

Tesis de Posgrado

Disfunción endotelial en angiopatías : angiopatía diabética tipo 2

Ouviña, Susana María

2003

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Ouviña, Susana María. (2003). Disfunción endotelial en angiopatías : angiopatía diabética tipo 2. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3654_Ouvina.pdf

Cita tipo Chicago:

Ouviña, Susana María. "Disfunción endotelial en angiopatías : angiopatía diabética tipo 2". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3654_Ouvina.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN ANGIOPATIAS
Angiopatía diabética tipo 2

Autora: Lic. Susana María Ouviaña

Directora: Dra. Beatriz Sassetti

Area Análisis Biológicos
Departamento de Química Biológica
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

Tesis para optar al Título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

- 2003 -

*Dedico esta Tesis a mis queridos hijos
Alejandro, Claudia y Camila*

Uno se cree
que las mató
el tiempo y la ausencia
pero su tren
vendió boleto
de ida y vuelta.

Son aquellas pequeñas cosas
que nos dejó un tiempo de rosas
en un rincón.
en un papel
o en un cajón.

Como un ladrón
te acechan detrás
de la puerta.
Te tienen tan
a su merced
como hojas muertas
que el viento arrastra allá o aquí
que te sonríen tristes y
nos hacen que
lloremos cuando
nadie nos ve.

Aquellas pequeñas cosas.

Joan Manuel Serrat.

A mis afectos

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi gratitud a las siguientes personas:

A mi Directora de Tesis, Dra. Beatriz Sassetti, de quien aprendo día a día, por transmitirme su experiencia y su interés por la investigación científica en el campo de la Hematología y la Hemostasia, por enseñarme a emprender proyectos científicos con criterio y dedicación, por su crítica siempre constructiva y por guiarme en esta importante etapa de mi vida.

A la Dra. Irene Quintana, por su edificante crítica que significó un verdadero aporte para esta Tesis.

A la Dra. Lucía Kordich, por enseñarme Hemostasia, tema que es mi trabajo de todos los días.

A la Dra. Verónica Micciullo, de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires, por su asesoramiento en la evaluación de los cortes histológicos de ratones Balb/c.

A Daniel, por su ayuda y apoyo incondicional para la realización de esta Tesis.

Agradezco muy especialmente la colaboración del Servicio de Hematología del Hospital Churruca Visca.

RESUMEN

La Diabetes Mellitus es un trastorno sistémico con alteraciones del metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos y proteínas. La forma clínica predominante es la diabetes tipo 2 o no-insulino dependiente, siendo la enfermedad cardiovascular, la principal causa de muerte en estos pacientes.

El desarrollo de la diabetes está precedido por un período de resistencia a la insulina y de hiperinsulinemia. La incidencia de hipertensión arterial y el *stress oxidativo* están aumentados en los pacientes diabéticos y asociados a alteraciones vasculares.

Se evaluó la disfunción endotelial en la diabetes tipo 2 mediante diferentes estudios clínicos en pacientes y se realizaron estudios experimentales con células endoteliales humanas, ratones y macrófagos. Se propusieron como objetivos:

- Determinar la presencia de activación plaquetaria y la expresión de proteínas adhesivas.
- Evaluar el metabolismo del óxido nítrico y la expresión de NOS.
- Estudiar la liberación de citoquinas y FvW.
- Determinar los niveles plasmáticos de ET-1 en los pacientes diabéticos y su interacción con el NO.
- Relación entre los niveles plasmáticos de insulina, PAI-1 y Péptido C.
- Evaluación de la función endotelial a través de la medición de la respuesta vasodilatadora a la isquemia hiperémica.
- Seguimiento secuencial de los parámetros metabólicos, vasoactivos y marcadores de disfunción endotelial en una población de individuos hipertensos bajo tratamiento con una droga antihipertensiva y en otra población sin tratamiento farmacológico.
- Estudiar la acción de los AGEs en células endoteliales obtenidas a partir de cordón umbilical humano. Determinar la migración de las CE en presencia de AGEs. Realizar co-cultivos de células endoteliales con eritrocitos provenientes de pacientes diabéticos tipo 2.
- Determinar la respuesta en un modelo experimental animal (ratones Balb/c) expuesto a distintas concentraciones de albúmina glicosilada.
- Estudio comparativo entre macrófagos murinos y la línea celular U-937, monoblastos de origen humano, diferenciada a macrófagos.

La acción de los AGEs observada en los experimentos *in vitro* e *in vivo* reprodujo, en parte, los resultados obtenidos en los pacientes estudiados.

Los pacientes diabéticos expresaron marcadores de activación plaquetaria y presentaron alteraciones en el metabolismo del NO y su interrelación con la ET-1. Las proteínas reactantes de fase aguda tales como FvW, Fibrinógeno y PAI-1 estuvieron elevadas y asociadas a la condición de insulino-resistencia.

Las drogas antihipertensivas tipo IECA mejoraron significativamente la función endotelial, disminuyendo el riesgo de eventos trombóticos.

Palabras clave: diabetes, hipertensión arterial, disfunción endotelial, óxido nítrico, activación plaquetaria, trombosis.

SUMMARY

Diabetes Mellitus is a systemic disorder with altered carbohydrates, lipids and proteins metabolisms. The most frequent type is the non-insulin dependent diabetes or type 2 diabetes. The cardiovascular disease is the main cause of death in these patients.

A period of insulin-resistance or hyperinsulinaemia may precede the onset of diabetes. Arterial hypertension incidence and oxidative stress are increased in diabetic type 2 patients and associated to vascular alterations.

Endothelial dysfunction was evaluated through different kind of clinical studies in patients. Experiments were also performed in human endothelial cells, mice and macrophages. The objectives of this Thesis were:

- To evaluate the platelet activation and the adhesive proteins expression.
- To analyse the nitric oxide metabolism and nitric oxide synthases expression.
- To study the cytokines and von Willebrand Factor release.
- To analyse the relationship among insulin, PAI-1 and C Peptide plasmatic levels.
- To evaluate the endothelial function by the measure of the vasodilator response to the hyperemic ischemia.
- Time followed metabolic and vasoactive parameters and endothelial dysfunction markers in a hypertensive patients group under anti-hypertensive drug treatment and in another hypertensive patients group without pharmacologic treatment.
- To study AGEs action on the endothelial cells obtained from human umbilical cord and on their migration. To evaluate the endothelial cells and red blood cells from diabetic type 2 patients co-culture.
- To propose the response of an experimental animal model (Balb/c mice) at different concentration of glycated albumin.
- To compare murine macrophages and human monoblastic cellular line U-937, differentiated to macrophage.

The results obtained from the clinical studies were reproduced at least in part, for *in vivo* and *in vitro* experiments done under the action of AGEs.

Platelet activation markers were expressed in diabetic and they also showed NO metabolism and an altered relationship with ET-1.

Plasmatic levels of acute reactant phase proteins such as von Willebrand Factor, Fibrinogen and PAI-1 were increased and associated with the insulin-resistance condition.

Anti-hypertensive drugs such as angiotensin-converting enzyme inhibitor significantly improved the endothelial function and in consequence, may decrease the thrombotic events risk.

Key words: type 2 diabetes, arterial hypertension, endothelial dysfunction, nitric oxide, platelet activation, thrombosis.

Abreviaturas

ABREVIATURAS

Ach: Acetil colina

ADP: Difosfato de adenosina

AGEs: *Advanced glycation end products*, productos finales de glicosilación avanzada

AMP_c: Monofosfato de adenosina cíclico

AT: Antitrombina III

AT II: Angiotensina II

ATP: Trifosfato de adenosina

BH₄: Tetrahidrobiopterina

CD62P: P-Selectina

CD63: Glicoproteína 53

CE: Célula/s endotelial/es

CMLV: Célula/s muscular/es lisa/s vascular/es

DBT 2: Diabetes tipo 2

ECA: Enzima convertidora de la Angiotensina

ECE: Enzima convertidora de la Endotelina

EDHF: Factor hiperpolarizante derivado de endotelio

EDRF: Factor de relajación derivado de endotelio

EGF: Factor de crecimiento epidermal

eNOS, NOS III: Óxido nítrico sintetasa endotelial

ET-1: Endotelina 1

ET-2: Endotelina 2

ET-3: Endotelina 3

ET_A:Receptor tipo A de Endotelina-1

ET_B: Receptor tipo B de Endotelina-1

FAD: Dinucleótido de flavina-adenina

FAU: Sistema de filamentos de actina relacionados con la unión

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico

FMN: Mononucleótido de flavina

FvW: Factor von Willebrand

GC: Guanilato ciclasa

GMP: Monofosfato de guanidina

GMP_c: Monofosfato de guanidina cíclico

GMP 140: *Granule membrane protein 140*, proteína de membrana de gránulo α plaquetario de 140 kDa

GP Ib-IX: Glicoproteína Ib-IX

GP IIbIIIa: Glicoproteína IIbIIIa

GP 53: Glicoproteína 53

HbA1c: Hemoglobina glicosilada

Hcy: Homocisteína

HTA: Hipertensión arterial

IECA: Inhibidor de la enzima convertidora de la Angiotensina

IL-1: Interleuquina 1

IMC: Índice de masa corporal

iNOS, NOS II: Óxido nítrico sintetasa inducible

ICAM-1: *Intercellular adhesion molecule 1*; molécula de adhesión intercelular 1

NADH: Dinucleótido de nicotinamida-adenosina

NADPH: Dinucleótido monofosfato de nicotinamida-adenosina

nNOS, NOS I: Óxido nítrico sintetasa neuronal

NO: Óxido nítrico

O₂⁻: Anión superóxido

ONOO⁻: Anión peroxinitrito

PADGEM: *Platelet activation dependent granule external membrane protein*, proteína de membrana de gránulo α plaquetario dependiente de activación plaquetaria.

PAF: Factor activante plaquetario

PAI-1: Inhibidor del activador tisular del plasminógeno

PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas

PGI₂: Prostaciclina

PKC: Proteín quinasa C

P-Sel: P-Selectina

PSGL-1: *P-Selectin glycoprotein ligand-1*, glicoproteína ligando-1 de P-Selectina

RAGE: Receptor de los productos finales de glicosilación avanzada

SOD: Superóxido dismutasa

sP-Sel: P-Selectina soluble

TG: Triglicéridos

TGFβ:Factor de crecimiento transformador β

VCAM-1: *Vascular cellular adhesión molecule 1*; molécula de adhesión celular 1

TM: Trombomodulina

TNF α: Factor de necrosis tumoral α

t-PA: Activador tisular del plasminógeno

TXA₂: Tromboxano A₂

WP: Cuerpos de Weibel-Palade de célula endotelial

Indice

INDICE	<i>página</i>
Introducción	
1. Estructura y función de los vasos sanguíneos	1
1.1 Pared vascular	3
1.1.1 Estructura del endotelio: célula endotelial	6
1.1.2 Funciones del endotelio	9
1.2 Oxido nítrico	12
1.3 Endotelinas	21
1.4 Factor von Willebrand	23
1.5 P-Selectina	24
1.6 GP 53	29
1.7 PAI-1	29
1.7.1 Acción de la insulina sobre la síntesis de PAI-1	32
2 Diabetes Mellitus	33
2.1 Insulino-resistencia en la Diabetes Tipo 2	35
2.2 Hiperglucemia	36
2.3 Hipertensión en Diabetes	40
2.4 Obesidad	40
2.5 Microalbuminuria	41
2.6 Dislipemia	41
2.7 Alteraciones de la coagulación y de la fibrinólisis	42
2.7.1 Factor VII	42
2.7.2 Factor von Willebrand	42
2.7.3 Fibrinógeno	42
2.7.4 Inhibidores fisiológicos de la coagulación	42
2.7.5 Plaquetas	43
2.7.6 Fibrinólisis	43
2.7.7 Homocisteína	43
2.7.8 Citoquinas	44
3 Disfunción endotelial	45
3.1 Disfunción endotelial en la Diabetes Tipo 2	45
3.2 Disfunción endotelial en Hipertensión arterial	46
4 Evaluación de la función endotelial	53

4.1 Métodos invasivos	53
4.2 Métodos no invasivos	54
Objetivos	58
Pacientes, Materiales y Métodos	
Muestras	59
Estudios Clínicos	
1. Determinación de activación plaquetaria en pacientes diabéticos tipo 2	59
1.1 Población estudiada	59
1.2 Determinación de activación plaquetaria	60
1.2.1 Determinación de la expresión de P-Selectina y GP 53 en membrana plaquetaria por inmunofluorescencia indirecta (IFI) mediante microscopía UV y citometría de flujo	60
1.2.1.1 P-Selectina	60
1.2.1.2 GP 53	64
1.2.2 Hemoglobina glicosilada	64
1.2.3 Glucosa	64
1.2.4 Hemogramas	64
1.2.5 TP y TTPA	64
2. Determinación de los niveles de óxido nítrico y de activación plaquetaria en una población de pacientes hipertensos diabéticos tipo 2	65
2.1. Determinación de P-Selectina soluble	65
2.2. Determinación de óxido nítrico	66
2.2.3. Desproteinización de los plasmas	66
2.2.4. Reducción a nitrito	67
2.2.5. Determinación de la concentración de nitritos	67
2.3 Determinación del Factor von Willebrand	67
2.4. Factor de necrosis tumoral α	67
2.5. Determinación de los niveles plasmáticos de Insulina y de Hemoglobina glicosilada	67
2.6. Determinación del nivel plasmático de glucosa	68
2.7. Determinación del nivel plasmático de Fibrinógeno	68
3. Estudio de la relación entre los niveles plasmáticos de Endotelina-1, óxido nítrico y Factor von Willebrand en una población de pacientes hipertensos diabéticos tipo 2	69

3.2. Determinación de Endotelina-1	69
3.3. Colesterol total, HDL colesterol, Urea y Creatinina	70
3.4. LDL colesterol	70
3.5. Proteína C reactiva	70
3.6. Homocisteína y Péptido C	70
4. Relación entre los niveles plasmáticos de PAI-1, óxido nítrico, insulina y Péptido C	71
5. Evaluación de la función endotelial por eco-Doppler pre y post tratamiento con una droga antihipertensiva	72
5.1 Evaluación pre-tratamiento de los pacientes y de los controles.	73
5.2 Tratamiento farmacológico antihipertensivo.	73
5.3 Evaluación post-tratamiento.	73
5.3.1 Cálculo del porcentaje de variación del diámetro arterial pre y post tratamiento	74
6. Efecto de dos drogas antihipertensivas de diferente mecanismo de acción.	75
6.1 Evaluación pre-tratamiento de los pacientes y controles.	76
6.1.1 Medición del diámetro arterial por eco Doppler.	76
6.1.2 Determinación de PAI-1.	76
6.2 Tratamiento farmacológico antihipertensivo.	77
6.3 Repetición de la prueba de isquemia hiperémica post-tratamiento farmacológico	77
6.3.1 Cálculo del porcentaje de variación del diámetro arterial pre y post-tratamiento	77
7. Seguimiento de un grupo de pacientes hipertensos en tratamiento con Nebivolol.	78
8. Seguimiento de un grupo de pacientes hipertensos bajo un régimen higiénico-dietético.	79
Estudios Experimentales	80
1. Cultivo de células endoteliales humanas obtenidas a partir de cordón umbilical (HUVEC).	80
1.1 Reactivos	80
1.2 Cultivo de HUVEC.	80
1.2.1 Recolección y preparación de los cordones umbilicales.	80
1.2.2 Encanulado de los cordones.	81
1.2.3 Recuperación de células endoteliales primarias.	82

1.3 Acción de AGEs y TNF α sobre las HUVEC.	83
1.3.1 Preparación de AGEs-BSA.	83
1.3.2 Control	84
1.3.3 HUVEC + agonistas.	84
1.4 Ensayos de migración de las células endoteliales (CE).	84
1.5 Caracterización inmunológica de las CE: ensayos de inmunofluorescencia.	85
2. Estudios experimentales en animales	86
2.1 Ratones.	86
2.1 Análisis histológico.	86
2.1. Cortes histológicos	87
2.1.2 Coloración con hematoxilina-eosina.	87
2.1.3 Tinción de polisacáridos (PAS).	87
2.2 Medición de parámetros plasmáticos.	88
2.2.1 Glucemia.	88
2.2.2 Insulinemia.	88
2.2.3 Hemoglobina glicosilada	88
2.2.4 Óxido nítrico	88
2.2.5 Determinación de FvW	88
2.3 Macrófagos peritoneales	88
2.3.1 Cultivo de macrófagos peritoneales	89
2.3.2 Medición de la producción de óxido nítrico	89
2.3.3 Expresión de la enzima iNOS	89
2.3.4 Dosaje de proteínas totales	90
2.3.5 Dot blot	90
2.3.6 Western blot	91
2.3.7 Inmunofluorescencia indirecta en macrófagos murinos	91
3 Línea celular U-937	92
3.1 Cultivo de las células	92
3.2 Diferenciación de las células U-937	92
3.3 Medición de la producción de óxido nítrico	93
3.4 Expresión de al enzima iNOS	93
3.5 Análisis estadístico	93
Métodos estadísticos	94
Resultados	

Estudios clínicos	96
Evaluación de los niveles plasmáticos de fibrinógeno en una población de individuos sanos y su relación con el peso, perfil lipídico, glucemia y hábito de fumar.	96
Estudios clínicos en pacientes diabéticos e hipertensos.	96
Estudio de los niveles plasmáticos del fibrinógeno en una población de individuos sanos y su relación con el peso, perfil lipídico y hábito de fumar.	97
1 Activación plaquetaria en angiopatía diabética tipo 2	100
1.1 Resultados	100
1.2 Correlaciones	101
1.3 Discusión	105
2. Disfunción endotelial, óxido nítrico y activación plaquetaria en hipertensión y diabetes tipo 2	106
2.1 Resultados	106
2.2 Correlaciones	109
2.3 Análisis estadístico	111
2.4 Discusión	111
3 Endotelina y óxido nítrico en pacientes hipertensos y diabéticos tipo 2	113
3.1 Resultados	113
3.2 Conclusiones	116
4 Relación entre los niveles plasmáticos de PAI-1, óxido nítrico, I y Péptido C	117
4.1 Resultados y discusión	117
5 Evaluación de la función endotelial por eco-Doppler	119
5.1 Discusión	119
5.2 Conclusiones	122
6. Efecto de dos drogas antihipertensivas sobre la función endotelial.	
Evaluación por eco-Doppler	123
6.1 Porcentaje de variación del diámetro de la arteria braquial en la prueba de isquemia hiperémica	123
6.2 Medición de parámetros plasmáticos asociados a disfunción endotelial: FvW y PAI-1	123
6.3 Evaluación pre-tratamiento	123
6.3.1 Medición de la variación del diámetro de la arteria braquial por eco-Doppler pre y post-isquemia	124

6.3.2 Porcentajes de variación pre y post-isquemia de los marcadores plasmáticos de disfunción endotelial	124
6.4 Reevaluación de los pacientes luego de 8 semanas	124
6.4.1 Medición de la variación del diámetro de la arteria braquial por eco-Doppler pre y post-isquemia	125
6.4.2 Porcentaje de variación pre y post-isquémica de marcadores plasmáticos de disfunción endotelial	125
6.5 Correlaciones	126
6.6 Conclusiones	126
7 Seguimiento de pacientes hipertensos bajo tratamiento con nebivolol	127
7.1 Resultados	127
8 Resultados del seguimiento de pacientes hipertensos	133
Estudios experimentales	137
1 Cultivos celulares: células endoteliales humanas HUVEC	138
1.1 Acción de AGEs y TNF α sobre HUVEC	138
1.2 Sobrenadantes de cultivos HUVEC. Electroforesis.	139
1.3 Expresión de iNOS en CE	139
1.4 Resultados de inmunofluorescencia en CE	140
1.5 Resultados y conclusiones de los ensayos de migración de CE	140
2 Animales: ratones Balb/c	142
2.1 Cortes histológicos de arterias	142
2.2 Cortes histológicos de riñones	142
2.3 Medición de parámetros séricos	144
2.4 Análisis de la inducción de iNOS en macrófagos peritoneales	145
2.4.1 Observación microscópica de extendidos de macrófagos	145
2.4.2 Medición de nitritos en sobrenadantes de cultivo de macrófagos	145
2.4.3 Expresión de la enzima iNOS	146
2.5 Discusión	147
2.5.1 Señalización intracelular en respuesta a AGEs	147
2.5.2 El modelo experimental	147
3 Análisis de la inducción de iNOS en células U-937	149
3.1 Medición de nitritos en sobrenadantes de cultivo	149
3.2 Expresión de la enzima iNOS	149
3.3 Discusión	150

Difusión de los resultados 174

Introducción

1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LOS VASOS SANGUÍNEOS

El sistema circulatorio sanguíneo está compuesto por: la circulación sistémica, la circulación pulmonar y la circulación portal¹.

En particular, la circulación sistémica envía sangre oxigenada desde una bomba central, el corazón, hacia todos los tejidos del organismo a través del sistema arterial, produciéndose el intercambio de nutrientes y productos metabólicos, regresando sangre con un alto contenido en dióxido de carbono a través del sistema venoso desde los tejidos al corazón².

Toda la sangre de la circulación sistémica sale del corazón a través de la arteria aorta, que se va dividiendo en arterias más pequeñas y luego en arteriolas, ramificándose hacia los diferentes órganos, adquiriendo características propias de estructura y función. Las arteriolas se ramifican, a su vez, en vasos muy delgados, los capilares, formando una red densa denominada microvasculatura³.

En los capilares ocurre el intercambio de gases, nutrientes y productos metabólicos⁴.

Las venas de diferentes órganos y tejidos se unen para formar dos grandes vasos: la vena cava superior (venas provenientes de cabeza y cuello) y la vena cava inferior (venas de la porción inferior del cuerpo)⁵.

En la Tabla N° 1 se comparan los diferentes tipos de vasos.

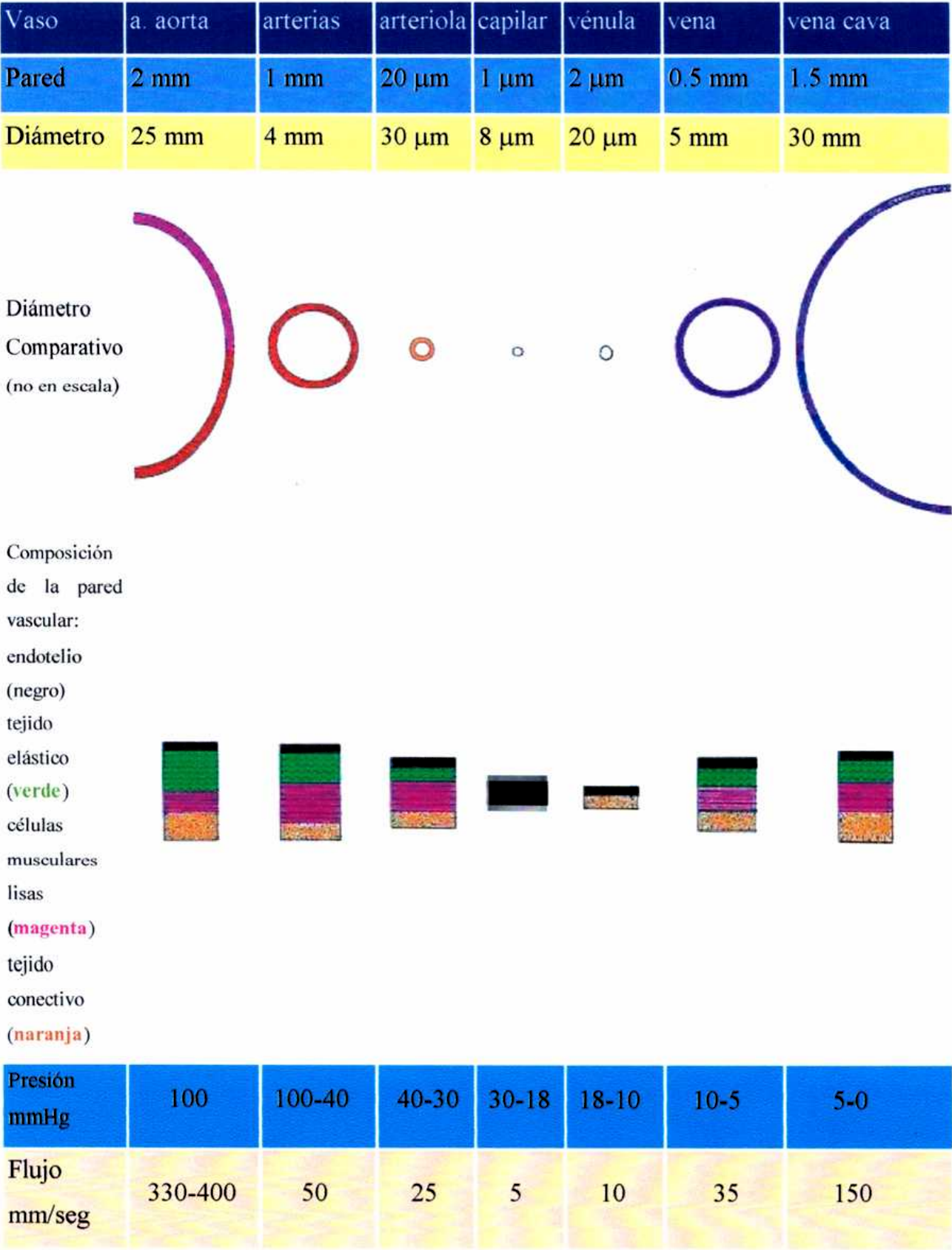


Tabla N° 1: Diámetro comparativo, Composición de la pared, Flujo y Presión de los diferentes tipos de vasos sanguíneos; a. aorta: arteria aorta; arterias: otras arterias de gran tamaño.

