. Price DT, Vita JA, Keaney JF Jr. Redox control of vascular nitrite oxide bioavailability. *Antioxid Redox Signal* 2000; 2 (4): 919-35.
29. Zalba G, Beaumont J, San Jose G, Fortuno A, Fortuno MA, Diez J. Vascular oxidant stress: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol Biochem* 2000; 56 (1): 57-64.
30. Cosentino F, Hishikawa K, Katusic Z, Luscher T. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation* 1997; 96 (1): 25-8.
31. Sugita H, Kaneki M, Tokunaga E. Inducible nitric oxide synthase plays a role in LPS-induced hyperglycemia and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282 (2): E386-94.
32. Parel ST, Kent KC. Risk factors and their role in the diseases of the arterial wall. *Semin Vasc Surg* 1998; 11 (3): 156-68.
33. Shimokawa H. Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31 (1): 23-37.
34. Mather K, Anderson TJ, Verma S. Insulin action in the vasculature: physiology and pathophysiology. *J Vasc Res* 2001; 38 (5): 415-22.
35. Baumgartner-Parzer SM, Waldhausl WK. The endothelium as a metabolic and endocrine organ: its relation with insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001; 109 (Suppl 2): S166-S179.
36. Blann AD. Von Willebrand factor and the endothelium in vascular disease. *Br J Biomed Sci* 1993; 50: 125-34.
37. Ouviña SM, La Greca RD, Zanaro NL, Palmer L, Sassetti B. Endothelial dysfunction, nitric oxide and platelet activation in hypertensive and diabetic type II patients. *Thromb Res* 2001; 102: 107-14.
38. Freedman JE, Loscalzo J. Endothelial dysfunction and atherothrombotic occlusive disease. *Drugs* 1997; 54 (Suppl 3): 41-9.

Aceptado para su publicación el 28 de septiembre de 2004