1.1 PARED VASCULAR

La pared vascular está compuesta por tres capas: 1) la túnica íntima, compuesta por el endotelio, 2) la túnica media, compuesta por células musculares lisas vasculares (CMLV) y una matriz de elastina, colágeno y proteoglicanos, responsable de las funciones vasomotoras y 3) la túnica adventicia, compuesta por fibroblastos y colágeno⁶ (Figura N° 1).

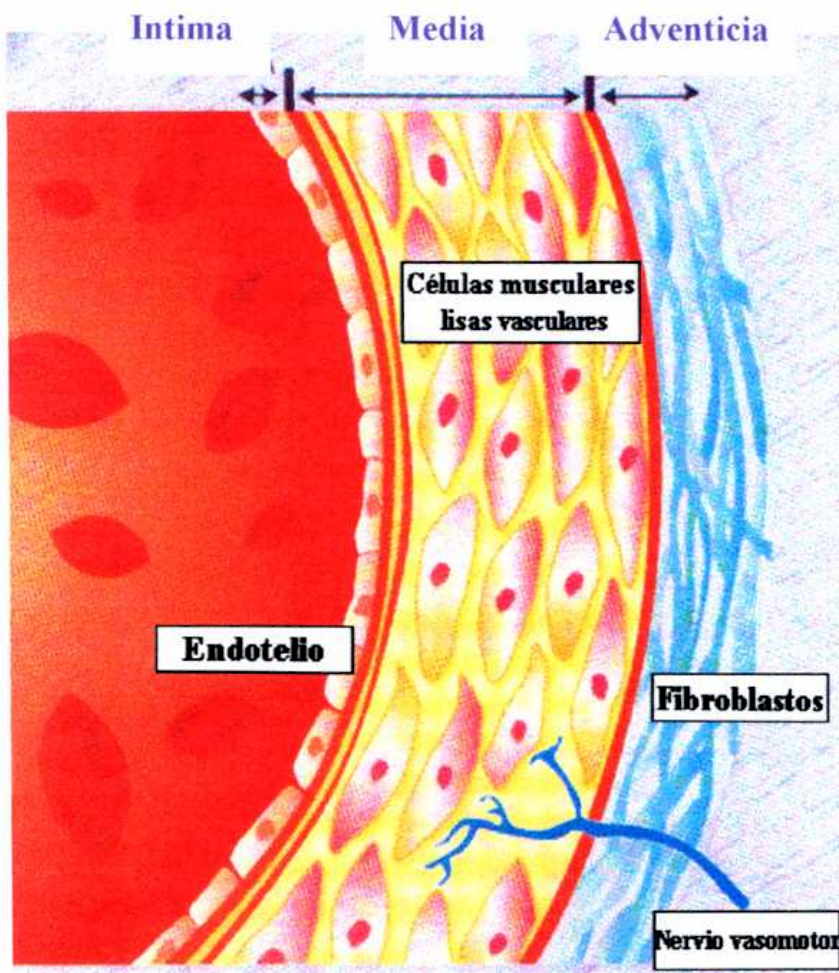


Figura N° 1: Estructura de la pared vascular.

Las paredes de venas y arterias tienen las mismas tres capas, pero son más delgadas y los componentes del músculo elástico son mucho menos prominentes en las venas. En las arterias la capa predominante es la túnica media (Figura N° 2),

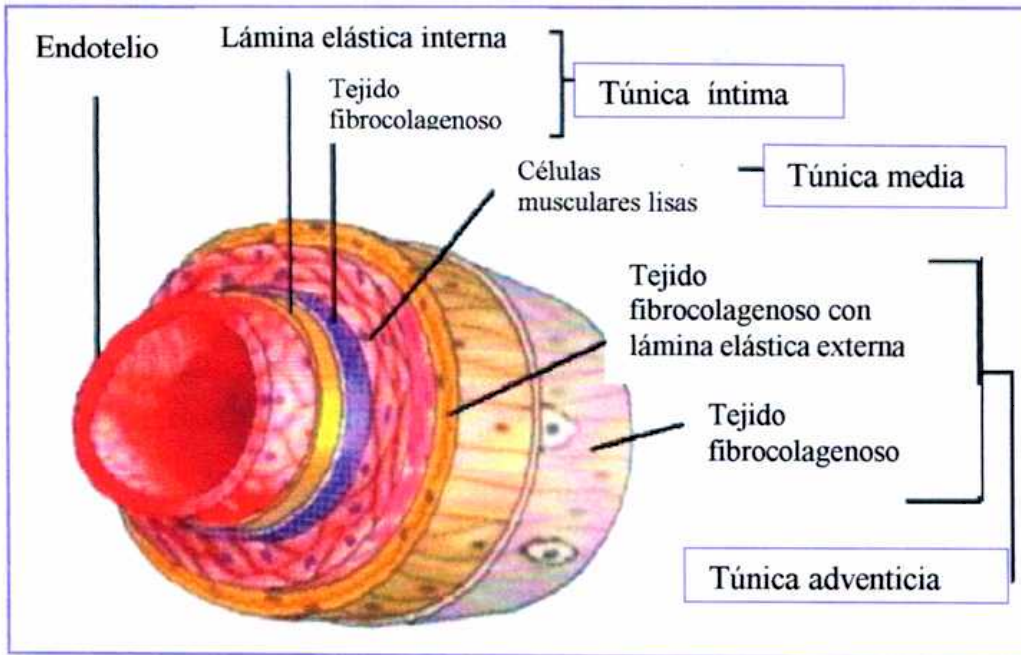


Figura N° 2: Estructura de una arteria.

es menor en arteriolas (Figura N° 3) y virtualmente no existe en vasos muy pequeños (Figura N° 4).

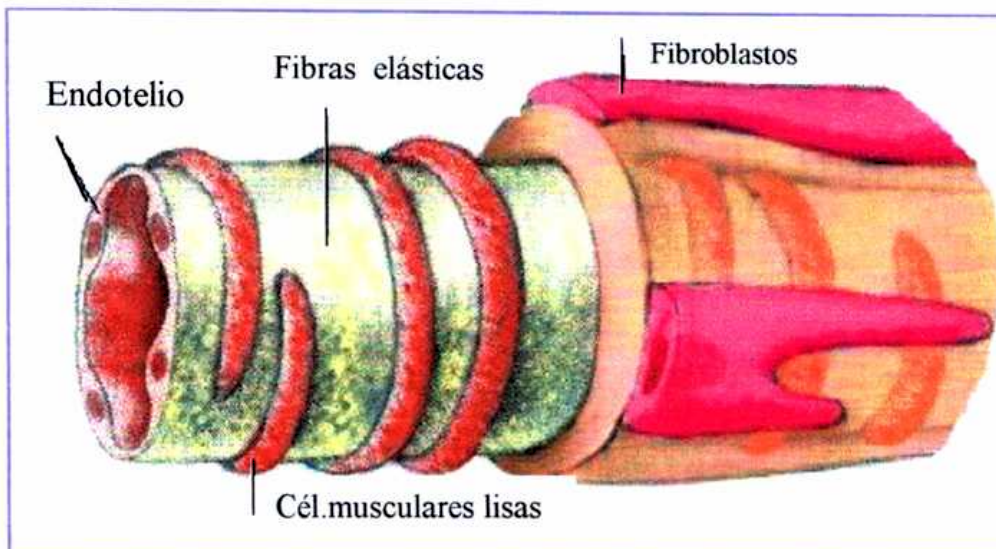


Figura N° 3: Estructura de una arteriola.

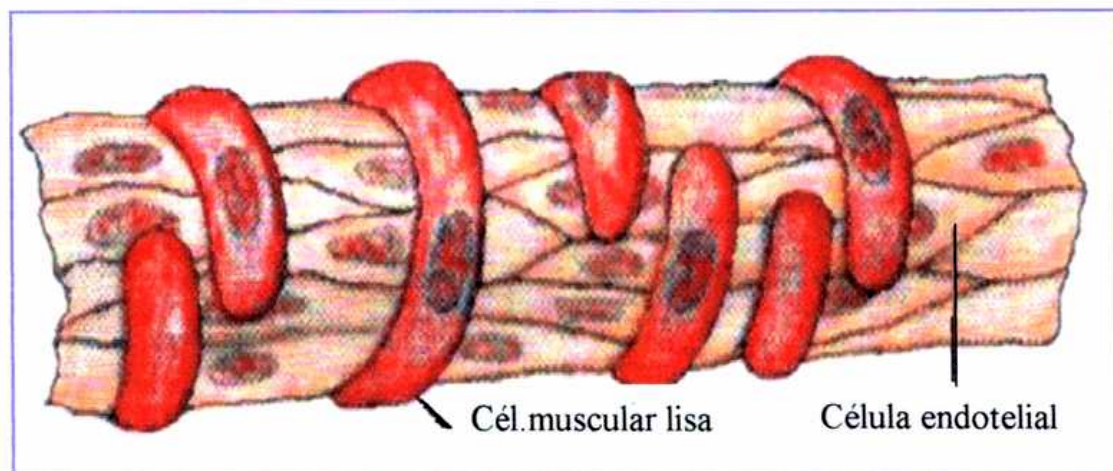


Figura N° 4: Estructura de una arteriola pequeña.

El sistema venoso actúa como un sistema colector, la sangre de la red de capilares regresa al corazón en forma pasiva, bajo un gradiente de presión. Algunas venas, especialmente en los brazos y piernas tienen válvulas que permiten el flujo de sangre en una sola dirección, hacia el corazón (Figura N° 5). La mayor parte del volumen sanguíneo, casi el 60 %, está contenido en el sistema venoso, por esta razón las venas son denominadas vasos de capacitancia⁷.

Las contracciones cardíacas bombean la sangre generando fuerzas potenciales y cinéticas, que son transmitidas como *stress* a las paredes vasculares. El músculo cardíaco se contrae generando presión (energía potencial) y flujo sanguíneo (energía cinética)⁸.

Las paredes vasculares detectan estas fuerzas como *stretch stress* (potencial) y *shear stress* (cinética). La túnica media arterial, compuesta por CMLV, detecta y responde al *stretch stress*, mientras que el endotelio lo hace al *shear stress*⁹.

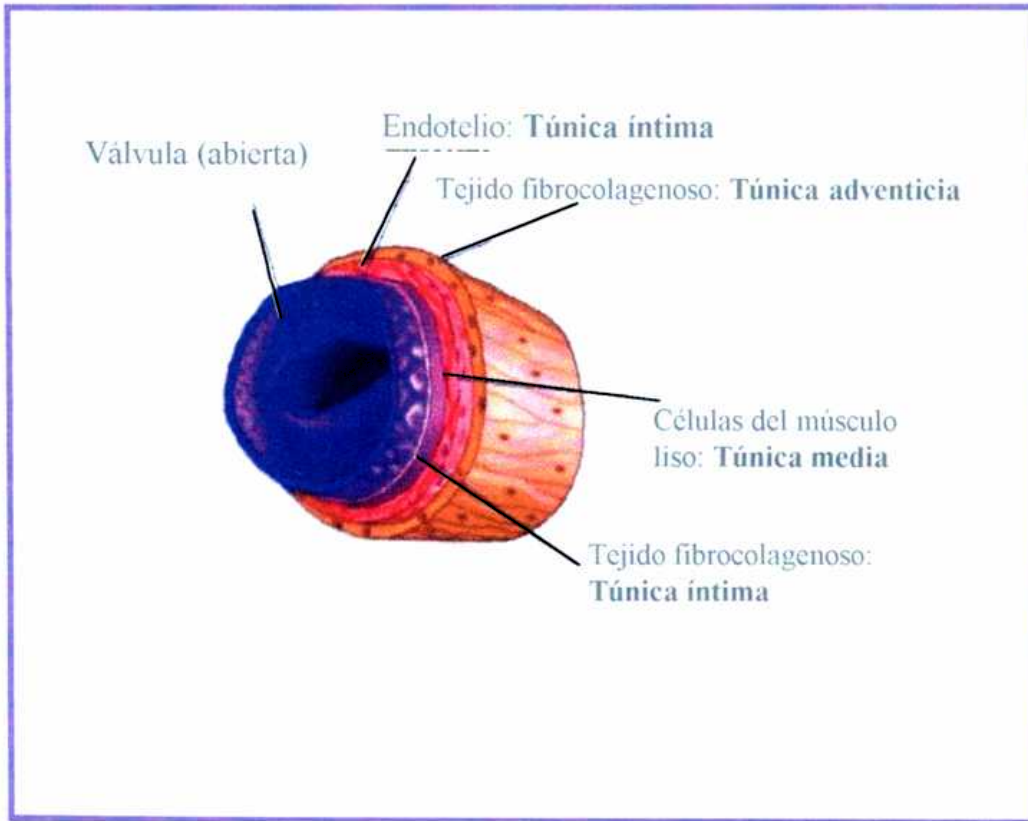


Figura N° 5: Estructura de una vena.

1.1.1 Estructura del endotelio: Célula endotelial

El endotelio es una monocapa de células, situada entre la sangre circulante y los tejidos. Responde al estímulo mecánico de la sangre que fluye, a la presión arterial y a la distensión de la pared de los vasos; reacciona al estímulo de sustancias químicas procedentes de la sangre y de los tejidos y controla el pasaje de solutos, macromoléculas y células sanguíneas¹⁰.

La capacidad para adaptarse a los cambios hemodinámicos y a condiciones tan adversas como la isquemia, hipoxia y exposición a oxidantes depende de la integridad del endotelio¹¹. Responde a la lesión con mecanismos de reparación específicos, que van desde la recuperación de zonas de denudación de la íntima a la generación de nuevos vasos sanguíneos¹².

El endotelio es mucho más que una simple barrera o transportador. Es un órgano endócrino activo. En una persona normal de 70 kg de peso, 1,8 kg corresponden al endotelio¹³ y el número de células es del orden de 10^{12} . Las células endoteliales (CE) producen sustancias fundamentales para la coagulación sanguínea, el control de la presión arterial, la función renal y el metabolismo de los lípidos y la glucosa¹⁴.

La disfunción endotelial está asociada a diversas patologías vasculares, aterosclerosis e inflamación. El conocimiento de la estructura y función del endotelio permite comprender de manera básica estos procesos¹⁵.

Las CE son células poliédricas muy especializadas, metabólicamente activas, que forman una capa continua alineada en la superficie interna de los vasos sanguíneos, denominada túnica íntima o endotelio¹⁶.

Las CE poseen componentes del aparato contráctil del músculo: actina, miosina, tropomiosina y α -actinina. Están organizadas en tres estructuras diferentes, la *membrana cortical*, el sistema de *filamentos de actina relacionados con la unión* (FAU) y las *fibras de tensión estriadas tipo miofibrillas*¹⁷ (Figura N° 6).

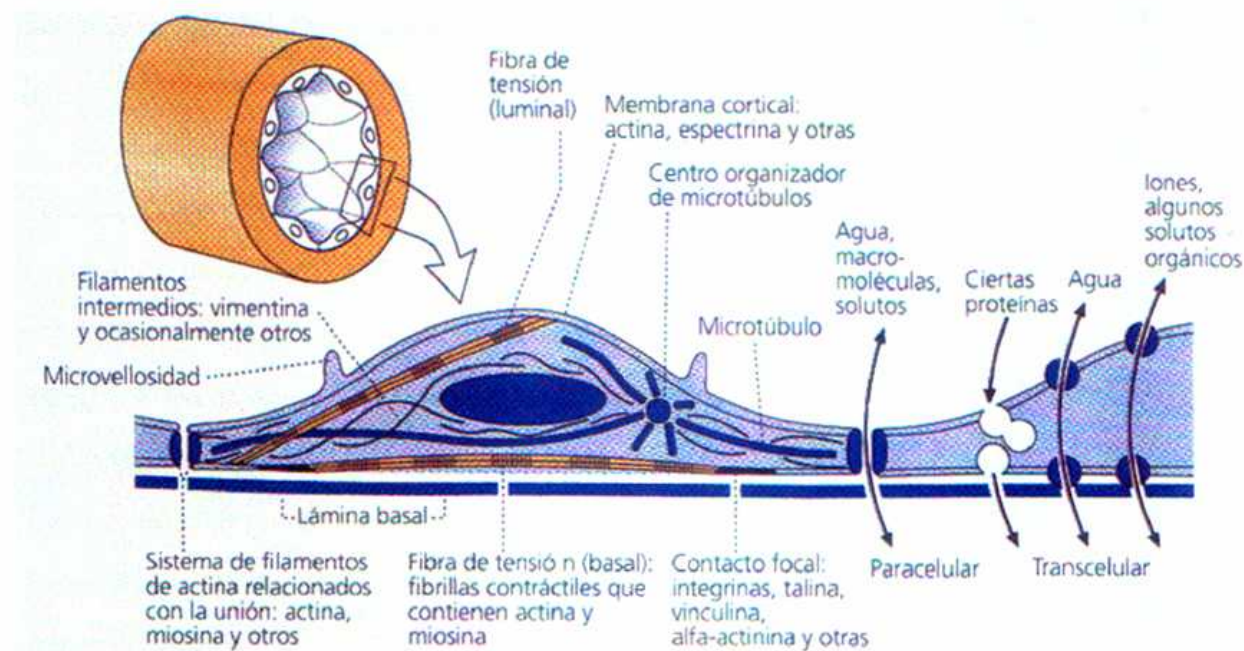


Figura N° 6: Estructura de la célula endotelial vascular.

Mediante su acción conjunta, estos tres sistemas mantienen la estructura y la remodelación de la membrana plasmática, la inmovilización de las proteínas en la membrana endotelial y la permeabilidad del endotelio a sustancias y células.

La membrana cortical es responsable de la forma normal y de la elasticidad de las células endoteliales. La rigidez de la membrana plasmática endotelial y la cortical aumenta en proporción directa a la tensión aplicada. Las CE se vuelven varias veces más rígidas cuando se exponen a la tensión de fricción ejercida por los líquidos que cuando no hay flujo, demostrando su capacidad de adaptación a las fuerzas ejercidas desde el interior de los vasos sanguíneos¹⁸.

La membrana cortical sirve de anclaje para diversas proteínas de membrana. Una de ellas, la anexina, es un complejo de ión calcio (Ca^{2+}), lípidos y proteínas, que controlaría la exocitosis y la endocitosis. Moléculas de adhesión como la E-Selectina y la VE-caderina también están relacionadas con la membrana cortical¹⁹. Las caderinas establecen enlaces entre células adyacentes, formando una estructura “tipo cierre” en las regiones de membrana donde las CE hacen contacto con otras CE²⁰ y su desconexión del FAU puede ser una causa de desorganización de las uniones. La trombina es una de las causas de dicha disociación. La fosforilación de las caderinas por la tirosina puede provocar también la desorganización de las uniones²¹.

Las sustancias no sólo atraviesan las células, sino que pasan entre ellas, un proceso que depende del sistema FAU. La contracción y la relajación de los componentes del músculo en el sistema FAU altera la relajación de las separaciones entre las células endoteliales, controlando el paso de solutos y macromoléculas entre la sangre y los tejidos. Un sistema FAU normal es esencial para la función “barrera” del endotelio²².

La pérdida del sistema FAU puede verse microscópicamente, y causa aumento de tamaño de las separaciones intercelulares y una mayor permeabilidad endotelial. Esta pérdida puede deberse a varios estímulos: trombina, citoquinas proinflamatorias, oxidantes, factor activante plaquetario, así como el agotamiento de ATP.

En condiciones normales, el sistema FAU mantiene un equilibrio entre las fuerzas de unión adherentes y las fuerzas contráctiles²³.

El AMP_c estabiliza el sistema FAU y contrarresta la inducción de separaciones intercelulares y el GMP_c que es generado por una vía que depende tanto de Ca²⁺ como del óxido nítrico (NO) también estabiliza la barrera endotelial²⁴.

Por el contrario, el sistema FAU es desmontado y la barrera endotelial es alterada por las sustancias que activan a la protein quinasa C (PKC)²⁵.

Las fibras de tensión son totalmente distintas de la membrana cortical y del sistema FAU; son muy abundantes en las CE expuestas a mayor fuerza de fricción o estiramiento de la pared ejercida por la sangre circulante. Ayudan a la CE a adaptarse a las fuerzas mecánicas del flujo de sangre y de la distensión de la pared, con lo que evitan la lesión. En presencia de Ca²⁺ y ATP las fibras de tensión del interior de CE cultivadas desarrollan tensión y cambian de forma, haciéndose más voluminosas, en lugar de aplanadas²⁶.

Los cambios morfológicos de las CE pueden retardar, e incluso impedir, el flujo de los capilares, esto se debe a la activación del FAU. Las fibras de tensión no intervienen de modo primordial en la creación de esta tensión, pero pueden estabilizar el estado de tensión adquiridos durante períodos prolongados²⁷.

La sangre circula por los capilares a pesar de que el diámetro de estos vasos es menor que el de eritrocitos y leucocitos. Esto se debe, por un lado, a que ambos tipos de células son flexibles y pueden deformarse para reducir al mínimo su diámetro transversal en relación con la dirección del flujo, y por el otro, a que el endotelio normal tiene una gran carga electrostática negativa²⁸.

En el año 1985, Born GV y Palinski W, encontraron concentraciones muy elevadas de ácido siálico en la superficie del endotelio²⁹. La eliminación del ácido siálico de la membrana de las CE utilizando neuraminidasa aumenta la resistencia al flujo sanguíneo, alterando notablemente el estado normal de la microcirculación³⁰. Las células circulantes tienen carga negativa similar al endotelio, de forma que el rechazo electrostático facilita el flujo de la sangre por los capilares. El daño o lesión del endotelio, secundario a la pérdida o disminución del ácido siálico de la superficie celular, impide la microcirculación y predispone a la trombosis³¹.

Los cavéolos son estructuras vesiculares características del endotelio³², son ricos en lípidos, receptores y proteínas como la actina y la PKC, y funcionan como

transportadores o canales de muchas moléculas distintas, como colesterol, ácidos grasos, Ca^{2+} , tanto a través de las células como dentro de ellas³³. Pueden ser reservorios de receptores internalizados, de los que la CE puede disponer cuando es necesario, y participan en muchos procesos de transducción de señales, incluidos los que favorecen la vasoconstricción, vasodilatación y crecimiento de la pared del vaso³⁴.

1.1.2 Funciones del endotelio

El endotelio participa en la regulación del tono vascular, proliferación celular, inflamación y hemostasia. Las CE pueden detectar cambios hemodinámicos, como aumento en la tensión de la pared, de la presión y de la concentración de las sustancias vasoactivas circulantes liberadas por los leucocitos y las plaquetas³⁵. Las CE sintetizan una gran cantidad de sustancias:

Factores vasodilatadores: Oxido Nítrico (NO), Factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF), Prostaciclina (PGI_2).

Factores vasoconstrictores: Endotelina-1 (ET-1), Angiotensina II (AT II), Tromboxano A_2 (TXA_2), Prostaglandina H_2 .

Promotores del crecimiento celular: ET-1, AT II.

Inhibidores del crecimiento celular: NO, PGI_2 .

Promotores inflamatorios: Radicales superóxido, Factor de necrosis tumoral α ($\text{TNF}\alpha$).

Factores hemostáticos protrombóticos: Inhibidor del activador tisular del plasminógeno 1 (PAI-1), Factor von Willebrand (FvW).

Factores hemostáticos antitrombóticos: Activador tisular del plasminógeno (t-PA), Trombomodulina (TM).

El endotelio normal libera de manera constante pequeñas cantidades de NO para mantener el tono basal de la pared de los vasos sanguíneos. En respuesta a estímulos fisiológicos como el aumento de la tensión de la pared, disminución de la tensión de oxígeno y sustancias como acetil colina (Ach), bradiquinina, histamina, trombina, ADP y ATP se liberan cantidades extra de NO³⁶. Los factores vasoconstrictores y

proliferativos derivados de endotelio deben estar en equilibrio con los factores relajantes e inhibidores de la proliferación celular para que los vasos estén sanos³⁷.

La prostaciclina se produce en respuesta a la fricción de la pared vascular y a otras sustancias que estimulan la producción de NO, pero su contribución a la vasodilatación es mucho menor que la de éste³⁸.

El EDHF causa un flujo de salida de potasio que hiperpolariza el músculo liso vascular, provocando así la vasodilatación. La bradiquinina tiene un efecto vasodilatador directo al causar hiperpolarización, produce vasodilatación de las arteriolas (vasos de resistencia) y también impide la proliferación de las células del músculo liso vascular y la adherencia de macrófagos a las paredes de los vasos³⁹.

Desde el punto de vista fisiológico la vasoconstricción es estimulada por el estiramiento y la presión, y en situaciones patológicas, por la hipoxia⁴⁰.

La vasoconstricción dependiente de endotelio es estimulada por el ácido araquidónico, la prostaglandina H₂, la trombina, la nicotina y los niveles intracelulares elevados de calcio y potasio. El TXA₂ y los endoperóxidos, que son metabolitos del ácido araquidónico, son potentes vasoconstrictores derivados del endotelio⁴¹. Varias sustancias que inducen vasodilatación dependiente de endotelio causan vasoconstricción cuando se administran en forma directa en las células musculares lisas vasculares. Los productos vasoactivos que comparten esta propiedad de relajación endotelial y de contracción del músculo liso son la Ach, la vasopresina, la bradiquinina, la serotonina, el ADP y la ET-1⁴².

Cuando el endotelio está sano e intacto, se establece un equilibrio entre las fuerzas opuestas, que por lo general, favorece la vasodilatación, pero si hay daño o injuria endotelial, se pierde el equilibrio predominando el efecto sobre el músculo liso, y, por lo tanto, la vasoconstricción⁴³. Este mecanismo fisiológico básico es importante en las lesiones vasculares para reducir la pérdida de sangre.

Las CE producen o influyen en la acción del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), la ET-1 y la AT II sustancias que estimulan la proliferación celular de la pared de los vasos. La AT II aumenta su efecto directo sobre la proliferación de las células del músculo liso estimulando la secreción de FGF y de PDGF⁴⁴.

El endotelio normal participa del control del delicado equilibrio entre trombosis y fibrinólisis. La trombosis se previene mediante la síntesis de glucosaminoglicanos que potencian a los inhibidores fisiológicos que inactivan principalmente al FX_a y a la trombina. El endotelio también sintetiza trombosmodulina, un receptor de trombina al que ésta se une para activar a la Proteína C, que a su vez inhibe a los FVIII_a y FV_a ⁴⁵.

El endotelio sintetiza t-PA (activador tisular del plasminógeno) que convierte el plasminógeno en plasmina, la enzima encargada de degradar la red de fibrina y también sintetiza el inhibidor de la fibrinólisis PAI-1. Los niveles elevados de PAI-1 han sido asociados a una mayor incidencia de eventos cardiovasculares⁴⁶.

En la respuesta inflamatoria, hay un aumento de la expresión de moléculas de adhesión en la superficie de las CE que se unen a receptores de las células polimorfonucleares⁴⁷.

1.2 OXIDO NITRICO

En el año 1980 Furchgott *et al* demostraron la necesidad de la presencia del endotelio para que la Ach indujera la relajación muscular en preparaciones de aorta de conejo⁴⁸; observaron también que una sustancia originada en un vaso con endotelio intacto causaba relajación en otro vaso sanguíneo carente de endotelio, denominando a esta sustancia *factor relajante derivado de endotelio* (EDRF). El efecto del EDRF que duraba apenas unos pocos segundos, era inhibido por radicales superóxido y protegido por la enzima superóxido dismutasa⁴⁹. La vasodilatación que producía el EDRF iba acompañada de una elevación del GMP_c intracelular, una propiedad compartida con los nitrovasodilatadores exógenos⁵⁰. En 1987 Moncada S. *et al* demostraron que el EDRF y el NO eran la misma sustancia⁵¹.

El NO está presente en todos los tejidos endoteliales, desde las grandes arterias hasta las redes de capilares más pequeñas⁵².

Cuando la producción de NO se altera, como en la remoción experimental del endotelio, o en procesos patológicos como la formación de placas de ateroma se

favorece la vasoconstricción, la trombosis y la adhesión de leucocitos y plaquetas en detrimento de la vasodilatación y la circulación normal⁵³.

La casi totalidad de los estímulos que producen vasodilatación se manifiesta por la liberación de NO, un gas biológicamente activo, presente en casi todas las células del organismo, que debido a su bajo peso molecular y su naturaleza lipofílica, difunde fácilmente a través de las membranas celulares⁵⁴. La molécula de NO es un radical libre (Figura N° 7) ya que contiene un electrón no apareado, es inestable y en presencia de oxígeno y agua se oxida a nitrito y nitrato. Puede unirse al azufre y al hierro, en especial al hierro hémico presente en las hemoproteínas⁵⁵.

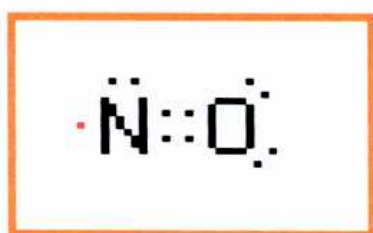


Figura N° 7: Estructura de Lewis del óxido nítrico

NO es sintetizado a través de la vía de la L-arginina por la acción de la enzima Oxido Nítrico Sintetasa (NOS) sobre el aminoácido L-arginina, produciendo NO y L-citrulina. La NOS transfiere electrones de NADPH en presencia de oxígeno a la L-arginina, produciéndose la oxidación del nitrógeno guanidino terminal^{56, 57} (Figura N° 8).

En células de mamíferos se conocen tres isoformas de la enzima NOS: la nNOS o NOS I del tejido neurológico y la eNOS o NOS III de célula endotelial son constitutivas, Ca^{2+} y calmodulina dependientes, de baja producción de NO y responden a agonistas que elevan el nivel de Ca^{2+} intracelular⁵⁸ (Figura N° 9).

La isoforma inducible iNOS o NOS II es Ca^{2+} y calmodulina independiente y se expresa en CE, megacariocitos, plaquetas, leucocitos polimorfonucleares, monocitos periféricos y en macrófagos luego de ser activada por citoquinas proinflamatorias y endotoxinas bacterianas y es inhibida por glucocorticoides⁵⁹.

La expresión de iNOS usualmente comienza entre 2 a 6 horas a partir de la exposición a los agentes inductores y una vez expresada genera 10 veces más NO que las isoformas constitutivas. Este efecto se mantiene durante 48 a 72 horas⁶⁰.

El NO generado por iNOS tendría acción citotóxica sobre microorganismos invasores y células tumorales. La expresión de iNOS se acompaña de una disminución en la regulación de la actividad de la eNOS. En CE coexisten ambas isoformas eNOS e iNOS⁶¹.

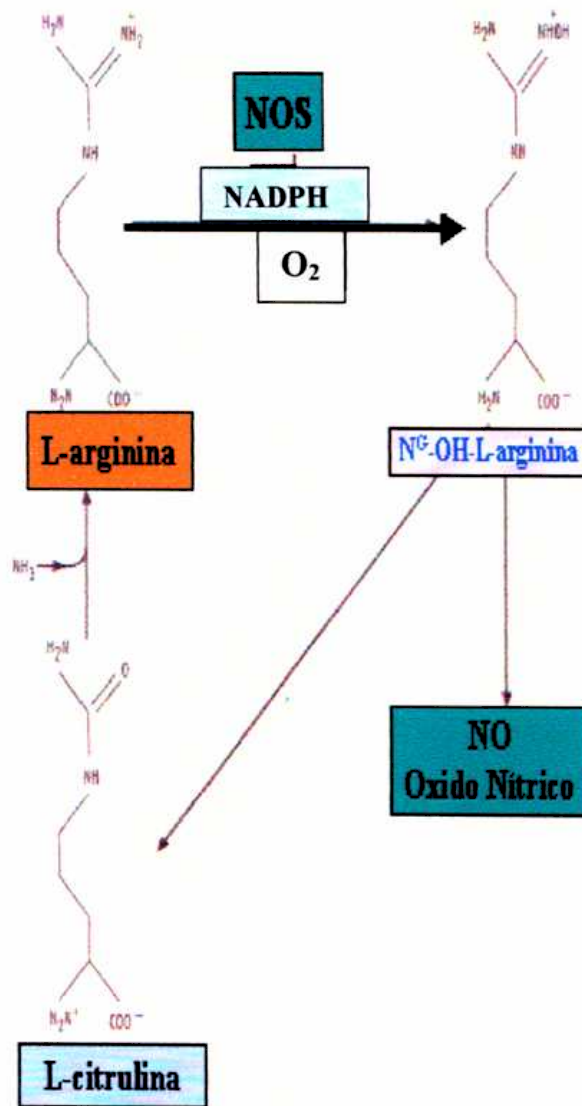


Figura N° 8: Biosíntesis de NO a partir de la L-arginina

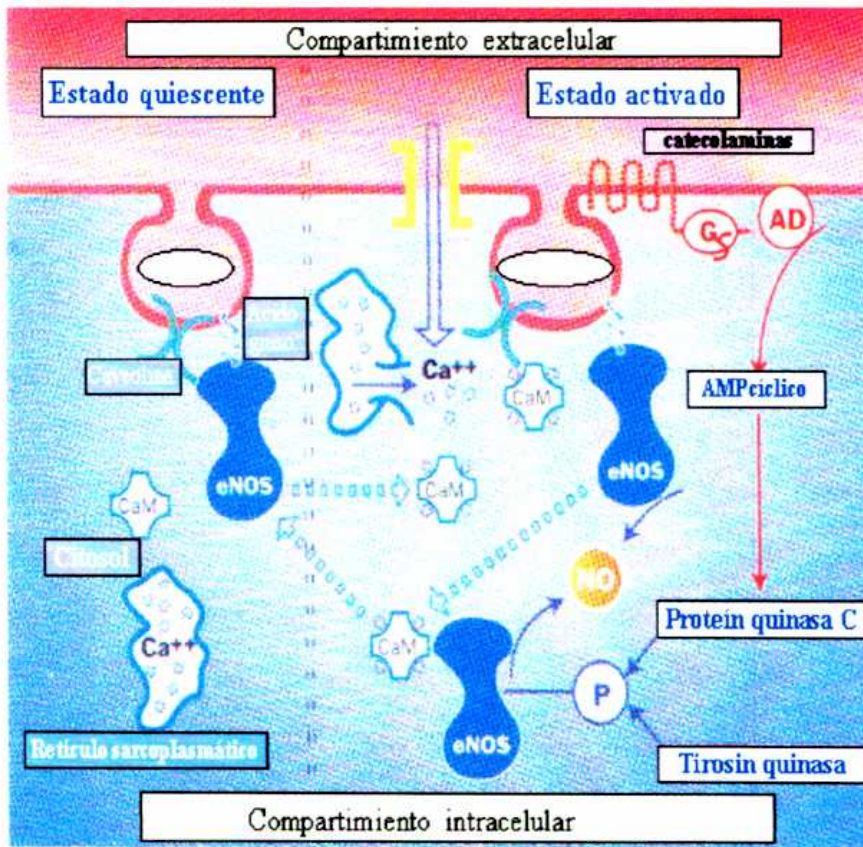


Figura N° 9: Ciclo de activación de eNOS a través de calcio-calmodulina y fosforilaciones.

La interacción de eNOS con la proteína caveolina, por la cual tiene una alta afinidad, mantiene a esta enzima en estado quiescente. La calmodulina + Ca^{2+} disocia a la eNOS de su enlace con caveolina, generando su activación. La fosforilación de eNOS también activa a la enzima, ya que disocia el enlace eNOS-caveolina⁶². Se ha sugerido que la activación de eNOS por el *shear stress* involucraría fosforilaciones a través de la movilización del Ca^{2+} , luego se produciría el desplazamiento de eNOS de su unión con caveolina por acción del sistema Ca^{2+} -calmodulina, y finalmente ocurriría una segunda fosforilación por la proteína quinasa C (PKC)⁶³.

La isoforma endotelial posee un sitio de miristilación, un sitio de enlace a una cadena de ácido graso. Esta unión le permite a la eNOS estar asociada a la membrana de la CE, mientras que las otras dos isoformas no tienen este sitio y están presentes en el citosol⁶⁴.

Esta asociación de la eNOS a la membrana facilitaría la difusión del NO producido hacia la sangre y hacia la célula muscular lisa. En la Figura N° 10 se observan las estructuras moleculares de las tres isoenzimas.

En 1998 se caracterizó y purificó a partir de hígado de rata, una isoforma mitocondrial de NOS (mtNOS). Esta enzima tiene características similares a las otras NOS, su actividad depende de FAD, FMN, BH₄, Ca²⁺-calmodulina, NADPH y su sustrato es la L-arginina⁶⁵. El peso molecular y sus características inmunológicas, y también el hecho de ser reconocida por anticuerpos monoclonales contra iNOS, podría sugerir que la mtNOS sería similar a la iNOS. Sin embargo, la expresión constitutiva de la mtNOS, la dependencia de Ca²⁺ para su actividad y la localización en la membrana mitocondrial sugieren que esta NOS sería una nueva isoforma o una iNOS con modificaciones postraduccionales que determinarían su diferente localización subcelular⁶⁶.

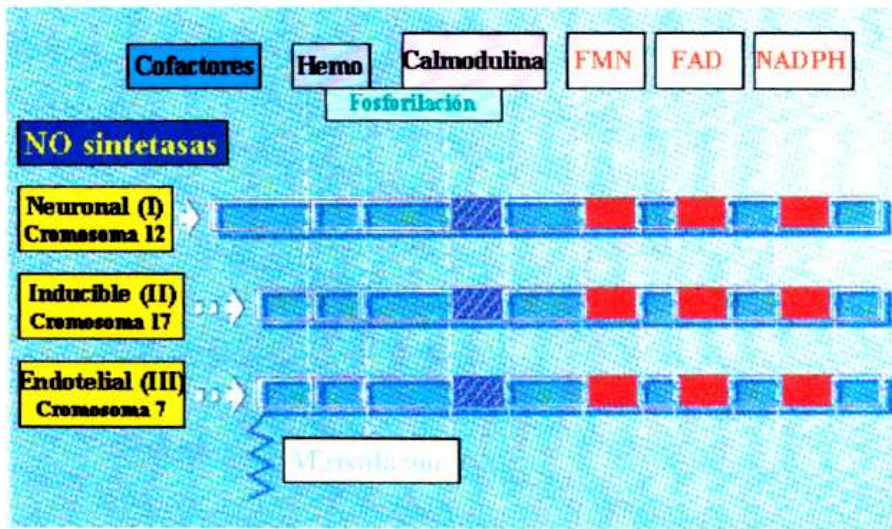


Figura N° 10: Esquema de la estructura molecular de las isoformas de las Oxido Nítrico Sintetas (NOS). NOS neuronal: nNOS, NOS I; NOS inducible: iNOS, NOS II y NOS endotelial: eNOS, NOS III. Están detallados los sitios de unión para la L-arginina, calmodulina, FMN (flavin-mononucleótido), FAD (flavin-adenina dinucleótido) y NADPH (fosfato de nicotinamida-adenina dinucleótido).

El NO, una vez sintetizado, difunde y alcanza el tejido muscular liso de la pared arterial y se enlaza al hierro del grupo hemo prostético de la enzima Guanilato Ciclasa soluble (GC) en las células musculares lisas vasculares formando un nitrosil-hemoaducto guanilil ciclasa que causa la activación de la enzima, liberándose GMPc (Figura N° 11) El GMPc aumenta la concentración de Ca^{2+} citosólico y provoca la relajación de la fibra muscular lisa vascular conduciendo a la vasodilatación⁶⁷. La actividad de la GC es inhibida por azul de metileno.

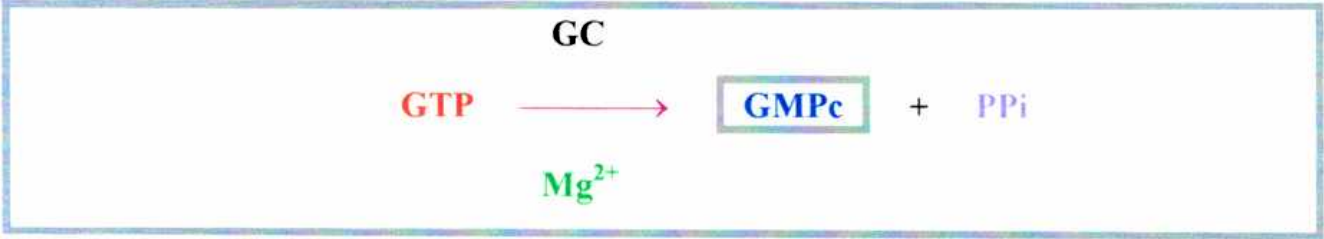


Figura N° 11: La enzima guanilato ciclasa soluble (GC) sintetiza monofosfato de guanidina cíclico (GMPc) a partir de trifosfato de guanidina (GTP).

El NO se enlaza de una manera similar a la hemoglobina y la mioglobina. Además de difundir hacia las células musculares lisas vasculares, el NO es liberado hacia la luz del vaso, donde inhibe la adhesión celular al endotelio⁶⁸ (Figura N° 12).

El estímulo físico para la liberación de NO es el *shear stress* (presión de rozamiento o fuerza tangencial), que se genera por el aumento del flujo dentro de la arteria y que conduce a una vasodilatación cuya magnitud es directamente proporcional a la cantidad de NO liberado por el endotelio, razón por la cual se denomina vasodilatación endotelio-dependiente mediada por el flujo⁶⁹.

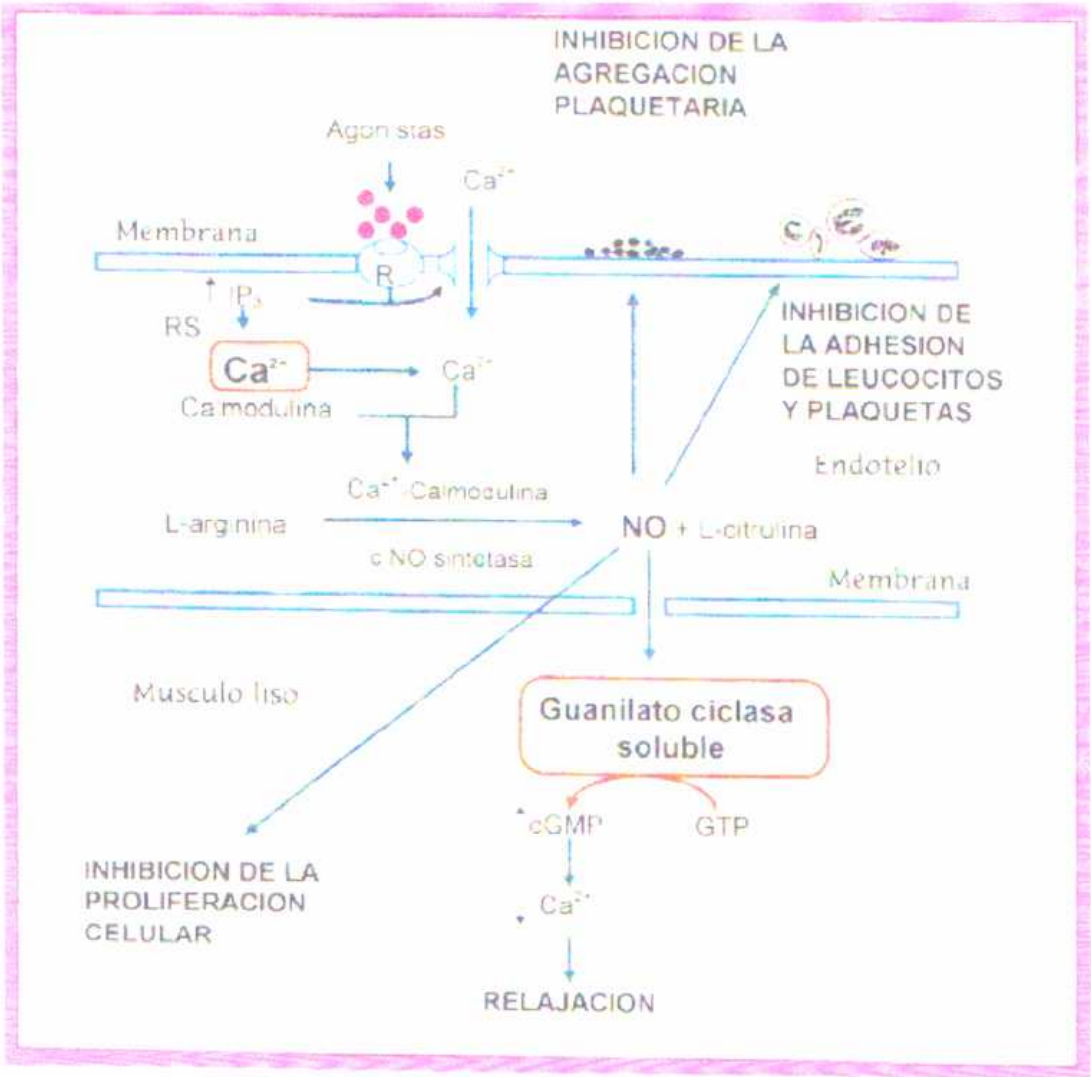


Figura N° 12: Acción del NO sobre la célula endotelial y la célula muscular lisa vascular.

Los nitritos, ya sea por vía sublingual, oral, parenteral o transdérmica, son dadores de grupos nitro que liberan NO en la circulación, activan directamente al GMPc en la célula muscular lisa y provocan una vasodilatación independiente de la acción del endotelio y sin relación con el flujo⁷⁰.

El NO, además de su efecto vasodilatador, reduce la permeabilidad vascular, la síntesis de moléculas de adhesión leucocitaria y, en consecuencia, la adhesión de leucocitos y plaquetas al endotelio; también inhibe la oxidación tisular, la actividad de los factores trombogénicos, la inflamación tisular, el crecimiento, la proliferación y la migración celulares, la expresión de citoquinas proaterogénicas y proinflamatorias y, además, favorece la fibrinólisis. Estos efectos impedirían la aterogénesis y sus complicaciones⁷¹.

El efecto del *shear stress* sobre las CE y la acción de agonistas tales como Ach, bradiquinina, vasopresina, serotonina, ADP producen un aumento del Ca^{2+} citosólico que activa la eNOS⁷². El *shear stress* también dirige la apertura de los canales de Ca^{2+} en CE, llevando así a la activación de la eNOS⁷³. Esta isoforma sintetiza de manera continua NO para mantener el tono vascular. La formación basal de NO varía considerablemente según el vaso considerado y también a lo largo de diferentes diámetros del mismo segmento vascular. Ignarro L. *et al*, encontraron que la mayor formación basal de NO ocurre en la arteria pulmonar bovina y en las venas de menor diámetro⁷⁴.

A pesar de su estructura química simple el NO muestra una marcada dualidad de comportamiento: cuando es sintetizado por la enzima constitutiva regula el tono vasomotor⁷⁵ e inhibe la adhesión y la proliferación celular, pero cuando es producido por la isoforma inducible, su efecto es potencialmente perjudicial⁷⁶.

1.3 ENDOTELINAS

Existen tres isoformas estructural y funcionalmente similares de Endotelinas (ET): ET-1, ET-2 y ET-3, cada una codificada en los cromosomas 6, 1 y 20, respectivamente⁷⁷.

La isoforma predominante en la vasculatura humana es ET-1, de potente y prolongado efecto vasoconstrictor, ET-2 no es detectable en plasma humano y ET-3 es detectable en plasma, pero su acción vasoconstrictora es menor⁷⁸. La mayor parte de la ET-1 se secreta al espacio subendotelial, donde actúa sobre las CMLV y alrededor del 20 % se libera hacia la luz del vaso⁷⁹.

Las tres isoformas de ET son sintetizadas inicialmente como grandes prepropeptidos de aproximadamente 200 aminoácidos, que son clivados a propeptidos y en el caso de ET-1 a Big-ET-1 y en un siguiente clivaje genera el péptido maduro de 21 aminoácidos ET-1. Este último paso en la síntesis es catalizado por la Enzima Convertidora de la Endotelina (ECE)⁸⁰.

Las ECE son una familia de metaloproteasas con diferente distribución tisular, actividad biológica y selectividad hacia las isoformas de ET⁸¹. Cierta cantidad de Big-ET-1 junto con ET-1 es secretada al plasma, donde puede convertirse en ET-1 por mecanismos extracelulares⁸². Aproximadamente el 90 % de la ET-1 es depurada del plasma durante el primer pasaje a través de los pulmones. La secreción de ET-1 ocurre en pocos minutos a partir de la exposición de los estímulos inductores. La vida media plasmática de ET-1 es de 4 a 7 minutos, mientras que la de su mRNA es de 15 a 20 minutos, así las células vasculares pueden ajustar rápidamente la producción de ET-1 para la regulación del tono vascular⁸³.

El endotelio vascular libera AT II a partir de la Angiotensina I por la acción de la Enzima Convertidora de la Angiotensina (ECA). La AT II provoca vasoconstricción y tiene acciones protrombogénicas, oxidantes, antifibrinolíticas, favorece la expresión de moléculas de adhesión, estimula factores de crecimiento y proliferación celular, facilitando la instalación de la aterosclerosis y sus complicaciones. Además, la AT II estimula la acción de la ECE, liberándose ET-1, promoviendo, por otra vía, la vasoconstricción⁸⁴.

Los receptores de las ET (ET_A y ET_B) pertenecen a la superfamilia de rodopsinas. Están caracterizados por la presencia de siete segmentos transmembrana hidrofóbicos. La acción de estos receptores es mediada por la proteína G. Estos receptores son glicoproteínas y están distribuidos en varios tejidos⁸⁵. El mRNA de ET_A está expresado en corazón, aorta y vasos sanguíneos del cerebro en las CMLV, pero no en las CE. El mRNA de ET_B está mayormente expresado en las CE, en las cuales su activación lleva a la producción de sustancias vasodilatadoras como NO y PGI₂ , mientras que en las CMLV produce vasoconstricción⁸⁶.

ET_A tiene mayor afinidad por ET-1 y se encuentra en CMLV. ET_B tiene idéntica afinidad por las tres isoformas de ET⁸⁷ (Tabla N° 2).

El enlace de ET-1 a su receptor es fuerte, tiene una baja constante de disociación, por lo tanto, la acción de ET-1 tiene un efecto prolongado⁸⁸.

Tipo de receptor	ET _A	ET _B
Afinidad	ET-1 > ET-2 >> ET-3	ET-1 = ET-2 = ET-3
Localización	CMLV	CE y CMLV
Acción	Vasoconstrictor	Vasodilatador/Vasoconstric
Regulación positiva	Hipoxia, AMPc	Angiotensina II
Regulación negativa	Endotelina, Angiotensina II	AMPc

Tabla N° 2: Distribución y propiedades de los receptores de las Endotelinas

El efecto hemodinámico de la ET-1 depende de la localización y de la abundancia relativa del receptor estimulado⁸⁹.

Las concentraciones circulantes de ET-1 son del orden picomolar, insuficientes para producir contracción vascular. ET-1 es el vasoconstrictor más potente conocido a la fecha, es diez veces más potente que la AT II⁹⁰. Los niveles de ET-1 tienden a aumentar con la edad, y se han encontrado niveles aumentados en aterosclerosis y diabetes. ET-1 estimula la proliferación y la migración de las CMLV. La Insulina aumenta la síntesis de ET-1 y su acción mitógena sobre las CMLV⁹¹.

Actualmente están en desarrollo sustancias antagonistas de los receptores de ET-1, otras interfieren con la liberación de ET-1 ó alteran su metabolismo, como los inhibidores de la ECE⁹².

1.4 FACTOR von WILLEBRAND

El Factor von Willebrand (FvW) es una glicoproteína multimérica adhesiva que tiene un rol fundamental en la adhesión inicial de las plaquetas al subendotelio vascular y es la proteína transportadora del FVIII coagulante, su peso molecular es 0,5 a 20×10^6 y su vida media plasmática es de 18 horas⁹³.

El FvW es sintetizado por las CE y por megacariocitos y se lo encuentra en los cuerpos de Weibel-Palade (WP) de las CE, en la matriz subendotelial, y en los gránulos α de las plaquetas⁹⁴. La síntesis del FvW es un proceso complejo que requiere de varios pasos, luego de los cuales son formados multímeros de diferente peso molecular; los de alto peso molecular se encuentran en CE y plaquetas⁹⁵. A elevado *shear stress*, como ocurre en la microvasculatura, el FvW es esencial para el enlace de las plaquetas. Mientras que en solución el FvW es incapaz de unirse al receptor plaquetario GPI_b-IX o al colágeno inmovilizado, la exposición al *shear stress* promueve esta interacción, tal vez debido a cambios conformacionales dentro de la molécula de FvW⁹⁶.

A través de múltiples dominios funcionales, cada subunidad del FvW tiene sitios de enlace para colágeno, heparina, GPI_b-IX, GPII_bIII_a y FVIII⁹⁷.

Las isoformas de mayor peso molecular se almacenan en los WP, organelas secretorias de la CE de 0.1 μ m de ancho y 4 μ m de longitud, que liberan FvW luego de estímulos como el ejercicio, adrenalina, vasopresina, 1-deamino-8-D-arginina-vasopresina (DDAVP), citoquinas, etc. Las deficiencias cuantitativas ó cualitativas del FvW son la causa de la Enfermedad de von Willebrand y de sus diferentes subtipos que presentan variados cuadros de diátesis hemorrágica⁹⁸.

Por el contrario, niveles plasmáticos elevados de FvW han sido asociados a eventos trombóticos, pero su relación causal no ha sido demostrada. El FvW puede

comportarse como un reactante de fase aguda, y estar aumentado en procesos infecciosos, inflamatorios y enfermedades malignas⁹⁹.

Varios autores apoyan la hipótesis de que altas concentraciones de FvW serían índice de aterosclerosis o estarían asociadas a un riesgo aumentado de eventos trombóticos^{100, 101}.

En un estudio prospectivo y multicéntrico realizado con 3043 pacientes con *angina pectoris* se encontró que la concentración plasmática de FvW fue un predictor independiente de síndromes agudos coronarios subsecuentes¹⁰².

Otros autores asociaron los niveles elevados de FvW y FVIII coagulante con enfermedad isquémica cardíaca severa¹⁰³. También se han reportado niveles plasmáticos elevados de FvW en pacientes con factores de riesgo para aterosclerosis, incluyendo Diabetes Mellitus, Hipertensión e Hipercolesterolemia¹⁰⁴.

Como la liberación de FvW está aumentada cuando el endotelio está dañado, el nivel plasmático del FvW ha sido propuesto como marcador o indicador de disfunción endotelial¹⁰⁵.

1.5 P-SELECTINA

Las Selectinas son moléculas de adhesión celular e importantes receptores en la interacción célula-célula que involucra neutrófilos, monocitos y su adhesión al endotelio y plaquetas. La familia de las Selectinas está constituida por tres isoformas: P-Selectina (P-Sel), L-Selectina y E-Selectina¹⁰⁶ (Tabla N° 3).

La L-Selectina se encuentra en leucocitos y media el reclutamiento de los linfocitos a los nódulos linfáticos. La E-Selectina se expresa en CE activada por citoquinas proinflamatorias. La P-Sel (CD62P, GMP-140, PADGEM), es una glicoproteína de 140 kDa que se encuentra en la membrana de los gránulos α de las plaquetas y de los cuerpos de WP de las CE¹⁰⁷.

La exposición de las plaquetas o de las células endoteliales a agonistas tales como trombina o histamina, produce la traslocación de la P-Sel a la superficie de las membranas plasmáticas, donde media la adhesión de las plaquetas activadas a los

monocitos y neutrófilos y también la adhesión entre células endoteliales y neutrófilos. La síntesis de P-Sel inducida por las citoquinas IL-1 y TNF α ocurre dentro de los pocos minutos a las 2 horas¹⁰⁸.

La P-Sel es una proteína altamente glicosilada de 789 aminoácidos. En su extremo N-terminal contiene un dominio lectina que juega un rol crítico en el reconocimiento del ligando; un dominio EGF (factor de crecimiento epidermal) que confiere cierta especificidad de enlace al dominio lectina adyacente; una serie de 9 dominios de repetición (proteínas reguladoras de complemento C3b-C4b); un dominio transmembrana y otro citoplasmático¹⁰⁹.

Las tres selectinas presentan homología estructural, variando el número de dominios de repetición en cada una¹¹⁰ (Figura N° 13).

Debido a un splicing alternativo existen tres formas diferentes de P-Sel, dos de las cuales difieren en el número de regiones de proteínas regulatorias del complemento, mientras que una tercera carece del dominio transmembrana, lo que genera una isoforma soluble, sP-Selectina (sP-Sel), que puede provenir de plaquetas y de CE¹¹¹. Varios estudios concluyen que la principal fuente de sP-Sel circulante en individuos sanos son las plaquetas. La activación de las CE está asociada con un incremento en la concentración de sP-Sel por plaqueta¹¹².

Selectina	Nomenclatura CD	Nomenclatura previa	Expresión en	Célula blanco
L-Selectina	CD62L	LAM-1 LECAM-1	PMNs. monocitos. linfocitos	CEs activadas
E-Selectina	CD62E	ELAM-1	CEs activadas por citoquinas	PMNs.monocitos.linfocitos. algunas células tumorales
P-Selectina	CD62P	GMP-140 PADGEM	CEs y plaquetas activadas por trombina. CEs activadas por citoquinas	PMNs, monocitos, eosinófilos, linfocitos. células tumorales

Tabla Nº 3: Selectinas, células en las que se expresan y con las que interactúan: denominaciones anteriores y CD. EC's: Células endoteliales; PMNs: células polimorfo nucleares; LAM-1: lymphocyte adhesión molecule; LECAM-1: leukocyte-endothelial cell adhesión molecule; ELAM-1: endotelial leukocyte adhesión molecule; GMP-140: granule membrane protein; PADGEM: platelet activation dependent granule external membrane protein.

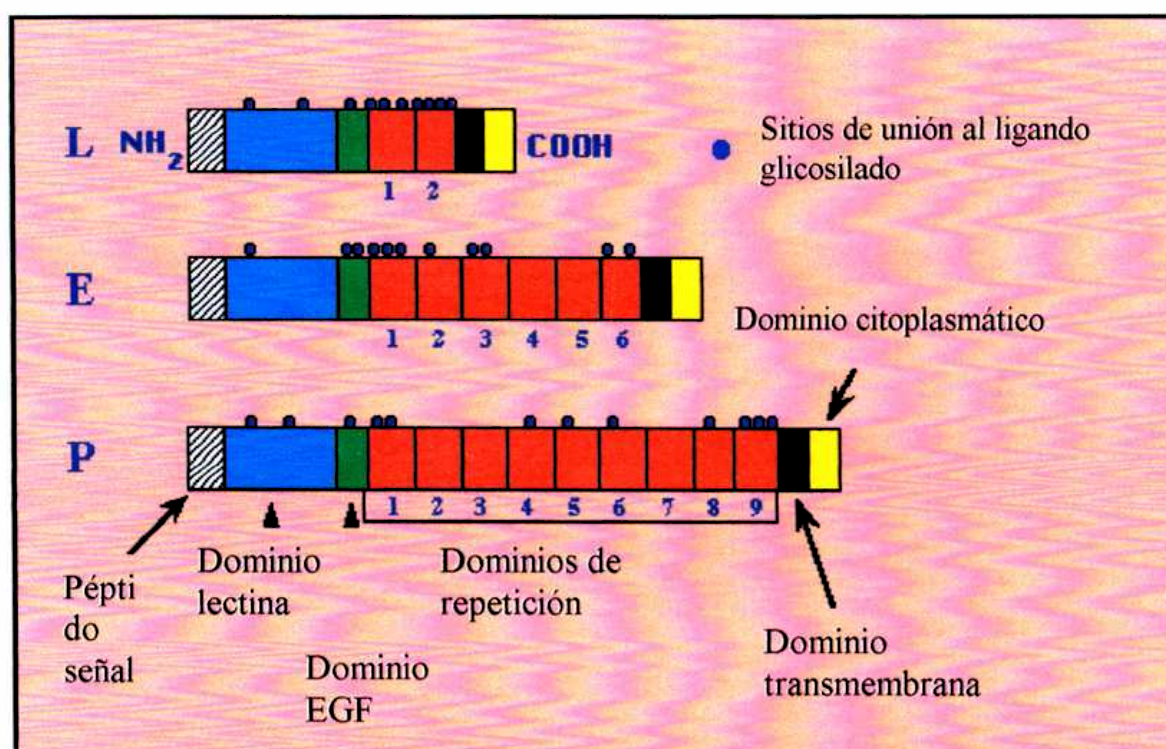


Figura N° 13: Estructura molecular de L-, E- y P-Selectinas

El principal ligando de la P-Sel es PSGL-1 (P-Selectin glycoprotein ligand-1) que se encuentra constitutivamente en todos los leucocitos; esta glicoproteína contiene el tetrasacárido sialil-Lewis^x (sialil-CD15), que está presente en todas las células mieloides circulantes y está compuesto de ácido siálico, galactosa, fructosa y N-acetilgalactosamina¹¹³ (Figura N° 14).

Otro ligando para P-Sel es CD24, el cual parece ser importante para el enlace de células tumorales. La interacción entre P-Sel y PSGL-1 permite el “rolling” de los leucocitos sobre las CE a lo largo del endotelio vascular¹¹⁴. La P-Sel mediaría así las primeras etapas en el proceso de adhesión, *rolling* y migración de los leucocitos en la respuesta inflamatoria¹¹⁵.

La expresión en membrana plaquetaria de P-Sel y los niveles elevados de la forma soluble son considerados marcadores de activación plaquetaria¹¹⁶. Se ha descrito aumento de la expresión de P-Sel en diabetes, aterosclerosis, enfermedad isquémica cardíaca, enfermedad vascular periférica, microangiopatías trombóticas¹¹⁷.

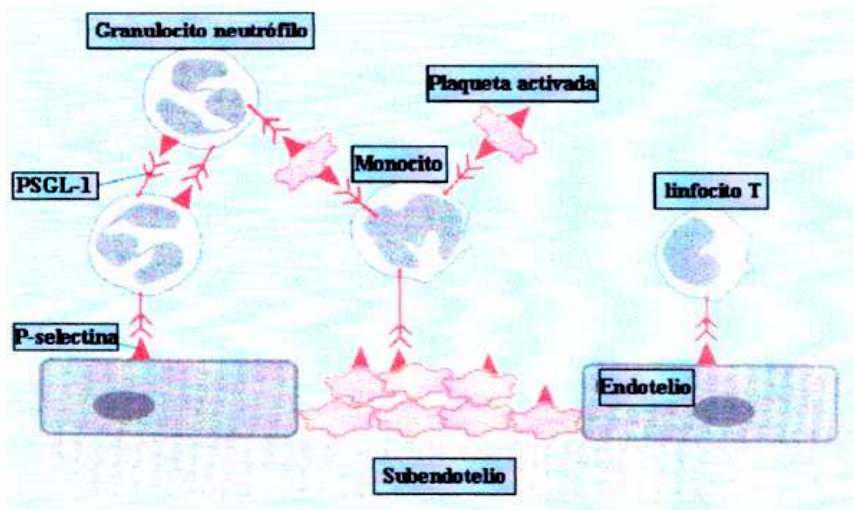


Figura N° 14: En el endotelio la P-Selectina media la adhesión de los leucocitos a las plaquetas, CE y otros leucocitos a través de su ligando PSGL-1 en los sitios de injuria vascular.

1.6 GP 53

La GP53 (CD63) es una glicoproteína de membranas lisosomales y cuerpos densos plaquetarios, que al igual que la P-Sel. luego de la activación se trasloca a la superficie de la membrana plasmática. El aumento de la expresión en membrana plaquetaria de la GP 53 es considerado marcador de activación plaquetaria¹¹⁸.

1.7 INHIBIDOR DEL ACTIVADOR TISULAR DEL PLASMINÓGENO (PAI-1)

El PAI-1 es una glicoproteína de simple cadena de 52 kD de peso molecular compuesta de 379 aminoácidos. Pertenece a la familia de los inhibidores de serino proteasas (serpinas). En el plasma el PAI-1 existe en cuatro formas diferentes: activa, latente, oxidada y formando complejos equimolares con el activador tisular del plasminógeno (t-PA)¹¹⁹. La forma activa de PAI-1 está estabilizado por una asociación no covalente con vitronectina. El coágulo de fibrina provee la superficie en la cual ocurren las reacciones. El plasminógeno es activado por el t-PA ó por el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA). El plasminógeno, el t-PA y la fibrina forman un complejo ternario que promueve la formación de plasmina y la subsecuente lisis de la fibrina entrecruzada en fragmentos de bajo peso molecular (productos de degradación de la fibrina). El PAI-1 también se enlaza a la fibrina, reteniendo su efecto inhibitorio sobre la actividad del t-PA (Figura N° 15). El inhibidor de plasmina, $\alpha 2$ -antiplasmina, es entrecruzado en la red de fibrina por acción del FXIII_a¹²⁰.

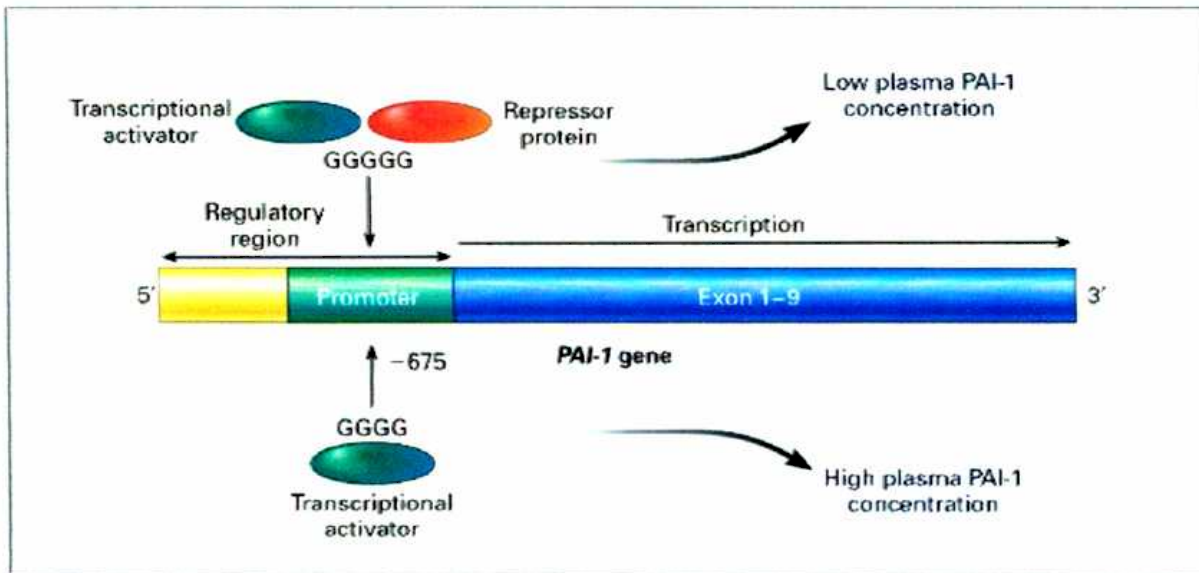


Figura N° 16: Estructura del gen de PAI-1 y el polimorfismo 4G/5G en posición -675 en la región del promotor.

La concentración plasmática de PAI-1 varía ampliamente, es una proteína reactante de fase aguda y sus niveles pueden elevarse considerablemente en un proceso inflamatorio o infeccioso¹²³. Varios estudios han concluido que los niveles plasmáticos elevados de PAI-1 estarían relacionados con una actividad fibrinolítica disminuida, enfermedad coronaria, desarrollo de aterosclerosis y a un mayor riesgo de eventos trombóticos^{124, 125}.

1.7.1 Acción de la insulina sobre la síntesis de PAI-1

La insulino-resistencia es un desorden metabólico que predispone a la diabetes y a la enfermedad isquémica cardíaca. La principal característica de la insulino-resistencia es hiperinsulinemia, anormalidades en el metabolismo de la glucosa, hipertrigliceridemia con bajos niveles de HDL colesterol, hipertensión y obesidad central (abdominal)¹²⁶. La insulina, moléculas tipo proinsulina, la glucosa y VLDL directamente estimulan la transcripción y secreción de PAI-1 en las células endoteliales (Figura N° 17). El tejido adiposo, que está aumentado en insulino-resistencia, sintetiza PAI-1. Este síndrome corresponde a un estado prediabético con un riesgo aumentado de desarrollar aterosclerosis¹²⁷.

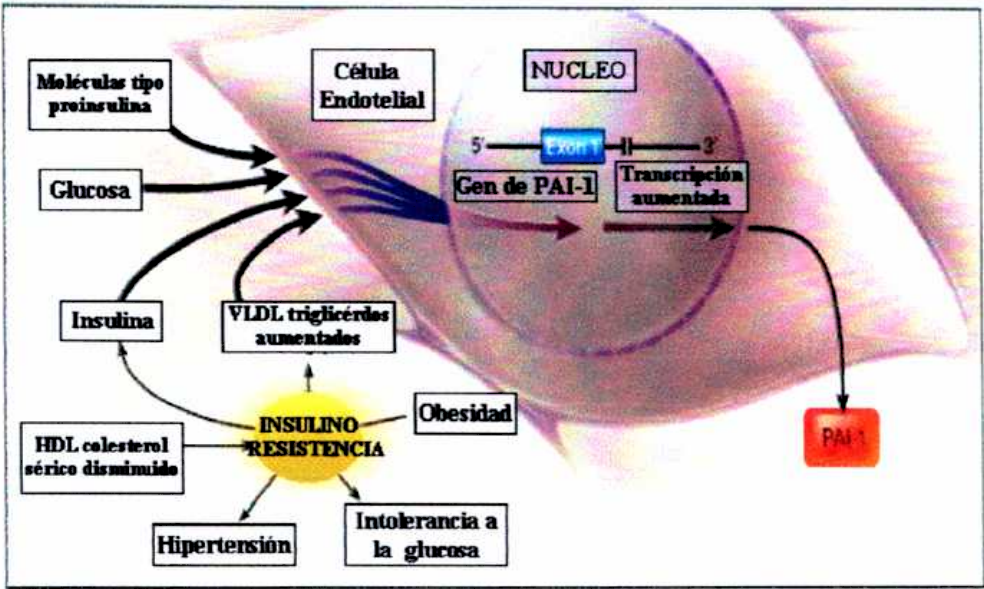


Figura N° 17: Relación entre la síntesis de PAI-1 y el síndrome de insulino-resistencia

2 DIABETES MELLITUS

La Diabetes Mellitus es un trastorno sistémico con alteraciones del metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos y proteínas. El defecto básico en la diabetes es la disminución de la secreción o de la actividad de la insulina que produce hiperglucemia y está asociada frecuentemente con lesiones microvasculares sobre todo en riñón y retina, predisposición a las lesiones macrovasculares y a las alteraciones en el sistema nervioso (neuropatía diabética)^{128, 129}.

La Diabetes Mellitus es una de las enfermedades crónicas más comunes en el mundo, con una prevalencia entre 4-8 % en EE.UU. y Europa. La forma clínica predominante de la diabetes es la tipo 2 o no-insulino dependiente, constituyendo aproximadamente el 90 % de los casos. Los individuos diabéticos tipo 2 tienen síntomas clínicos de enfermedad vascular más frecuentemente que los no diabéticos, sufren mayor incidencia de infarto de miocardio, *angina pectoris*, arritmias cardíacas, claudicación, gangrena y *stroke*. La principal causa de muerte entre sujetos diabéticos es la enfermedad cardiovascular^{130, 131}.

Los pacientes diabéticos 2 están expuestos a los efectos aterogénicos de la insulino-resistencia durante el largo período preclínico que precede al establecimiento de la diabetes, que puede ser entre 15 a 25 años. La insulino-resistencia está asociada a otros factores de riesgo aterogénicos como hipertrigliceridemia, niveles reducidos de HDL colesterol, hipertensión e hiperfibrinogenemia, entre otros¹³².

En el año 1979 el comité de expertos, National Diabetes Data Group (DNG) publicó una guía para la clasificación, nomenclatura y diagnóstico de la diabetes y en 1997 se actualizó, desaconsejando el uso de los términos diabetes insulino-dependiente y no insulino-dependiente (IDDM y NIDDM respectivamente). Se propusieron los términos Diabetes Mellitus tipo 1 (DBT 1) y Diabetes Mellitus tipo 2 (DBT 2)¹³³.

La nueva clasificación según los expertos sería:

a- DBT 1: incluye los casos de destrucción de las células β pancreáticas , con deficiencia completa de insulina, y se presenta en individuos jóvenes en la mayoría de los casos

b- DBT 2: se presenta en adultos e incluye aquellos pacientes que presentan insulino-resistencia.

c- Otros tipos específicos :

Disfunción genética de la célula β pancreática

Defecto genético en la acción de la insulina

Enfermedad exógena del páncreas

Endocrinopatía inducida por drogas

Infecciones

Diabetes mellitus gestacional

Los criterios diagnósticos para Diabetes mellitus son:

i) Síntomas clásicos : poliuria, polidipsia y glucemia “casual” > 200 mg/dl (11 mM) determinada en cualquier momento del día, sin importar la última ingesta de comida.

ii) Glucemia en ayuno no menor a 8 horas > 126 mg/dl (7.0 mM).

iii) Glucemia determinada a las 2 horas posteriores a una administración oral de glucosa de 75 gr en agua > 200 mg/dl (11 mM).

Con estos nuevos criterios se disminuirá la necesidad de realizar excesivas curvas de tolerancia a la glucosa y se incrementará el número de pacientes diagnosticados más precozmente¹³⁴.

2.1 INSULINO-RESISTENCIA EN DIABETES TIPO 2

En el estado de ayuno, la mayoría de la glucosa producida por el hígado es usada por los tejidos sin la necesidad de la insulina para su internalización y metabolismo. Después de la ingesta, la glucosa que proviene del intestino genera un complejo proceso metabólico hormonal, respuesta que incluye la secreción de insulina. El 50 ó 60% del total de la glucosa absorbida después de una comida es metabolizada en los músculos periféricos, el principal órgano sensible a la insulina¹³⁵. El músculo estriado es el tejido principalmente responsable de la insulino-resistencia en los pacientes con DBT 2¹³⁶.

Varios estudios realizados con pacientes DBT 2 han documentado una relación entre la prevalencia de enfermedad coronaria y niveles elevados de insulina, proinsulina y Péptido C, un producto liberado en la síntesis de la insulina¹³⁷.

La insulina puede ejercer sus efectos proaterogénicos a través de varios mecanismos: estimula la progresión e inhibe la regresión de la placa aterosclerótica; estimula la síntesis de lípidos, la formación de tejido conectivo, la proliferación de las CMLV; aumenta la síntesis celular de colesterol; aumenta la cantidad de receptores de las LDL y disminuye los de HDL¹³⁸.

La hiperinsulinemia generalmente implica insulino-resistencia. Este síndrome está caracterizado por la alteración en el metabolismo de la glucosa (tolerancia a la glucosa reducida), obesidad abdominal, dislipemia (triglicéridos aumentados y HDL disminuido, presencia circulante de partículas de LDL pequeñas y densas, hipertensión arterial, microalbuminuria y desórdenes de la hemostasia (aumento de las concentraciones plasmáticas de fibrinógeno y PAI-1). La insulino-resistencia puede persistir a pesar de la corrección de la hiperglucemia¹³⁹.

Estos desórdenes metabólicos, hemodinámicos y hemostáticos predisponen a los pacientes a un mayor riesgo de eventos trombóticos¹⁴⁰.

Los individuos DBT 2 tienen síntomas clínicos de enfermedad vascular más frecuentemente que los no diabéticos, sufren mayor incidencia de infarto de miocardio, *angina pectoris*, arritmias cardíacas, claudicación, gangrena y *stroke*. La principal causa de muerte entre sujetos diabéticos es la enfermedad cardiovascular¹⁴¹.

Los pacientes DBT 2 están expuestos a los efectos aterogénicos de la insulino-resistencia durante el período preclínico que precede al establecimiento de la diabetes, que puede ser entre 15 a 25 años¹⁴².

2.2 HIPERGLUCEMIA

La hiperglucemia ejerce un efecto directo tóxico en CE. La glucosa estimula la proliferación de las CMLV, lo cual favorece el desarrollo de la placa aterosclerótica¹⁴³. Como consecuencia de la hiperglucemia, hay un aumento en la glicosilación de varias moléculas (proteínas, lípidos, DNA, RNA) que involucra reacciones como la formación de una base de Schiff, reordenación de Amadori y luego de una serie de complejas reacciones de deshidratación, condensación, fragmentación, oxidación y ciclación que llevan al paso irreversible de la formación de los productos de glicosilación finales (AGEs) (Figura N° 18). Los AGEs se acumulan en los tejidos y en proteínas de vida media larga en función de la concentración del glúcido y del tiempo. La glicosilación avanzada es un proceso no-enzimático que resulta del enlace covalente de la glucosa circulante con los aminoácidos de las proteínas¹⁴⁴.

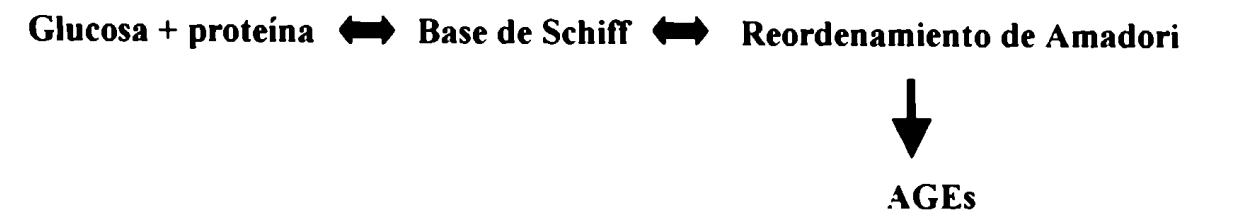


Figura N° 18: Producción de los productos de glicosilación finales (AGEs)

Los compuestos AGEs mejor caracterizados son pentosidina y carboximetil lisina. La degradación del DNA y del RNA produce ribosa libre, la cual forma parte de la molécula de pentosidina¹⁴⁵ (Figura N° 19).

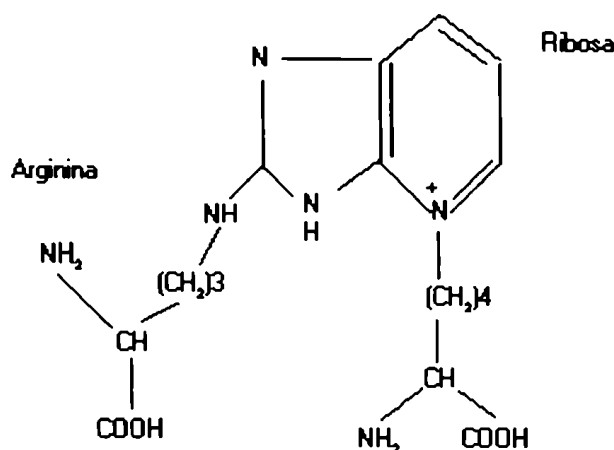


Figura N° 19: Estructura química de la pentosidina

Se han caracterizado receptores específicos para los AGE's. El receptor RAGE (receptor-AGE) pertenece a la familia de las Inmunoglobulinas y está presente en CE, monocitos-macrófagos, CMLV, plaquetas, fibroblastos y células neuronales. El otro receptor caracterizado para AGEs es LFI y presenta una alta homología con la lactoferrina¹⁴⁶.

La expresión de RAGE es potenciada por la hiperglucemia o por TNF α . La unión de la carboximetil lisina a RAGE produce la expresión de VCAM-1 (Vascular Cell Adhesión Molecule-1). El complejo RAGE-LFI en la superficie celular media la extravasación de AGE-albúmina (albúmina glicosilada)¹⁴⁷.

Luego de la interacción con los AGEs las células se vuelven proaterogénicas: el endotelio aumenta su permeabilidad y pierde su actividad anticoagulante, los fibroblastos y las CMLV aumentan su actividad mitótica, los monocitos-macrófagos producen citoquinas proinflamatorias (TNF α , IL-1) y factores de crecimiento y las plaquetas se vuelven más sensibles a los estímulos de activación y agregación¹⁴⁸.

La acción de los AGEs no mediada por sus receptores en moléculas como albúmina hace que ésta penetre más fácilmente la matriz subendotelial, que la fibrina se

vuelva más resistente a la degradación, que el colágeno “atrape” proteínas plasmáticas en el subendotelio, que las LDL sean más fácilmente oxidadas y que el NO sea inactivado luego de su interacción con los AGEs¹⁴⁹.

En animales diabéticos la disminución en la respuesta vasodilatadora al NO correlaciona con el nivel de AGEs acumulados. Los AGEs bloquean el efecto antiproliferativo del NO sobre las CMLV, lo que causaría una aterosclerosis acelerada¹⁵⁰.

La glicosilación de la hemoglobina (HbA₀) produce las HbA₁, que se subdividen en HbA_{1-a1}, HbA_{1-a2}, HbA_{1b} y HbA_{1c} de acuerdo al glúcido fijado a la proteína. La HbA_{1c} contiene restos glucosilo. La formación de HbA_{1c} *in vivo* es un proceso lento que se realiza en forma continua a lo largo de la vida del eritrocito. En controles no diabéticos el valor de HbA_{1c} oscila entre 6-8 %. Cuando la glucemia se eleva por encima del rango normal, la HbA_{1c} aumenta y en esto reside su importancia como indicador del grado de control metabólico retrospectivo del paciente diabético, pero no evalúa las variaciones instantáneas de la glucemia, sino que informa acerca de lo acontecido con ella en un período aproximado de 6 a 8 semanas previas a su determinación¹⁵¹.

La HbA_{1c} aumenta su afinidad por el oxígeno, y esto hará que lo ceda a los tejidos periféricos con menor facilidad, produciendo hipoxia regional principalmente en los extremos venosos de los capilares periféricos¹⁵².

La glicosilación de la albúmina también aumenta con el incremento de la glucemia. Debido a la vida media de esta proteína, su valor se relaciona con los valores glucémicos correspondientes al período de 1 a 3 semanas previas a su determinación. La glicosilación de la albúmina induce cambios en su estructura y propiedades, disminuye en un 50 % su capacidad de ligar hipoglucemiantes orales y aumenta su transporte a través del endotelio. Las globulinas son también glicosiladas y esto alteraría sus funciones específicas en la inmunidad humoral¹⁵³.

De la glicosilación de las lipoproteínas LDL, VLDL y HDL, los cambios más importantes se han detectado en la fracción LDL. La remoción del plasma de las LDL depende en un 75 % de la unión con su receptor celular específico. La glicosilación de las LDL disminuye su afinidad por el receptor, determinando una disminución en su

depuración plasmática y un aumento en los niveles circulantes¹⁵⁴. Este aumento, junto con el incremento de su captación por parte de los macrófagos, favorecería la formación de depósitos en la pared vascular. Estos depósitos son sustrato para la lipoperoxidación, con formación de radicales libres altamente reactivos que contribuirían al daño celular¹⁵⁵.

La fibrina glicosilada es menos sensible a la acción proteolítica de la plasmina, que ejerce su acción proteolítica a nivel de los residuos lisina, los que al glicosilarse dejan de ser accesibles a la enzima. Esto alteraría la remoción de la fibrina depositada en las paredes de los vasos. La glicosilación de la Antitrombina III (AT) disminuye su acción inhibitoria de la trombina, favoreciendo la formación de la red de fibrina¹⁵⁶.

El colágeno también puede ser glicosilado; su ubicación y su vida media prolongada hacen que esté expuesto con facilidad y por períodos prolongados a la glucosa presente en el medio extracelular. El colágeno glicosilado es menos sensible a la degradación enzimática¹⁵⁷.

La glicosilación también afecta a los grupos amino del DNA, con la consiguiente formación de AGEs. Los monocitos/macrófagos poseen receptores específicos de alta afinidad que les permiten reconocer proteínas glicosiladas. Estos receptores reaccionan con los AGEs que aparecen en las proteínas tanto intra como extracelulares e incluso con aquellas localizadas en la membrana celular. La insulina inhibe el proceso de fagocitosis de las moléculas portadoras de AGEs por lo que éstas permanecen mayor tiempo en circulación. Por lo tanto, la combinación de hiperglucemia e hiperinsulinemia, característica de los estados de insulino-resistencia, aumentaría simultáneamente la formación de AGEs y su permanencia en circulación¹⁵⁸.

2.3 HIPERTENSION ARTERIAL EN DIABETES

La hipertensión arterial (HTA) es uno de los principales factores de riesgo asociados con la diabetes. En los pacientes diabéticos la HTA acelera la aterosclerosis.

En los pacientes con Diabetes Mellitus, la HTA es dos veces más frecuente que en sujetos no diabéticos. La HTA en la DBT 1 y LA DBT 2 es notablemente diferente en sus características de presentación¹⁵⁹.

En el tipo 1, la presión sanguínea está generalmente normal al momento del diagnóstico de la DBT y permanece normal durante aproximadamente 10 años, pero pueden advertirse modificaciones histológicas en el parénquima renal. En cambio, en la DBT 2, la HTA está frecuentemente presente en el momento del diagnóstico inicial. La presión sanguínea va aumentando con la edad y el nivel de obesidad del paciente¹⁶⁰.

En la DBT 2 la HTA generalmente está asociada a dislipemia, obesidad, microalbuminuria, conformando el denominado síndrome de insulino-resistencia¹⁶¹.

2.4 OBESIDAD

La obesidad está frecuentemente asociada con DBT, HTA, sedentarismo, hipertrigliceridemia, bajos niveles de HDL colesterol y alteraciones en la coagulación sanguínea. Estos factores representan para el paciente un marcado riesgo trombótico¹⁶².

El parámetro índice de masa corporal (IMC) se calcula dividiendo el peso del paciente por su altura elevada al cuadrado:

$$\text{PESO} \times (\text{ALTURA})^2 = \text{IMC}$$

Se considera dentro de rango normal $\text{IMC} < 25 \text{ kg/m}^2$ y que el riesgo de enfermedad cardiovascular está aumentado tres veces si el $\text{IMC} > 30$.

La obesidad, especialmente la de tipo abdominal, denominada obesidad central se determina con otro parámetro: la relación **CINTURA / CADERA**.

Este cociente no debe ser mayor a 0.9 en mujeres y a 1.0 en hombres¹⁶³.

La obesidad central promueve la insulino-resistencia. El tejido adiposo secreta citoquinas inflamatorias ($\text{TNF}\alpha$) e inhibidores de la fibrinólisis (PAI-1). Estas

sustancias tienen efectos locales, pero también actúan sobre otros tejidos como la vasculatura, contribuyendo a las alteraciones metabólicas y cardiovasculares. En los pacientes DBT 2 la pérdida de peso mejora el control glucémico¹⁶⁴.

2.5 MICROALBUMINURIA

La microalbuminuria es la excreción urinaria aumentada de albúmina que predice el desarrollo de nefropatía. Los pacientes DBT 2 desarrollan insuficiencia renal crónica entre un 5 % a un 10 %. A partir del quinto año del diagnóstico de la diabetes algunos pacientes presentan nefropatía incipiente. Esta etapa es silente, pero puede ser detectada con la determinación de microalbuminuria y filtrado glomerular¹⁶⁵.

Esta detección precoz y su consecuente tratamiento, evita la progresión hacia la nefropatía clínica, en la que se detecta proteinuria. Los pacientes diabéticos con proteinuria tienen niveles más elevados de presión sanguínea, LDL y colesterol total, triglicéridos y fibrinógeno plasmático, además del aumento en la adhesión y agregación plaquetaria¹⁶⁶.

2.6 DISLIPEMIA

La dislipemia está presente en el 50% de los pacientes diabéticos. Esta alteración incluye: bajos niveles plasmáticos de HDL, altos niveles de colesterol total, LDL y triglicéridos, alteraciones en la composición de las lipoproteínas, aumento en los niveles de Lp(a), de apolipoproteínas B y E y en la razón apo-C III / apo-C II. Las alteraciones lipídicas son más frecuentes en la DBT 2 que en la DBT 1 que pueden persistir aún bajo un buen control metabólico. La actividad de la Lipoprotein lipasa está reducida en DBT 2, como resultado de esta alteración estos pacientes presentan altos niveles de triglicéridos post-prandiales. Estas alteraciones lipídicas están relacionadas a la insulino-resistencia y son más comunes en sujetos obesos. La liberación de NO inducida por el *shear stress* está disminuida por LDL oxidada (LDLox)¹⁶⁷.

2.7 ALTERACIONES EN LA COAGULACIÓN Y LA FIBRINOLISIS

Las alteraciones en el Sistema de Coagulación y Fibrinolítico presentes en la diabetes predisponen a estos pacientes a una mayor incidencia de eventos trombóticos. Estas alteraciones incluyen aumento en la activación, adhesión y agregación plaquetaria, aumento de los niveles plasmáticos de algunos factores de coagulación y una fibrinólisis disminuida¹⁶⁸.

2.7.1 Factor VII

Se han descrito niveles elevados de FVII en pacientes DBT relacionados con eventos cardíacos. En estos pacientes el nivel de FVII se normaliza con un buen control glucémico¹⁶⁹.

2.7.2 Factor von Willebrand

El FvW es considerado marcador de daño endotelial y los niveles plasmáticos elevados en Diabetes Mellitus están asociados con el aumento del riesgo de padecer eventos trombóticos¹⁷⁰ (ver también 1.4).

2.7.3 Fibrinógeno

Los niveles plasmáticos elevados de fibrinógeno (Fg) están fuertemente asociados con un aumento del riesgo de enfermedad coronaria y en los pacientes diabéticos, además, es un predictor de otras complicaciones vasculares¹⁷¹. El Fg plasmático está frecuentemente elevado en los pacientes diabéticos, y este aumento estaría asociado a un pobre control glucémico¹⁷².

2.7.4 Inhibidores fisiológicos de la coagulación

La AT es un inhibidor de la trombina, con la que forma un complejo equimolecular Trombina-Antitrombina (TAT) y además inactiva otros factores de coagulación como el FIX_a, el FX_a y el FXI_a.

En los pacientes diabéticos la actividad funcional de AT y de TAT está disminuida. La glicosilación de AT causa la reducción de su actividad y está

relacionada al control glucémico de estos pacientes¹⁷³. También se ha descrito la disminución de la actividad de otros inhibidores como el Cofactor II de la Heparina, la Proteína C y la Proteína S. Esta disminución de las actividades de los inhibidores de la coagulación favorece el estado protrombótico en estos pacientes¹⁷⁴.

2.7.5 Plaquetas

El paciente diabético presenta alteraciones en la función plaquetaria: disminución de la vida media, aumento en la activación, en la adhesión y en la agregación, e incremento en la liberación de Factor Plaquetario 3 y 4 (FP-3 y FP-4 respectivamente) y β -tromboglobulina¹⁷⁵. En pacientes DBT 2, se ha descrito un aumento de la expresión de P-Sel en membrana plaquetaria¹⁷⁶.

2.7.6 Fibrinólisis

La disminución de la actividad fibrinolítica debido al aumento de la actividad de PAI-1 y la disminución de t-PA, ha sido asociada al incremento en el riesgo de infarto de miocardio en pacientes con enfermedad coronaria¹⁷⁷. Los niveles plasmáticos de insulina y proinsulina, ambos aumentados en pacientes DBT 2, la obesidad abdominal y la hipertensión arterial aumentan la actividad de PAI-1¹⁷⁸.

La actividad fibrinolítica disminuida predispone al individuo no sólo a eventos trombóticos, sino también a la formación y progresión de placas ateroscleróticas. La hipofibrinólisis estaría involucrada en el desarrollo de enfermedad vascular periférica en pacientes DBT 2 aún con buen control glucémico y lipídico¹⁷⁹.

2.8 HOMOCISTEINA

La homocisteína (Hcy) es un aminoácido derivado de la demetilación de la metionina. El metabolismo de la metionina puede seguir la vía de la remetilación a metionina o la vía de transulfuración a cisteína. La concentración de Hcy está regulada por factores genéticos y nutricionales¹⁸⁰.

Las causas de hiperhomocisteinemia incluyen deficiencia de *cistatiotina β intetasa*, presencia de la variante termolábil de *metilentetrahidrofolato reductasa* (MTHFR), (ambas son enzimas del metabolismo de la Hcy); deficiencias de las vitaminas B₁₂ y B₆ (cofactores en el metabolismo de la Hcy); deficiencia de ácido fólico (que aporta el compuesto dador de metilos en la vía de la remetilación) e insuficiencia renal. Los niveles plasmáticos de Hcy tienden a aumentar con la edad¹⁸¹.

Los niveles plasmáticos elevados de Hcy, ya sea en ayunas ó posterior a una sobrecarga con metionina, han sido asociados con aterotrombosis y enfermedades cardiovasculares. En modelos animales la hiperhomocisteinemia causa daño endotelial vascular predisponiendo a la aterosclerosis¹⁸².

Se han reportado niveles elevados de Hcy en pacientes diabéticos, especialmente en asociación con microalbuminuria. Como los productos del metabolismo de la Hcy son excretados por riñón, la microalbuminuria, que es un índice precoz de insuficiencia renal, podría estar relacionada con los niveles plasmáticos elevados de Hcy¹⁸³.

2.9 CITOQUINAS

La IL-1 y el TNF α inducen la producción de prostaciclina en la célula endotelial. Aumentan también la permeabilidad celular para las macromoléculas. La inducción de la producción de NO por IL-1 puede ser interpretada como respuesta local o sistémica vasodilatadora a estas citoquinas inflamatorias. Por otro lado pueden inducir la producción de Endotelina-1 de acción vasoconstrictora¹⁸⁴.

3. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

3.1 DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN DIABETES

Las complicaciones vasculares son la causa más importante de mortalidad entre los pacientes diabéticos. La disfunción endotelial está caracterizada por un desbalance entre los factores vasodilatadores y vasoconstrictores; entre los factores procoagulantes y anticoagulantes y entre los factores que inhiben la proliferación celular y los que la estimulan. La disfunción endotelial presenta una respuesta disminuida a la vasodilatación endotelio-dependiente, siendo éste el primer signo que precede a los cambios morfológicos de la pared vascular¹⁸⁵.

Los posibles mecanismos que explicarían la disfunción endotelial en diabetes serían: 1) Síntesis o liberación reducida de NO; 2) Inactivación acelerada de NO causada por los elevados niveles de especies reactivas de oxígeno y AGEs; 3) Generación y liberación de prostanoïdes vasoconstrictores que contrarrestan la acción de NO y 4) Alteraciones en las señales de transducción causadas por la disminución de la expresión de las proteínas-G inhibitorias, el metabolismo reducido de fosfoinositol y el aumento de la activación de PKC¹⁸⁶.

Hay una sustancial evidencia de que la vasodilatación mediada por el NO derivado del endotelio está disminuida en modelos animales y en pacientes DBT 1 y DBT 2. El NO es un factor fundamental involucrado en las propiedades antiateroscleróticas del endotelio, interfiere con eventos clave en el desarrollo de la aterosclerosis tales como la regulación del tono vascular, la adhesión de leucocitos al endotelio, la interacción plaqueta-pared vascular y la proliferación de las CMLV¹⁸⁷. La patogénesis de la enfermedad vascular diabética podría involucrar una biodisponibilidad reducida del NO derivado de endotelio¹⁸⁸.

La disfunción endotelial inducida por la hiperglucemia podría resultar de una producción disminuida de NO, una inactivación de NO por los radicales libres y/o por la producción aumentada de factores contráctiles cuya acción se opone a la del NO. Los mecanismos principales de la disfunción endotelial mediada por la hiperglucemia serían: el aumento en la glicosilación no enzimática de proteínas, el incremento del

stress oxidativo, la hiperactividad de isoformas de la PKC y la actividad aumentada de la vía sorbitol-aldosa reductasa¹⁸⁹

El endotelio intacto tiene propiedades antiaterogénicas, su alteración, y la posterior formación de la placa aterosclerótica indica que la disfunción del endotelio sería el evento inicial¹⁹⁰ (Figura N° 20).

La disfunción endotelial detectada como una respuesta vasodilatadora disminuida al flujo hiperhémico, aumento en la adhesividad, permeabilidad y proliferación celular ha sido demostrada en presencia de conocidos factores de riesgo para aterosclerosis como hipertensión, hipercolesterolemia, diabetes y en fumadores activos y pasivos¹⁹¹ (Figura N° 21).

El *stress* oxidativo representa un mecanismo fisiopatológico que resulta de un desequilibrio entre la producción de radicales libres y las defensas naturales antioxidantes¹⁹².

La fisiopatología del *stress* oxidativo en DBT 2 es compleja e involucraría a los disturbios en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos. La hiperglucemia puede aumentar el *stress* oxidativo por varios mecanismos. En la autooxidación de la glucosa se generan sustancias altamente reactivas como O_2^- , HO^- y H_2O_2 que dañan las proteínas y los lípidos. Los radicales libres aceleran la formación de los AGEs que a su vez aportan más radicales libres y mayor glicooxidación¹⁹³.

El aumento celular de la glucosa estimula la actividad de la PKC, la que entre otros efectos, activa peroxidasas y la vía de la ciclooxigenasa (COX) que conducen a la sobreproducción de moléculas oxidativas¹⁹⁴.

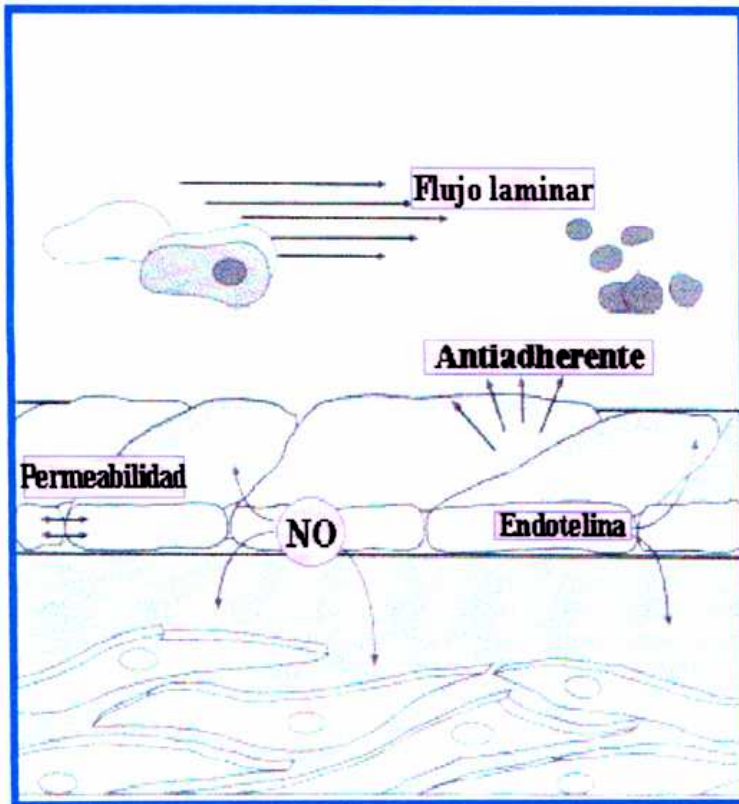


Figura N° 20: El endotelio sano presenta una superficie antiadherente, regula la permeabilidad a través de las células endoteliales y el tono vascular a través de la secreción de sustancias vasoactivas como NO y ET-1. El endotelio contribuye a mantener la homeostasis de la pared vascular.

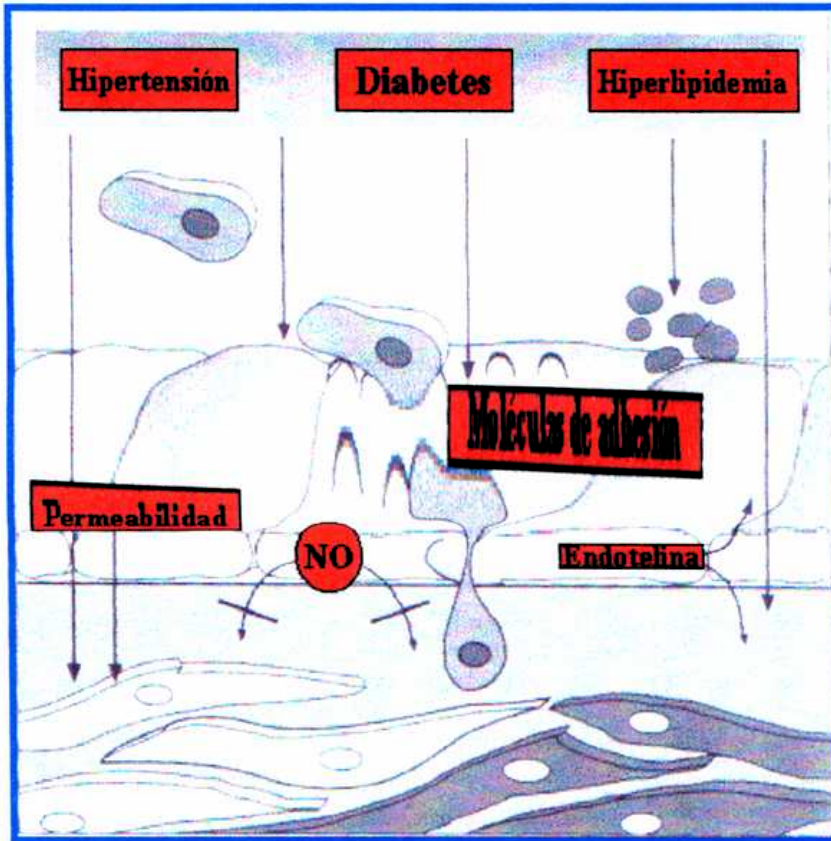


Figura N° 21: Los factores de riesgo como la hipertensión, diabetes e hiperlipemia dañan las células endoteliales e incrementan la permeabilidad celular y la adhesividad. La biodisponibilidad del óxido nítrico se altera y conduce al aumento de la expresión de factores vasoconstrictores y de proliferación celular como la Endotelina-1.

La hiperglucemia eleva la concentración de Ca^{2+} de la CE estimulando la síntesis y liberación de NO. Sin embargo, en presencia de aniones O_2^- , el NO es convertido a la potente molécula oxidante peroxinitrito (ONOO^-) que disminuye su biodisponibilidad para la vasodilatación¹⁹⁵.

La DBT 2 también está asociada a una disminución de antioxidantes a nivel tisular. Las enzimas tales como catalasa, superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa están disminuidas en DBT 2¹⁹⁶.

Los disturbios en el metabolismo lipídico en la DBT 2 también contribuyen al *stress* oxidativo. La dislipemia diabética caracterizada por triglicéridos (TG) elevados y HDL colesterol disminuido, también resulta en una variación en la composición de las

lipoproteínas, resultando en la producción de partículas más pequeñas y densas con función fisiológica alterada¹⁹⁷.

Las HDL tienen varios efectos que preservan la función endotelial: inhiben la síntesis de VCAM-I en CE y participan en el transporte reverso de colesterol: en los seres humanos aproximadamente el 80 % de la síntesis de colesterol ocurre en tejido extrahepático y debe ser transportado al hígado para su excreción¹⁹⁸.

Las LDL oxidadas pueden promover el aumento del *stress* oxidativo, directamente o bien por estimulación de la formación de radicales libres provenientes de la pared vascular, e indirectamente inhibiendo, la síntesis de NO, reduciendo así el potencial antioxidante. La LDLox y la LDL nativa pueden disminuir la actividad de eNOS por regulación de la expresión de caveolina. La hipertrigliceridemia puede *per se* promover un ambiente oxidativo aumentado¹⁹⁹.

La injuria endotelial y la biodisponibilidad de NO reducida, inicia el proceso de ateroesterosclerosis. La extensión de la disfunción endotelial puede reflejar el grado de *stress* oxidativo²⁰⁰.

3.2 DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN HIPERTENSIÓN

El endotelio puede influenciar profundamente el tono y la estructura vascular. En la hipertensión arterial (HTA) la disfunción endotelial ha sido documentada en periférica y coronaria micro y macrocirculación y en circulación renal. El fenómeno responsable de la alteración endotelial en HTA esencial parece ser la activación de una vía alternativa que involucraria la ciclooxigenasa y la reducción de la biodisponibilidad de NO a través del *stress* oxidativo²⁰¹.

La vasodilatación mediada por el NO derivado del endotelio está disminuida en modelos experimentales animales y en pacientes hipertensos y diabéticos²⁰².

La HTA esencial también está asociada con la disfunción endotelial, principalmente por la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) que reaccionan con NO y disminuyen sus efectos protectores y reguladores sobre la pared

arterial. En varios estudios prospectivos la disfunción endotelial fue asociada con un aumento en la incidencia de eventos cardiovasculares²⁰³.

El mantenimiento del tono vasomotor depende en forma decisiva del equilibrio entre las acciones relajantes del músculo liso vascular mediadas por el NO, PGI₂ y las acciones vasoconstrictoras de la ET-1 y TXA₂²⁰⁴.

La respuesta vasodilatadora a la Ach está disminuida en los pacientes con HTA esencial respecto de individuos normotensos, sugiriendo una respuesta deficiente de las CE a los agentes liberadores de NO. Sin embargo, la respuesta vasodilatadora a compuestos exógenos dadores de NO como el nitroprusiato es similar en estos pacientes y en los sujetos normotensos²⁰⁵. Esto indica que la respuesta al mediador celular del NO en el músculo liso a través del cual induce su relajación, el GMP cíclico, no estaría alterada en los hipertensos esenciales²⁰⁶.

Diversos estudios han sugerido que en pacientes hipertensos la menor biodisponibilidad del NO no parece ser debida a una deficiencia de su sustrato, la L-arginina, ya que la administración de cantidades crecientes de ésta no mejoró la respuesta a la Ach en la arteria braquial manteniéndose las diferencias entre pacientes y controles²⁰⁷.

Una menor disponibilidad de tetrahidrobiopterina (BH₄), que ha sido asociada a HTA y a otros factores de riesgo cardiovascular como la DBT, puede ser otro mecanismo que subyace a una menor concentración de NO disponible. En ausencia de niveles adecuados de BH₄, un cofactor necesario para el acoplamiento entre la reducción del oxígeno y la oxidación de la L-arginina, se produce un desacoplamiento del mismo dando lugar a la producción de especies reactivas de oxígeno en lugar de NO²⁰⁸.

En pacientes hipercolesterolémicos se ha observado un aumento de caveolina, proteína presente en los cavéolos de las CE y a la que está unida la eNOS. Para pasar a la forma activa, la eNOS debe desacoplarse de la caveolina y unirse al complejo calcio-calmodulina, por lo tanto, en presencia de niveles elevados de caveolina se formaría menor cantidad de NO²⁰⁹.

En varios estudios se ha observado la existencia de polimorfismo genético en la eNOS. Uno de ellos se ha correlacionado con HTA, el polimorfismo Glu298Asp, que implica el cambio del ácido glutámico en la posición 298 por ácido aspártico²¹⁰.

Aunque todavía no se ha determinado con exactitud el cambio fenotípico que lleva asociado esta variante, se observa una mayor prevalencia del genotipo Glu298Asp en pacientes hipertensos que en los sujetos normotensos, y esto implicaría que esta alteración podría estar asociada al desarrollo y mantenimiento de la HTA esencial²¹¹.

El endotelio es capaz de producir especies reactivas de oxígeno como O_2^- , OH^- o H_2O_2 a través del metabolismo oxidativo en las mitocondrias ó de enzimas oxidasas como la NADPH oxidasa, la ciclooxigenasa, la citocromo P_{450} reductasa, la xantino oxidasa y la lipooxigenasa²¹² (Figura N° 22). Desde el punto de vista de la disfunción vascular hipertensiva el anión más importante sería el O_2^- , capaz de formar peroxinitritos que participan en procesos de peroxidación lipídica, nitrosilación de proteínas y de los ácidos nucleicos²¹³.

Niveles elevados de O_2^- no sólo pueden ser consecuencia de un aumento de su producción, sino también de una disminución de su degradación. Los aniones O_2^- se degradan por la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) que da lugar a la formación de H_2O_2 , que es descompuesta por la enzima catalasa y la glutatión peroxidasa²¹⁴.

Se ha demostrado que la relajación dependiente de endotelio en anillos de aorta de conejos sanos baja cuando se inhibe la actividad de SOD, lo que implicaría la disminución de la relajación dependiente de NO ²¹⁵.

Se ha sugerido que la disfunción endotelial podría estar implicada en la patogenia de la aterosclerosis en los pacientes con hipertensión esencial a través de varios mecanismos: alteración de la vía L-arginina- NO , el *stress* oxidativo y aumento de moléculas de adhesión circulantes (ICAM-1, VCAM-1, P-Sel)²¹⁶.

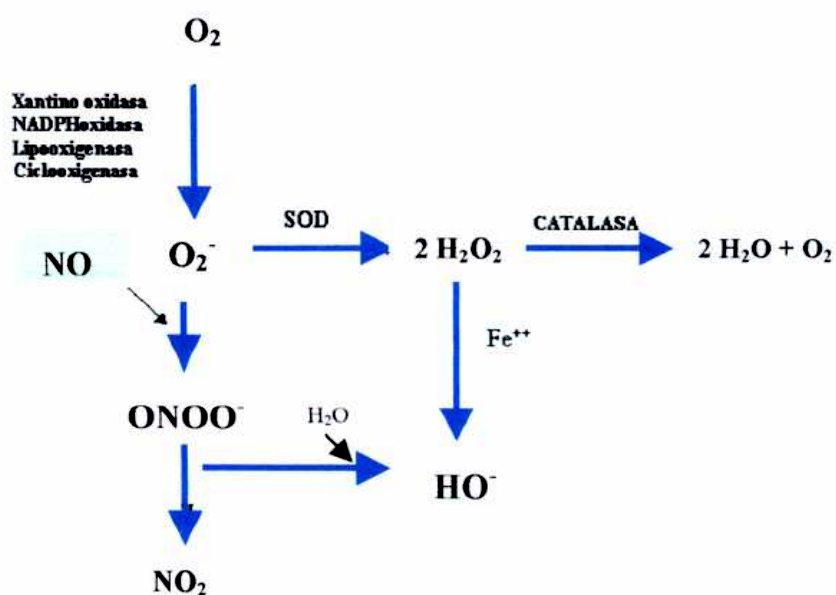


Figura N° 22: Oxidación del NO por aniones superóxido (O_2^-). Los radicales O_2^- reaccionan con NO para formar peroxinitritos ($ONOO^-$) y radicales hidroxilo (HO^-), por otro lado los radicales O_2^- son degradados por la enzima superóxido dismutasa (SOD) generando H_2O_2 , que a su vez, es degradado por la acción de la enzima catalasa.

4 EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL

El funcionamiento normal del endotelio es esencial para la prevención de las lesiones vasculares. Esto ha impulsado el interés clínico por la valoración de la función del endotelio como indicador de riesgo de enfermedad vascular y las consecuentes complicaciones trombóticas.

La función endotelial puede determinarse como un parámetro clínico, pero dichas medidas se utilizan, por el momento, principalmente como instrumentos de investigación, más que como parte de la evaluación clínica diaria.

4.1 MÉTODOS INVASIVOS

En un comienzo, la función del endotelio se determinó en las arterias coronarias epicárdicas, a raíz del descubrimiento de que experimentaban una concentración paradójica con Ach en los pacientes con aterosclerosis. Se hizo evidente que era necesaria la existencia de un endotelio sano para que se produjera la respuesta normal de dilatación, y que la lesión del endotelio causada por la aterosclerosis tenía un efecto vasoconstrictor directo sobre el músculo liso de la pared del vaso²¹⁷.

En la actualidad, la angiografía cuantitativa se utiliza para valorar la vasodilatación mediada por Ach en la circulación coronaria. El diámetro arterial y el flujo sanguíneo coronario se miden después de una serie de infusiones locales de concentraciones crecientes de Ach, y se compara el efecto con el de infusiones de vasodilatadores coronarios que no dependen de un endotelio intacto para sus acciones, tales como la adenosina, la nitroglicerina o la papaverina²¹⁸.

La sangre circulante no contiene Ach (que es un neurotransmisor), por lo que la técnica anterior no es una prueba fisiológica, sin embargo, tiene una correlación adecuada, en la mayoría de los casos, con los síntomas de la enfermedad coronaria²¹⁹.

Estos estudios de imagen coronarios han demostrado también que los fármacos pueden mejorar la función endotelial²²⁰.

La función endotelial coronaria se mide durante la angiografía, pero esta técnica es demasiado invasiva, y se realiza si forma parte de la valoración clínica para una angioplastia o una cirugía de revascularización²²¹.

Una alternativa es utilizar métodos no invasivos y realizar la prueba de la Ach en la circulación del antebrazo, donde se observa una menor vasodilatación en caso de disfunción endotelial. (Figura N° 23).

4.2 MÉTODOS NO INVASIVOS

La utilización de la arteria braquial procede de estudios que demuestran que la disfunción endotelial es generalizada: si hay disfunción en las arterias coronarias, también debe poder detectarse en otras arterias, aunque sea en menor grado²²².

La prueba del flujo en la arteria braquial tiene dos fases. En primer lugar, se infla el manguito de un esfigmomanómetro en el antebrazo hasta superar la presión sistólica del paciente durante 5 minutos y después se desinfla. Esto produce hiperemia reactiva, que aumenta el diámetro de las arterias normales hasta en un 20%. Un cambio de esta magnitud puede ser medido con facilidad y precisión mediante ultrasonido de alta resolución²²³.

En los pacientes con factores de riesgo para enfermedad arterial o con aterosclerosis evidente, la hiperemia es nula o está intensamente alterada. La respuesta hiperhémica de la arteria braquial está muy relacionada con la respuesta de la arteria coronaria a la Ach, y experimenta un deterioro paralelo al de la función endotelial coronaria²²⁴.

En la segunda fase de la prueba, se permite que la arteria braquial recupere el diámetro y el flujo basales. Se le administra al paciente nitroglicerina, un vasodilatador no endotelio-dependiente, por vía sublingual y se mide el diámetro de la arteria braquial durante tres ó cuatro minutos para calcular la máxima variación²²⁵.

En la primera parte de la prueba se mide la respuesta mediada por el flujo, que depende de la función endotelial. La segunda parte mide la vasodilatación independiente del endotelio. La diferencia indica el grado de lesión endotelial. Estos tipos de *test* miden sólo el aspecto vasomotor de la función endotelial²²⁶.

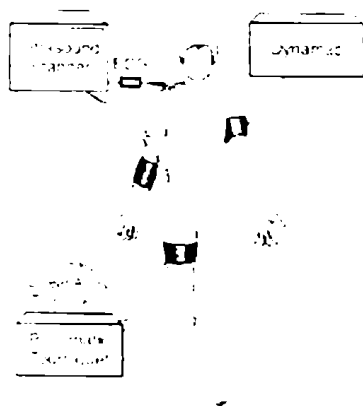


Figura N° 23: Evaluación no-invasiva de la función endotelial. La arteria target es habitualmente la braquial ó la arteria femoral superficial. El diámetro de la arteria es medido por un transductor de ultrasonido vascular de alta resolución. La hiperemia reactiva es inducida por una oclusión distal a la posición del transductor. Algunos investigadores han usado la arteria radial y un sistema especial de ultrasonido.

El *test* no invasivo para valorar la función endotelial debe poseer alta sensibilidad, es decir debe poder detectar pequeñas variaciones en el diámetro arterial, ser reproducible y endotelio dependiente; debe ser capaz de diferenciar sujetos con o sin disfunción endotelial y debe correlacionar con la función endotelial coronaria. La imagen de la arteria debe ser óptima y el personal que realiza la prueba debe estar bien entrenado²²⁷.

Si estos criterios se cumplen estrictamente, el *test* no invasivo sería una prueba clínica útil para el estudio de la disfunción endotelial y su posible tratamiento en determinados grupos de pacientes. La restricción obvia de este *test* es que se limita a

arterias superficiales y de tamaño grande a mediano, tales como las arterias femoral, braquial y radial. Sin embargo, la respuesta vasodilatadora al estímulo es inversamente proporcional al tamaño de la arteria aún en sujetos normales y las arterias de diámetro mayor de 6 mm dilatan sólo mínimamente en respuesta a la hiperemia reactiva²²⁸.

En pacientes adultos se utiliza la arteria braquial y en niños la femoral.

El *test* mide cambios submilimétricos en el diámetro arterial y hace posible repetirlo durante el seguimiento de los pacientes, ya que no implica riesgo significativo.

La variación del 2 % entre dos test consecutivos indicaría que el tratamiento que estaría recibiendo el paciente sería beneficioso, porque significaría que está aumentando su respuesta vasodilatadora, es decir estaría mejorando la función endotelial²²⁹.

Los inhibidores de la eNOS, análogos de la L-arginina como la L-N-monometil arginina (L-NMMA) disminuyen la respuesta vasodilatadora en estos *test* en un 70 %. Por el contrario, la aspirina, es decir, la inhibición de la ciclooxigenasa, no afecta la dilatación mediada por el flujo²³⁰.

Objetivos

Con el fin de evaluar, en parte, la disfunción endotelial vascular se propusieron los siguientes objetivos:

Estudios Clínicos. Pacientes diabéticos tipo 2:

- Determinación de la activación plaquetaria y expresión de proteínas adhesivas.
- Evaluación del metabolismo del óxido nítrico (NO) y expresión de óxido nítrico sintetasas (NOS). Liberación de citoquinas y Factor von Willebrand.
- Estudio de Endotelina-1 y su interacción con el NO.
- Relación entre Insulinemia, PAI-1 y nivel plasmático del Péptido C.
- Evaluación de la función endotelial a través de la medición del diámetro arterial pre y post isquemia mecánica del brazo, mediante el uso de ecografía Doppler de alta resolución.
- Seguimiento secuencial de los parámetros metabólicos, vasoactivos y marcadores de la función endotelial en una población de individuos hipertensos bajo tratamiento con drogas antihipertensivas y en pacientes hipertensos bajo régimen higiénico-dietético sin tratamiento farmacológico.

Estudios Experimentales:

- Acción de productos de glicosilación avanzados (AGEs) en células endoteliales (CE) obtenidas a partir de cordón umbilical humano (HUVEC).
- Co-cultivo de HUVEC con eritrocitos provenientes de pacientes diabéticos tipo 2.
- Determinación de la migración de células endoteliales en presencia de AGEs.
- Estudios experimentales realizados con ratones Balb/c tratados con BSA-AGEs o BSA (albúmina sérica bovina glicosilada y sin glicosilar).
- Estudio comparativo entre macrófagos murinos y la línea celular U-937. monoblastos leucémicos de origen humano, diferenciados a macrófagos.

*Pacientes, Materiales
y Métodos*

MUESTRAS

Para el desarrollo de la presente tesis se utilizaron diferentes muestras obtenidas a partir de sangre venosa. En todos los casos se extrajo sangre a voluntarios humanos con 8 o 12 horas de ayuno, según correspondiera. Para la evaluación de los parámetros fibrinolíticos las extracciones de sangre se realizaron, estrictamente, a individuos en reposo, entre las 8 y 9 hs. de la mañana, con el menor éstasis venoso posible.

A continuación se describe la obtención de las muestras sanguíneas utilizadas:

- *Plasma en EDTA:* Salvo aclaración, se recolectaron 2.5 ml de sangre en tubos plásticos conteniendo como anticoagulante 61 μ l de una solución 7.5 % de K₃EDTA (sal tripotásica del ácido etilendiaminotetraacético). Las muestras se centrifugaron a 2.000 g durante 10 minutos. Las muestras de sangre se mantuvieron en baño de hielo por un lapso menor a 4 horas.
- *Plasma en citrato de sodio:* Se recolectó la sangre en tubos plásticos conteniendo citrato trisódico 3,8 % en una relación de nueve partes de sangre y una parte de anticoagulante.
Para la determinación de pruebas de coagulación y fibrinólisis las muestras se sometieron a doble centrifugación (2.500 x g, 10 minutos).
- *Suero:* Se colocaron 5 ml de sangre en tubos de vidrio y se incubaron en baño termostatzado a 37 °C. hasta completar el proceso de coagulación (aproximadamente 4 horas). Se centrifugó durante 10 minutos a 1.500 x g. Se separaron los sueros correspondientes.

POBLACIÓN

Dada la diversidad de grupos poblacionales evaluados, los mismos se describen en cada estudio. En todos los casos se contó con el consentimiento por escrito de los participantes.

ESTUDIOS CLÍNICOS

1. DETERMINACIÓN DE ACTIVACIÓN PLAQUETARIA EN PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2

1.1 POBLACIÓN ESTUDIADA

Se estudiaron 40 pacientes diabéticos tipo 2 (DBT 2), con más de 5 años de evolución de la enfermedad, con el objetivo de evaluar la activación plaquetaria en esta patología. Los pacientes y controles dieron su consentimiento para la realización de este estudio.

Se dividió a los pacientes en dos grupos: hospitalizados y ambulatorios.

Grupo 1: 20 pacientes DBT 2, hospitalizados de 68.7 ± 5.5 años de edad, con vasculopatía periférica, tratados con heparina sódica 7.500 U/día y 100 mg/día de aspirina. El 70 % de estos pacientes (14/20) presentaba macro y microangiopatía (coronariopatía o accidente cerebro vascular) y pie diabético y el 30 % de los pacientes restantes (6/20) presentaba microangiopatía diabética con retinopatía asociada, pero sin pie diabético.

Grupo 2: 20 pacientes DBT 2, ambulatorios de 57.0 ± 10.8 años, coronarios crónicos, tratados con 325 mg/día de aspirina.

Todos los pacientes estaban medicados con un único hipoglucemiante oral, la glibenclamida

Grupo Control: 20 individuos sanos de 59.2 ± 8.9 años, libres de medicación durante los 10 días previos a los estudios.

Las muestras de sangre de los pacientes y controles con 12 horas de ayuno se obtuvieron por punción venosa y mínimo torniquete y se determinaron los niveles de Glucemia, Hemoglobina glicosilada, Triglicéridos, colesterol total (tCol), HDL (*high density lipoprotein*) y LDL (*low density lipoprotein*) colesterol, Hemograma, Tiempo de Protrombina (TP) y Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado (TTPA) y la expresión en membrana plaquetaria de P-Selectina y de GP 53 según los métodos descriptos a continuación.

1.2 DETERMINACIÓN DE ACTIVACIÓN PLAQUETARIA

1.2.1 Determinación de la expresión de P-Selectina y GP 53 en membrana plaquetaria por inmunofluorescencia indirecta (IFI) mediante microscopía UV y citometría de flujo.

1.2.1.1 P-Selectina:

Método modificado de Mitchelson AD.²³¹

Se utilizaron los siguientes reactivos:

Buffer fosfato salino PBS, BSA 0,2 %, EDTA 10 mM pH = 7.4

Anticuerpo monoclonal anti-CD61 conjugado con fluoresceína (FITC) (Immunotech, Francia) (anti CD61: anti-GPIIIa, se utiliza como marcador de la población plaquetaria).

Anticuerpo monoclonal anti-CD62P conjugado con ficoeritrina (PE) (Immunotech, Francia) (anti CD62: anti-P-Selectina).

Combinación de isotipos IgG1-FITC / IgG1-PE. (Immunotech, Francia) (controles negativos, antisueros isotipos no específicos).

Solución de paraformaldehído 1 % (v/v) en PBS.

Trombina bovina 0,1 U/ml concentración final. (Ortho Diagnostic Systems, Inc, New Jersey, EE.UU).

i) Determinación en plasma rico en plaquetas (PRP): Se utilizó plasma con EDTA.

ii) Obtención del PRP: Se centrifugaron la muestras obtenidas a 250 x g durante 5 minutos a 25 °C. Se efectuó el recuento plaquetario y se ajustó a un valor entre 5-8 ×

10⁷ plaquetas/ml con el buffer de trabajo (BT): PBS, EDTA 5 mM, albúmina bovina (BSA) 2 %, pH 7,4.

Se trabajaron simultáneamente las muestras de pacientes y las de los individuos controles. Se realizaron un control positivo y otro negativo del día. Las muestras no procesadas inmediatamente se fijaron con solución de paraformaldehído 1 % en PBS, manteniéndolas entre 3 a 5 °C un máximo de 72 horas. Como control positivo se activaron las plaquetas con trombina humana 0.1 U/ml (concentración final) durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA).

Se procedió según indica la Tabla N° 4.

	Control negativo	Pacientes e Individuos controles	Control positivo
Buffer PBS	100 µl	100 µl	95 µl
PRP	10 µl	10 µl	10 µl
IgG1-FITC/IgG1- PE	5 + 5 µl	--	--
CD61-FITC		5 µl	5 µl
Incubar 15´ a TA en oscuridad			
CD62-PE		5 µl	5 µl
Trombina 0.1 U/ml		--	5 µl
Incubar 5´a TA en oscuridad			
paraformaldehído	120 µl	120 µl	120 µl

Tabla N° 4: Técnica de marcación de plaquetas en PRP para la determinación de P-Selectina en membrana plaquetaria.

Posteriormente se incubó 30 minutos a TA en oscuridad, se añadieron 240 µl de PBS pH 7,4 y se agitó suavemente. Se centrifugó 10 minutos a 900 x g a TA y se descartó el sobrenadante con pipeta plástica.

Se resuspendió el *pellet* en 500 µl de PBS, se observó en el microscopio de fluorescencia y se analizó en el citómetro de flujo FACScan® Becton-Dickinson

(Becton-Dickinson, EE.UU). En el grupo control se determinó un valor de 5.0 ± 0.5 % de expresión de P-Selectina en membrana plaquetaria y se tomó como valor basal para esta metodología.

iii) *Determinación en sangre entera:*

Se realizó en 10 pacientes y en 10 controles la determinación de P-Selectina en sangre entera y se evaluó si había diferencia con la realizada en PRP.

La técnica de extracción y recolección de todas las muestras fue idéntica a la de PRP.

El esquema de trabajo en sangre entera está detallado en la Tabla N° 5.

	Pacientes e		
	Control negativo	Individuos controles	Control positivo
Buffer PBS	100 µl	100 µl	95 µl
Sangre entera	25 µl	25 µl	25 µl
IgG1-FITC/IgG1-PE	5 + 5 µl	--	--
CD61-FITC		5 µl	5 µl
Incubar 15' a TA en oscuridad			
CD62-PE		5 µl	5 µl
Trombina 0.1 U/ml		--	5 µl
Incubar 5'a TA en oscuridad			
paraformaldehído	135 µl	135 µl	135 µl

Tabla N° 5: *Técnica de marcación de plaquetas en sangre entera para la determinación de P-selectina en membrana plaquetaria.*

Posteriormente se incubó 30 minutos en oscuridad, se añadieron 250 µl de PBS pH 7,4 y se agitó suavemente. Se centrifugó 10 minutos a 300 x g a TA y se descartó el sobrenadante con pipeta plástica. Se resuspendió el precipitado en 500 - 1000 µl de PBS, se observó al microscopio de fluorescencia y se analizó en el citómetro de flujo FACScan® Becton-Dickinson. La expresión de P-Selectina del grupo control dio un valor de 4.8 ± 1.0 %. No se encontró diferencia significativa entre ambas técnicas, por lo que concluimos que la técnica en PRP no produce falsos positivos. Tanto en los pacientes como en los controles, la diferencia obtenida entre los valores

de activación plaquetaria determinada en sangre entera y en PRP no fue significativa por este motivo se utilizó PRP.

1.2.1.2 GP 53:

La obtención de las muestras de pacientes y controles, la preparación del PRP y el esquema de trabajo se realizó en las mismas condiciones que para la determinación de P-Selectina en PRP, excepto en el uso del anticuerpo monoclonal contra la glicoproteína en estudio; en este caso se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-CD63 conjugado con PE (Inmunotech, Francia) (anti CD63: anti-GP 53), las cantidades son las mismas que las referidas en la Tabla N° 4 para CD62P y se analizó en el citómetro de flujo FACScan® Becton-Dickinson. Para los controles se obtuvo un valor basal de $5,2 \pm 1,4 \%$.

1.2.2 Hemoglobina glicosilada (HbA_{1c})

Se determinó en plasma anticoagulado con EDTA en el autoanalizador IMX. (ABBOTT, EE.UU).

1.2.3 Glucosa (Gl)

Se determinó en los sueros de los pacientes y controles con un ayuno de 10 horas mediante el autoanalizador Beckman (Beckman, EE.UU).

1.2.4 Hemogramas

Los hemogramas de los pacientes y controles se determinaron mediante el contador hematológico Cell Dyn 3500. (ABBOTT, EE.UU).

1.2.5 TP y TTPA.

Se utilizaron plasmas citratados y se analizaron en el coagulómetro automático BCT (Dade Behring, Marburg, Alemania).

2. DETERMINACIÓN DE ACTIVACION PLAQUETARIA Y DE ÓXIDO NITRICO PLASMÁTICO EN UNA POBLACIÓN DE PACIENTES HIPERTENSOS DIABÉTICOS TIPO 2

Se determinaron los niveles de Glucemia, Hemoglobina glicosilada, Insulinemia, $\text{TNF}\alpha$, NO, FvW, P-Selectina soluble (sP-Sel) y expresión en membrana plaquetaria de P-Selectina (P-Sel) en dos grupos de pacientes y un grupo control con el objetivo de correlacionar parámetros metabólicos con parámetros relacionados a la función plaquetaria y endotelial.

Grupo A: 32 pacientes hipertensos diabéticos tipo 2 de 64.9 ± 1.7 años, 93 % hombres, en tratamiento con sulfanilureas.

Grupo B: 37 pacientes hipertensos, estadios I y II según el Joint National Committee (JNC VI)²³² de 61.3 ± 1.7 años, 92 % hombres en tratamiento con calcio antagonistas o diuréticos.

Grupo C: 35 sujetos controles normales de 59.1 ± 2.0 años, 91 % hombres comparables en IMC, y hábitos alimentarios y de fumar. Fueron criterios de exclusión: velocidad de eritrosedimentación > 20 mm en la primera hora, evidencia serológica de hepatitis o infección por VIH, enfermedad hepática o renal aguda o crónica, neoplasias y cualquier otro tipo de enfermedad inflamatoria o infecciosa.

Las técnicas utilizadas fueron las siguientes (ver también estudio I):

2.1 DETERMINACIÓN DE P-SELECTINA SOLUBLE

Se determinaron los niveles de sP-Sel en los plasmas citratados de pacientes y controles mediante ELISA.

2.1.1 Preparación del ELISA

1. Una placa de 96 pocillos se recubrió durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo monoclonal anti-CD62P $0.2\ \mu\text{g/ml}$ en PBS.
2. Se lavó tres veces con PBS, 0.1 % de Tween 20 (PBS-T) y 0.5 % de BSA.
3. Se bloquearon sitios inespecíficos con PBS-T-BSA 1 % durante 30 minutos a TA.

4. Las muestras de plasma, obtenidas a partir de sangre recogida con 10 % de buffer ácido acético 38 mM, citrato de sodio 75 mM y dextrosa 100 mM y centrifugadas a 1.200 x g durante 10 minutos, se diluyeron 1/20 en PBS-T, 0.5 % BSA y 0.3 % de gelatina. Se incubaron 100 µl en los pocillos durante dos horas a 37°C.
5. Paralelamente, se realizó una curva de calibración con testigos de P-Selectina, concentraciones desde 0 a 50 ng/ml.
6. Se realizaron tres lavados con PBS-T.
7. Se agregó anti-P-Selectina de conejo conjugado con biotina y se incubó durante 2 horas.
8. Se agregaron 100 µl de fosfatasa alcalina conjugada con streptavidina.
9. Se realizaron tres lavados con PBS-T.
10. Se reveló la actividad de la fosfatasa alcalina con 100 µl de sustrato p-nitro fenilfosfato.
11. Inmediatamente se registró la densidad óptica a 405 nm con un lector de ELISA.

Los controles normales dieron un rango de referencia para sP-Sel de 18 a 40 ng/ml.

2.2 DETERMINACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO

Se midió la concentración de NO mediante la determinación de nitritos en plasmas heparinizados de pacientes y controles con un ayuno de 10 horas, según la técnica descrita por Moshage *et al*²³³.

2.2.3 Desproteinización de los plasmas

Los plasmas de pacientes y controles se desproteinizaron con ZnSO₄ 30 %.(500 µl de plasma + 150 µl de ZnSO₄). Se agitaron, se dejaron en reposo por el lapso de 15 minutos y se centrifugaron a 900 x g durante 20 minutos. Los sobrenadantes correspondientes se centrifugaron, obteniéndose los plasmas desproteinizados.

2.2.4 Reducción a nitrito

En los plasmas desproteinizados se realizó una reducción a nitritos por acción de la enzima nitrato reductasa (*Aspergillus Niger*, SIGMA).

2.2.5 Determinación de la concentración de nitritos

En tubos de vidrio se colocaron partes iguales de los plasmas y el reactivo de Griess (sulfanilamida 2 % en PO_4H_3 5 % y naftiletilendiamina 0.2 %). Con cada muestra se obtuvieron las mezclas correspondientes y se colocaron 200 μl de éstas en pocillos de policubetas de poliestireno. Paralelamente se realizó una curva de calibración a partir de una solución patrón de nitrito de sodio. Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Se registraron las densidades ópticas de las muestras y de la curva de calibración con un lector de ELISA a 540 nm.

2.3 DETERMINACIÓN DEL FACTOR von WILLEBRAND

Se utilizaron plasmas citratados y se determinaron las concentraciones del FvW con un ELISA comercial (Asserachrom vWF, Stago, Asnières, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El rango de referencia para este método fue de 50 a 150 %.

2.4 FACTOR DE NECROSIS TUMORAL α

Se determinaron las concentraciones de $\text{TNF}\alpha$ en plasmas citratados con un ELISA comercial *Human TNF α Immunoassay* (R & D Systems, Reino Unido), siguiendo las instrucciones del fabricante. Rango de referencia: < 15,6 pg/ml.

2.5 DETERMINACION DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE INSULINA Y HEMOGLOBINA GLICOSILADA

Se determinaron en plasmas anticoagulados con EDTA mediante el autoanalizador IMX, (ABBOTT, EE.UU).

2.6 DETERMINACION DEL NIVEL PLASMÁTICO DE GLUCOSA

Se determinó en los sueros de los pacientes y controles con un ayuno de 10 horas en el autoanalizador Beckman. (Beckman, EE.UU).

2.7 DETERMINACIÓN DEL NIVEL PLASMÁTICO DE FIBRINÓGENO

Se determinó en plasma citratado utilizando el método de von Clauss A.²³⁴ en el coagulómetro automático ACL 200 (Werfen Medicals, EE.UU).

3. ESTUDIO DE LA RELACION ENTRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE ENDOTELINA-1, OXIDO NITRICO Y FvW EN UNA POBLACIÓN DE PACIENTES HIPERTENSOS DIABÉTICOS TIPO 2.

Se evaluaron 30 pacientes hipertensos (estadios I y II, JNC VI²³²) diabéticos tipo 2 de $64,9 \pm 1,7$ años de edad, 53 % hombres, en tratamiento con sulfonilureas y calcio-antagonistas y un grupo control de 30 individuos sanos de $59,1 \pm 2,0$ años, 51 % hombres, comparables en IMC y hábitos alimentarios y de fumar. Fueron criterios de exclusión: velocidad de eritrosedimentación > 20 mm en la 1ª hora, evidencia serológica de hepatitis o HIV, enfermedad hepática ó renal aguda o crónica, otras enfermedades de tipo infeccioso o inflamatorio, cáncer o enfermedades del tejido conectivo. Se extrajo sangre a los pacientes y controles, con 10 horas de ayuno, punción venosa limpia y mínimo torniquete. Se determinaron los niveles de Glucosa, HbA_{1c}, Insulina, FvW, Triglicéridos, tCol, LDL, HDL, Fibrinógeno, NO, ET-1 y las presiones arteriales sistólica y diastólica, con el objetivo de estudiar la relación entre estas variables en diabetes e hipertensión respecto del grupo control.

Técnicas utilizadas (ver también estudios 1 y 2):

3.2 DETERMINACIÓN DE ENDOTELINA-1

Se utilizó sangre con EDTA. La centrifugación se realizó dentro de los 30 minutos de obtenida la muestra. Se determinó la concentración de ET-1 en plasma con un equipo de ELISA comercial (Human Endothelin-1 Immunoassay, R & D Systems, Minneapolis, EE.UU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Previo a la realización del ELISA se hizo una extracción con acetona, HCl 1N, agua (40:1:5), se mezcló por inversión las muestras y se centrifugaron 20 minutos a $2.000 \times g$ a $2-8^{\circ} C$. Los sobrenadantes se desecaron en un evaporador centrífugo a $37^{\circ} C$ y se procedió al ensayo por ELISA. Este procedimiento previo fue realizado debido a que los lípidos interfieren en esta determinación.

Los controles normales estuvieron en un rango de 0,3 a 0,9 pg/ml.

3.3 COLESTEROL TOTAL, HDL COLESTEROL, UREA Y CREATININA

Se determinaron en los sueros de los pacientes y controles con un ayuno de 10 horas en el autoanalizador Beckman (Beckman, EE.UU) los niveles de Colesterol total (tCol), HDL colesterol (HDL), Urea y Creatinina (Creat)

3.4 LDL COLESTEROL

Se determinaron las concentraciones de LDL colesterol (LDL) según la fórmula de Friedewald W.T.²³⁵.

3.5 PROTEINA C REACTIVA (PCR)

Se determinó PCR en el suero de pacientes y controles con un ayuno de 10 horas por el método de inmunodifusión radial (IDR) en las placas comerciales LC-Partigen (Behringwerke AG, Marburg, Alemania). Se realizó la curva de calibración con el suero estándar PCR humano comercial. La concentración de referencia para este método fue < 5 mg/l.

3.6 HOMOCISTEÍNA (tHcy) y PÉPTIDO C (Pépt C)

Se determinaron en plasma con EDTA en el autoanalizador IMX. (ABBOTT, EE.UU). En el caso de la homocisteína, las muestras fueron centrifugadas dentro de la hora de extracción e inmediatamente llevadas a -20° C, hasta su procesamiento.

4. RELACION ENTRE LOS NIVELES PLASMATICOS DE PAI-1, OXIDO NITRICO, INSULINA Y PEPTIDO C

En un grupo de 20 pacientes hipertensos (estadios I y II, JNC VI²³²) diabéticos tipo 2 de 59.1 ± 4.7 años de edad, 11 hombres y 9 mujeres, con más de 5 años de evolución de la enfermedad y función renal conservada evaluada a través de los niveles séricos de urea y creatinina, se estudió la relación entre los niveles plasmáticos de PAI-1, NO, I y Péptido C (Pépt C) y se los comparó con los de un grupo control de 17 individuos sanos comparables en edad, sexo, IMC y hábitos alimentarios y de fumar.

5. EVALUACIÓN DE LA FUNCION ENDOTELIAL POR ECO-DOPPLER PRE Y POST TRATAMIENTO CON UNA DROGA ANTIHIPERTENSIVA

Se evaluaron 14 pacientes hipertensos (estadios I y II, JNC VI²³²) diabéticos tipo 2, con más de 5 años de evolución de su enfermedad, tratados con sulfanilurea como hipoglucemiante oral, con función renal conservada (niveles séricos de urea y creatinina dentro de rangos normales) y 11 individuos sanos comparables en edad, sexo, índice de masa corporal (IMC) y hábitos alimentarios y de fumar. En la Tabla N° 6 se detallan los datos de pacientes y controles. En el momento del estudio tanto los pacientes como los controles presentaban un ayuno de 12 horas, no habían fumado ni ingerido cafeína durante ese tiempo y ninguno recibía medicación alguna que pudiera haber alterado la frecuencia cardíaca o la respuesta vasodilatadora arterial, ni sedantes. Los pacientes fueron informados detalladamente de las características de este protocolo de estudio y dieron su consentimiento escrito para la realización del mismo.

	Pacientes	Controles	p
N	14	11	NS
Edad (años)	60.6 ± 6.2	58.2 ± 5.7	NS
Hombre/Mujer	8/6	6/5	NS
IMC	26.7 ± 3.8	25.9 ± 4.0	NS
Tabaquismo (%)	28.6	27.3	NS
Sedentarismo (%)	43.9	45.4	NS

Tabla N° 6: Datos y características de los pacientes y los controles. IMC: índice de masa corporal.

5.1 EVALUACION PRE-TRATAMIENTO DE LOS PACIENTES Y DE LOS CONTROLES

Previo a la realización de la prueba los pacientes y controles permanecieron 30 minutos en reposo. En posición decúbito dorsal se les colocó una derivación electrocardiográfica de referencia y un manguito de presión desuflado en el antebrazo a estudiar y se les extrajo sangre para la determinación de NO y FvW plasmáticos. Se procedió a visualizar la arteria humeral a pocos centímetros del pliegue del codo, con un equipo de ultrasonografía Toshiba 140 (Tokio, Japón), utilizando un transductor de 7.5 Mhz, teniendo la precaución de dejarlo fijo. Se realizaron las mediciones del diámetro arterial (DA) y se tomó el valor medio de tres mediciones como DA basal pre-tratamiento (D1). Posteriormente se insufló el manguito a no menos de 200 mm Hg durante 5 minutos, teniendo en cuenta superar la presión sistólica del paciente en 30 mm Hg, para producir isquemia del antebrazo durante ese tiempo. Una vez finalizado ese período, y con el transductor ubicado en el mismo lugar, se liberó la presión del manguito y se procedió a visualizar nuevamente la arteria humeral y a los 30, 60 y 90 segundos se realizó la medición del DA²³⁶ y entre los 60 y 90 segundos se les extrajo sangre nuevamente. Se tomó el máximo valor del diámetro obtenido como DA post-isquemia pre-tratamiento (D2). Todas las mediciones fueron realizadas por el mismo profesional médico.

5.2 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO ANTIHIPERTENSIVO

Luego de finalizada la prueba de isquemia hiperémica, se administró a los pacientes la droga antihipertensiva quinapril durante 8 semanas. A los controles se les administró un placebo durante el mismo período.

5.3 EVALUACION POST-TRATAMIENTO

A las 72 horas de finalizado el tratamiento se repitió la prueba en las mismas condiciones. Se obtuvieron nuevamente valores para el DA basal y post-isquemia: DA basal post-tratamiento (D3) y DA post-isquemia post-tratamiento (D4).

5.3.1 Cálculo del porcentaje de variación del DA pre y post-tratamiento.

Se realizó según la fórmula:

Pre-Tratamiento

$$\% \text{ de variación del DA} = \frac{D2 - D1}{D1} \times 100$$

Post-Tratamiento

$$\% \text{ de variación del DA} = \frac{D4 - D3}{D3} \times 100$$

El porcentaje de vasodilatación > 10 % se tomó como valor de referencia. Se consideró mejoría en la función endotelial una variación en el DA post tratamiento en relación al DA pre-tratamiento > 2 %²³⁷.

6. EFFECTO DE DOS DROGAS ANTIHIPERTENSIVAS CON DIFERENTE MECANISMO DE ACCIÓN.

Se estudiaron 30 pacientes hipertensos (estadios I y II, JNC VI²³²) diabéticos tipo 2, con las mismas características de la experiencia realizada en 5, y un grupo de 12 controles normales **Grupo C**, comparables en edad, sexo, IMC y hábitos alimentarios y de fumar. Se dividió a los pacientes en dos grupos de 15 individuos cada uno. El **Grupo A** fue tratado con 20 mg/día de quinapril, el **Grupo B** con 5 mg/día de nebivolol y al Grupo C se le administró un placebo.

El mecanismo de acción de quinapril es a través de la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (IECA)²³⁸. El mecanismo de acción de nebivolol es producir un efecto antagonista de los β_1 -adrenoreceptores altamente cardio-selectivos (β -bloqueante), produciendo vasodilatación mediada por NO²³⁹. Tanto el IECA como el β -bloqueante son drogas antihipertensivas, pero actúan a través de mecanismos diferentes.

Los datos y características de cada grupo se detallan en la Tabla N° 7.

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	pAC	pBC
N	15	15	12	NS	NS
Edad (años)	59.1 ± 5.7	58.6 ± 5.9	56.9 ± 6.0	NS	NS
Hombre/Mujer	8/7	8/7	6/6	NS	NS
IMC (kg/m²)	27.3 ± 2.5	26.9 ± 2.8	26.7 ± 3.1	NS	NS
Tabaquismo (%)	26	26	25	NS	NS
Sedentarismo(%)	40	33	42	NS	NS

Tabla N° 7: Datos y características de los pacientes y los controles. Los valores de p entre el Grupo A y el Grupo B fueron no significativos en todos los casos.

6.1 EVALUACION PRE-TRATAMIENTO DE LOS PACIENTES Y
CONTROLES

6.1.1 MEDICIÓN DEL DA POR ECO-DOPPLER

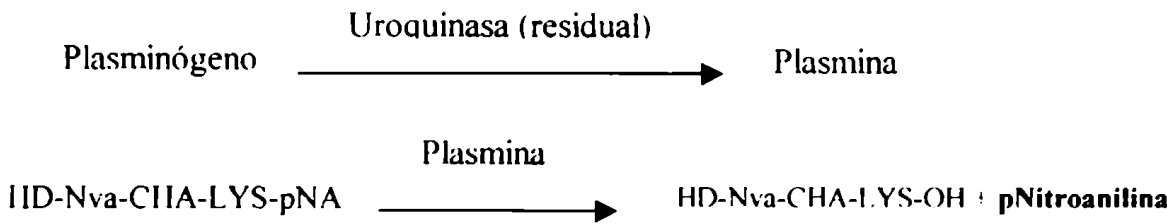
Se procedió como en el estudio 5.
En las muestras de sangre extraídas se determinaron los niveles plasmáticos de PAI-1 y FvW.

6.1.2 DETERMINACIÓN DE PAI-1

Para esta determinación se extrajo sangre a los pacientes y controles con un ayuno de 10 horas a la misma hora en las mañanas (9.00 horas) y posterior a un reposo de 1 hora aplicando mínimo éstasis venoso. La sangre se recolectó con citrato de sodio. Las muestras obtenidas se centrifugaron 15 minutos a 3500 rpm e inmediatamente se congelaron a -70°C para su posterior estudio.

La medición de la actividad plasmática de PAI-1 se realizó en un coagulómetro automático (BCT, Dade Behring, Marburg, Alemania) con el método comercial Berichrom PAI (Dade Behring, Marburg, Alemania). La curva de calibración se realizó con los estándares provistos por el fabricante.

El PAI-1 inactiva la uroquinasa que fue agregada a la muestra. La actividad residual de la uroquinasa se determina a través de la transformación del plasminógeno a plasmina. La plasmina resultante se mide a 405 nm por el desdoblamiento del sustrato cromogénico S-2251. La α_2 -antiplasmina que interfiere en la reacción, es inactivada mediante su oxidación con cloramina T.



Evaluación del rango de referencia

Para evaluar el rango de referencia de PAI-1 para este método, se analizaron 20 plasmas de sujetos normales donantes de sangre, cuya edad se encontraba entre 20 y 40 años. Se calculó la media $\pm$ 2 DE y los resultados se expresaron en U/ml.

Rango de referencia obtenido = 0.5 a 3.4 U/ml.

6.2 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO ANTIHIPERTENSIVO

Durante 8 semanas a los pacientes del Grupo A se les administró 20 mg/día de quinapril, a los del Grupo B se les administró 5 mg/día de nebivolol y al Grupo C un placebo.

6.3 REPETICIÓN DE LA PRUEBA DE ISQUEMIA HIPERÉMICA POST-TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

Se procedió como en 5.

6.3.1 Cálculo del porcentaje de variación del DA pre y post-tratamiento.

Se realizaron los cálculos de los porcentajes de variación de los DA y se tomaron los mismos valores de referencia que en 5.

7. SEGUIMIENTO DE UN GRUPO DE PACIENTES HIPERTENSOS EN TRATAMIENTO CON NEBIVOLOL.

Se evaluaron 48 pacientes hipertensos (estadios I y II. JNC VI²³²) durante 5 meses. En la fecha de inicio del seguimiento de cada paciente se registraron sus datos, se les realizó un examen clínico, se registró su tensión arterial sistólica y diastólica, su peso y talla y se les extrajo sangre. Se indicó a todos los pacientes un tratamiento con 5mg por día de nebivolol y fueron citados nuevamente para su control, tres veces más durante los 5 meses. Durante el seguimiento se registraron 4 tomas de tensión arterial y en la 4ª visita se les extrajo sangre nuevamente. Se determinaron los parámetros plasmáticos Glucosa, Insulina, perfil lipídico, NO, PAI-1 y FvW pre y post 5 meses de tratamiento con nebivolol, con el objetivo de evaluar la respuesta a dicha droga, su relación con los valores de tensión arterial y, a través de los parámetros medidos, el efecto sobre la función endotelial

8. SEGUIMIENTO DE UN GRUPO DE PACIENTES HIPERTENSOS BAJO UN RÉGIMEN HIGIÉNICO-DIETÉTICO

Se evaluaron durante 5 meses 30 pacientes hipertensos (JNC I)²³² de 57.4 ± 9.9 años de edad, 56.7 % mujeres, bajo tratamiento higiénico dietético, sin ninguna medicación antihipertensiva. En la fecha del inicio del seguimiento de cada paciente se registraron sus datos, se les realizó un examen clínico, se registró su tensión arterial sistólica y diastólica, su peso y talla y se les extrajo sangre. Se les administró una dieta baja en sodio y grasas saturadas y se les indicó un ejercicio de 30 cuerdas de caminata por día, realizada siempre a la misma hora. También se les indicó no superar la cantidad de un vaso de vino y no más de 2 tazas de café por día. Durante el seguimiento se registraron 4 tomas de tensión arterial y en la 4ª visita se les extrajo sangre nuevamente. Se determinaron los parámetros plasmáticos glucosa, insulina, perfil lipídico, NO, PAI-1 y FvW pre y post 5 meses de régimen, con el fin de evaluar el efecto de la dieta sobre los parámetros plasmáticos antes citados, la función endotelial y sobre la presión sanguínea.

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

1. CULTIVO DE CÉLULAS ENDOTELIALES HUMANAS OBTENIDAS A PARTIR DE CORDÓN UMBILICAL (HUVEC).

1.1 REACTIVOS:

- Colagenasa obtenida de *Clostridium histolyticum* (Boehringer Mannheim, Alemania), actividad específica 1.36 U/mg. Se preparó una solución de 0,25 U/ml (0,05 %) en un medio salino con calcio y magnesio pH 7,4.
- Tripsina (Gibco, EE:UU) apta para cultivos celulares. 0,05 %.
- Gelatina bovina tipo B (Sigma Chemical, EE:UU) 0,5 %.
- Medio de cultivo: M199, con bicarbonato de sodio y L-glutamina 2 mM y 20 % de suero fetal bovino (SFB)(Gibco, EE.UU) adicionado de antibiótico.
- Medio salino: Hanks o PBS con y sin calcio y magnesio (Gibco, EE.UU).
- Antibiótico: ampicilina (Sigma): 10.000 U penicilina, 10 mg streptomycin y 25 µg amphotericina B por litro de medio de cultivo.
- Heparina sódica (Sigma Chemical, EE.UU).
- Factor de crecimiento de células endoteliales: se prepara a partir de cerebro bovino, homogeneizando un cerebro de ternera limpio en NaCl 0,1 M a 4 °C a pH 7,0, luego se centrifuga, se recoge el sobrenadante y se liofiliza.

1.2 CULTIVO DE CÉLULAS ENDOTELIALES HUMANAS (HUVEC).

Todo el procedimiento se realizó bajo flujo laminar y todo el material de trabajo se encontraba en condiciones estériles.

1.2.1 Recolección y preparación de cordones umbilicales:

Se utilizaron cordones umbilicales recolectados y conservados en solución salina con antibiótico a 4 °C durante un período de hasta 7 días posteriores al parto. Se limpiaron con gasas para eliminar toda traza de sangre y se observaron atentamente de modo de eliminar las zonas lastimadas o perforadas. se seleccionaron los que presentaban un tamaño mínimo de 20 cm adecuado para un mejor aprovechamiento.

Se realizaron 6 experiencias utilizando 4 a 6 cordones cada vez.

Se colocaron los cordones en una bandeja bajo flujo laminar. Se preparó la solución de colagenasa colocándola, para su activación, a 37 °C durante 20 minutos antes de filtrar. Se utilizaron 1-2 ml por cada centímetro de cordón.

1.2.2 Encanulado de los cordones:

Ayudándose con una pinza flameada, se colocó una jeringa de 1 ml en una llave de una vía, cerrada, unida a su vez a una aguja gruesa con la cual se encanuló el cordón.

Se cortaron 2 cm de una extremidad del cordón, por medio de tijeras flameadas, sosteniendo el cordón con una pinza, se visualizaron las dos arterias umbilicales y un orificio más grande, normalmente con restos de sangre y con una pared más laxa que correspondía a la vena umbilical (Figura N° 24). En esta vena se colocó la aguja y se fijó con una pinza de Mohr (Figura N° 25).

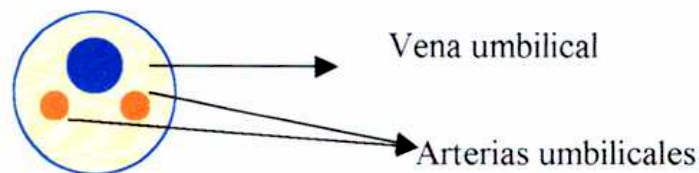


Figura N° 24: Corte transversal de un cordón umbilical, se observan la vena y las dos arterias umbilicales.

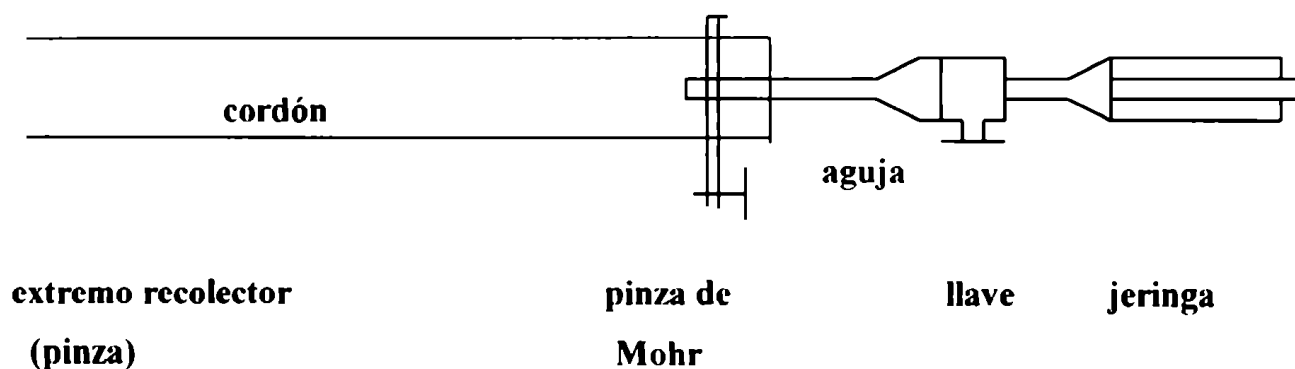


Figura N° 25: Esquema del procedimiento de encanulado del cordón.

Se procedió de esta forma con todos los cordones umbilicales disponibles. Se trabajaron de 3 a 4 cordones juntos cada vez.

Se lavó la vena con 20-25 ml de Hanks sustituyendo la jeringa de 1 ml por una de 50 ml. Se inyectaron 20-25 ml de la solución de colagenasa hasta tensar el cordón y se cerró el otro extremo con una pinza. Se cerró la llave y se colocó la jeringa de 1 ml a la salida. Posteriormente se colocaron los cordones a 37 °C durante 20-30 minutos, para dejar actuar a la colagenasa²⁴⁰.

1.2.3 Recuperación de células endoteliales primarias:

Se masajeó suavemente cada cordón tratando de despegar por completo las células del vaso. Luego se cortó el cordón en el otro extremo se lavó con 20 ml de Hanks y se recogió el contenido de la vena en un tubo de 50 ml.

Las células se centrifugaron a 600 x g durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* celular obtenido en medio M199 suplementado con 20 % de SFB y adicionado con antibiótico.

Se sembraron 5 ml en botellas de 25 cm² y se colocaron en estufa de cultivo a 37 °C y 5 % de CO₂.

A las 24 horas se eliminó el sobrenadante CE primarias para descartar los eritrocitos y restos celulares y se agregó medio de cultivo fresco. Se cambió el medio

cada 48 horas hasta que las CE formaron una capa cerrada (confluencia), que se logró aproximadamente 7 días después de la siembra.

Para un crecimiento óptimo se mezclaron las CE provenientes de varios cordones. Se obtuvieron entre 40 y 70×10^3 células por cm de cordón.

Una vez llegadas a confluencia (10^6 células/botella de 25 cm^2), se descartó el medio, se lavaron las células con medio de Hanks, se agregó 1 ml de tripsina y se dejó actuar durante 30 a 40 segundos observando al microscopio la liberación de células de la base de la botella de cultivo. Se detuvo la acción de la tripsina por el agregado de 5 ml de medio de cultivo fresco adicionado de SFB, se centrifugó durante 10 minutos a $600 \times g$ a 4°C. Luego, se resuspendieron las células en medio de cultivo fresco (primer pasaje).

Previamente se trató entre 2 horas y una noche una nueva botella de cultivo con gelatina, luego se descartó, se lavó con medio de Hanks y se distribuyeron las CE del primer pasaje.

En esta etapa se agregaron 100 µg/ml de heparina y 50 µg/ml de factor de crecimiento de CE. El medio de cultivo se renovó cada 48 horas hasta nueva confluencia y 2° pasaje de tripsina.

Se expandieron los cultivos en cada pasaje utilizando botellas de 75 cm^2 . Una botella de 25 cm^2 en confluencia contiene $1-1.2 \times 10^6$ células.

Las CE, 0.5×10^6 células/ml, se congelaron en el 2° o 3° pasaje en 90 % de SFB y 10 % de dimetil-sulfóxido (DMSO). Se conservaron 5 días a -70°C y luego se colocaron en un termo conteniendo nitrógeno líquido. La mortalidad celular al descongelar fue menor al 10 %.

1.3 ACCIÓN DE AGES Y $\text{TNF}\alpha$ SOBRE LAS HUVEC

1.3.1 Preparación de AGEs-BSA

Se incubó albúmina sérica bovina (BSA 50 mg/ml) con glucosa 50 mM en PBS durante 6 semanas a 37°C en presencia de fluoruro de p-metilsulfato (PMSF, 1.5 mM), EDTA (1 mM) y antibióticos (penicilina 100 µg/ml y gentamicina 40 µg/ml), en forma estéril y en la oscuridad. Se realizó el mismo procedimiento con BSA sin glucosa como control. Se conservaron las fracciones de albúmina glicosilada con una

lectura de densidad óptica > 85 unidades arbitrarias de fluorescencia (UFA) medida en un espectrofluorómetro. Los controles de albúmina sin glicosilar dieron 5 UFA. A posteriori se dializaron contra solución salina tamponada (PBS, pH 7.4) durante dos horas a temperatura ambiente y se conservaron a -70°C hasta su uso.

1.3.2 Control

En una placa de poliestireno de 24 pocillos se colocaron por cuádruplicado 50.000 células/pocillo y se cultivaron en presencia de BSA (300 $\mu\text{g/ml}$). Se dejaron a 37°C y 5 % CO_2 durante 48 horas. Luego se retiraron los sobrenadantes de cultivo y se conservaron a -70°C para su posterior análisis.

1.3.3 HUVEC + Agonistas

Se procedió de la misma manera que en 1.3.1 agregando diferentes agonistas.

1.3.2.1 HUVEC + BSA-AGEs 300 $\mu\text{g/ml}$

1.3.2.2 HUVEC + BSA- AGEs 300 $\mu\text{g/ml}$ + $\text{TNF}\alpha$ (17 ng/L)

1.3.2.3 HUVEC + $\text{TNF}\alpha$ (17 ng/L)

Luego se determinó la liberación del FvW por ELISA y NO por el método de Griess.

1.4 ENSAYOS DE MIGRACIÓN DE CE.

Se utilizó una placa de 24 pocillos y se trató con gelatina a 37°C durante 2 horas. Se colocaron 50.000 CE/ml/pocillo obtenidas luego del tratamiento con tripsina de un cultivo en confluencia.

A 12 pocillos se agregó anticuerpo anticaderina VE. (Sobrenadante de cultivo de hibridoma, 1B5 donado por la Dra. Elisabetta Dejana, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Milán, Italia.)²⁴¹. Las células se cultivaron durante 5 días hasta confluencia. El medio de cultivo luego se aspiró y la capa celular se dañó utilizando una punta de plástico gruesa (*tip*) removiéndose 4 diámetros regularmente distribuidos a 45° . Las células remanentes se lavaron 2 veces con medio de Hanks para remover el *debris* celular e se incubaron a 37°C en medio de cultivo.

A las 8 y 16 horas, las células se fijaron con metanol durante 20 minutos a 4 °C y se tiñeron con cristal violeta 0.5 % en metanol-agua (20:80) durante 5 minutos. Se lavaron con agua corriente cuidadosamente y se dejaron secar.

El frente de migración celular se distinguió porque presentó un teñido más tenue respecto del de las células del frente original. La distancia de migración se midió con la ayuda de una escala graduada adaptada al ocular del microscopio invertido bajo contraste de fase (100x).

El mismo experimento se llevó a cabo colocando AGEs 300 µg/ml en el medio de cultivo.

1.5 CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA DE CE: ENSAYOS DE INMUNOFLUORESCENCIA.

En presencia de AGEs, 300 µg/ml y controles con BSA (por cuadruplicado).

Se utilizaron placas de 24 pocillos. Se colocaron vidrios de 1 cm de diámetro redondos, esterilizados en la base de cada pocillo, previamente recubiertos con fibronectina humana 7 µg/ml (Sigma) durante dos horas a 37 °C. Luego se colocaron 50.000 CE/pocillo. Se dejaron crecer hasta confluencia, luego se aspiró el medio de cultivo y se recuperaron los vidrios con el crecimiento celular. Se fijaron las células con una solución de paraformaldehído 2 % en PBS durante 20 minutos a T. ambiente. En el caso de investigar un antígeno citoplasmático se permeabilizaron las membranas celulares con Tritón X-100 0.5 % durante 3 minutos. Se lavaron las células con cuidado de no despegarlas del vidrio y se incubaron con el anticuerpo primario (10 µl/vidrio) y luego con el segundo anticuerpo: anti-ratón-TRITC (anti-ratón conjugado con isómero R de isotiocianato de tetrametilrodamina, Dako.) Se incubó cada anticuerpo durante 1,5 horas a 37 °C.

Luego se lavaron y escurrieron los vidrios y se fijaron con una gota de bálsamo de Canadá (10 µl), se dejaron secar en la oscuridad durante 2 horas y se observó la fluorescencia emitida al microscopio (UV). Como anticuerpos primarios se utilizaron: anti-vWF (monoclonal antibody factor VIII-W Immunotech) y anti-iNOS (policlonal, Santa Cruz).

2. ESTUDIOS EXPERIMENTALES EN ANIMALES

2.1 RATONES

Se utilizaron ratones machos de la cepa Balb/c de entre 8 y 12 semanas de vida. Los animales fueron separados en dos grupos (**A**, n = 10 y **B**, n = 10) para someterlos a distintos tratamientos. Los ratones del **grupo A** fueron inyectados intraperitonealmente con 120 µl de una solución de albúmina sérica bovina glicosilada (5 mg/ml; 600 µg) dos veces por semana durante un período de cuatro semanas. Se siguió el mismo esquema con los ratones del **grupo B** (controles), a los cuales se inyectaron 120 µl de una solución de albúmina sérica bovina sin glicosilar (5 mg/ml; 600 µg). Posteriormente todos los animales fueron inyectados por vía intra-peritoneal con 1 ml de una solución estéril de tioglicolato frío (3 % en agua destilada). A las 48 horas los animales fueron anestesiados en una cámara cerrada saturada con éter. Se realizó una extracción de sangre mediante punción cardíaca con jeringa y aguja heparinizadas. Luego fueron sacrificados por dislocación cervical. Con posterioridad a la muerte de los animales se procedió a la extracción de macrófagos peritoneales. Se inyectaron 5 a 10 ml de PBS frío y luego se aspiró el líquido de la cavidad peritoneal y se recogieron los exudados en tubos cónicos de 15 ml de volumen. Se realizó la visualización anatómica de los animales y la extracción de los órganos (grandes vasos sanguíneos y riñones) para el estudio histológico.

2.1. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Fijación de órganos

Los órganos extraídos fueron colocados inmediatamente en una solución fijadora de ácido pícrico (solución saturada), formol 40 %, ácido acético glacial (70:25:5).

Las piezas se conservaron en la solución durante 18 horas. Pasado ese tiempo se colocaron en una solución de etanol 70 %. Posteriormente se realizó la deshidratación y la inclusión en parafina.

2.1.1 Cortes histológicos

Los tejidos parafinados fueron cortados en secciones de 5 μm de espesor y montados sobre portaobjetos. Luego se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con xilol. A continuación se realizó la hidratación de los mismos mediante lavados sucesivos con alcohol absoluto, 96 % y luego 70 % durante 5 minutos. El último lavado se hizo con PBS durante 5 minutos.

2.1.2 Coloración con hematoxilina-eosina

Se agregó hematoxilina 5 minutos y se lavó con agua corriente, agregándose entonces la eosina por 3 minutos y lavando el excedente con agua. Finalmente se deshidrataron las muestras pasándolas por alcohol 70°, 96° y absoluto sucesivamente.

2.1.3 Tinción de polisacáridos (PAS)

En algunos cortes se empleó la reacción citoquímica de PAS para determinar la presencia de macromoléculas ricas en hidratos de carbono (como los AGEs). Esta técnica se basa en la oxidación, por acción del ácido periódico, de los grupos alcohólicos vecinales de los hidratos de carbono a aldehídos. Éstos se complejan con el reactivo de Schiff (fucsina básica 1 %, meta-bisulfito de potasio 2 % y HCl 1 N 20 %) y dan un color rojo-violáceo. Se cubrieron los portaobjetos con el reactivo fijador (metanol) durante 3 minutos, luego se lavó con agua corriente. A continuación se cubrió con el reactivo oxidante (ácido periódico, 2 H_2O , 10 g/l) durante 10 minutos y se lavó con agua corriente.

Seguidamente se cubrió con el reactivo reductor (metabisulfito de sodio 5 g/l; ácido clorhídrico 1 N) durante 1 minuto. Sin lavar se cubrió con el reactivo de Schiff durante 1 hora. Se lavó tres veces consecutivas con el reactivo reductor, luego una vez con agua corriente. Finalmente se cubrió con el reactivo de contraste (hematoxilina) durante 3 minutos, se lavó con agua corriente y se dejó secar al aire.

Los preparados fueron observados por microscopía óptica y fotografiados a distintos aumentos previo montaje con bálsamo de Canadá.

2.2 MEDICIÓN DE PARÁMETROS PLASMÁTICOS

2.2.1 Glucemia

La concentración de glucosa en los sueros se determinó por el método de glucosa oxidasa (glicemia enzimática Wiener Lab) según instrucciones del fabricante.

2.2.2 Insulinemia

Para determinar el nivel de insulina en sangre de los animales se utilizó el equipo IMX (ABBOTT, EE.UU) según instrucciones del fabricante.

2.2.3 Hemoglobina glicosilada

La determinación del porcentaje de HbA_{1c} en sangre se realizó mediante el método de captura de hemoglobina glicosilada: Glycated hemoglobin-capture Reagent Pack IMX System. (ABBOTT, EE.UU), según instrucciones del fabricante.

2.2.4 Óxido Nítrico

Se determinó la concentración de nitritos en los sueros, como se describió previamente.

2.2.5 Determinación de FvW.

En los ratones Balb/c el nivel de FvW se determinó utilizando un anticuerpo policlonal obtenido en conejo, capaz de reaccionar con el FvW murino. Para ello se diseñó un método de ELISA tipo sandwich: colocando el anticuerpo en las policubetas, luego el suero murino y finalmente un segundo anticuerpo anti-IgG murino conjugado con fosfatasa alcalina.

2.3 MACRÓFAGOS PERITONEALES

Las suspensiones de líquidos peritoneales conteniendo macrófagos fueron centrifugadas a 600 x g durante 10 minutos. Se tomaron alícuotas para el recuento de células en cámara de Neubauer. La viabilidad se estimó por exclusión del colorante Trypan Blue (1:4; NaCl 4.25 %).

Otras alícuotas se utilizaron para evaluar la morfología celular mediante la fijación en portaobjetos y tinción con el colorante de May Grünwald-Giemsa. Los preparados fueron observados por microscopía óptica y fotografiados a distintos aumentos.

2.3.1 Cultivo de macrófagos peritoneales

Los macrófagos de los ratones del **grupo A** fueron colocados en una botella de cultivo de 25 cm² de superficie. Se procedió de manera similar con las células del **grupo B**. Se incubaron en medio MEM (PAA, Linz, Austria), suero fetal bovino 10 % y antibióticos (penicilina, estreptomicina y anfotericina B) durante 24 horas a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂. Luego se descartaron los sobrenadantes con las células no adherentes y se agregaron 10 ml de medio MEM, suero fetal bovino 10 %, antibióticos (penicilina, estreptomicina y anfotericina B) y lipopolisacárido (LPS, Sigma) 1 µg/ml.

Las células fueron cultivadas durante 24 horas a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂. Luego de la incubación los sobrenadantes fueron separados de las células para realizar las determinaciones pertinentes.

2.3.2 Medición de la producción de Óxido Nítrico

Se determinó la concentración de nitritos en los sobrenadantes de cultivo de macrófagos de la misma forma que en suero pero sin desproteinizar.

2.3.3 Expresión de la enzima iNOS

Se analizó la expresión de la enzima iNOS en los macrófagos por inmunoblot: dot blot, western blot e inmunocitoquímica indirecta. En experimentos de inmunofluorescencia se observó que las diferencias en la expresión de iNOS eran apreciables al microscopio de fluorescencia por lo que consideramos innecesaria la cuantificación por citometría de flujo.

2.3.4 Dosaje de proteínas totales

Se realizó por el método de Lowry O.H., *et al.*²⁴². Se cosecharon los *pellets* de los cultivos y se guardaron en tubos separados. Luego fueron solubilizados con Tritón X-100 0.5 % en PBS. Se mezclaron utilizando un *vortex* y se centrifugaron para eliminar los restos celulares. Se procedió con el método de Lowry. Antes de la lectura en el espectrofotómetro fueron centrifugados durante 20 minutos a 1200 x g para eliminar los restos de detergente y se midió la absorbancia de las soluciones a 660 nm. Se calculó la concentración de proteínas totales por extrapolación en una curva de calibración realizada en paralelo con albúmina sérica bovina.

2.3.5 Dot blot

Sobre un soporte de papel de nitrocelulosa humedecido con agua destilada y luego secado el exceso, fueron sembradas distintas cantidades de proteínas obtenidas por solubilización de los macrófagos cultivados. Se realizó un control positivo para evidenciar el reconocimiento por el segundo anticuerpo (anti FvW humano policlonal; rabbit anti-human von Willebrand Factor Code A 0082-DAKO, EE:UU) y un control negativo sin primer anticuerpo.

Se bloquearon sitios inespecíficos con leche descremada 5 % en PBS (durante 30 minutos con agitación). Se lavó con solución fisiológica. En cámara húmeda se incubó durante 1 hora con un anticuerpo específico anti-iNOS (primer anticuerpo, policlonal realizado en conejo contra la región amino terminal de la iNOS de ratón, rata y humano (rabbit polyclonal antibody against NOS2, N20, sc-651, Santa Cruz Biotechnology, Inc. no presenta reactividad cruzada con eNOS o nNOS). Se lavó con PBS (5 veces). Luego se incubó con el segundo anticuerpo (anti-inmunoglobulinas de conejo; realizado en cabra) conjugado con peroxidasa. (Peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulins DAKO P 0448) durante 1 hora en cámara húmeda. Se lavó con PBS conteniendo 0,05 % de Tween 20.

Se reveló con una solución de 4 Cl- α -naftol 0.5 mg/ml, 15 % MeOH y 0.4 % H₂O₂ 30 volúmenes en buffer Tris-HCl 50 mM (pH 7.6). Finalmente se lavó con agua corriente para detener la reacción de la peroxidasa. Los resultados obtenidos fueron digitalizados con *scanner*.

2.3.6 Western blot

Se realizó la corrida electroforética en gel de poliacrilamida 7.5 % con SDS (PAGE-SDS) en buffer Tris-glicina-SDS, pH: 8.3. Las muestras fueron pretratadas con SDS 20 %, azul de bromofenol, β -mercaptoetanol y sacarosa y calentadas durante un minuto en agua hirviendo. Se sembraron 100 μ g de proteínas por calle. Finalizada la corrida se realizó la transferencia electroforética a una membrana de nitrocelulosa (previamente humedecida con agua destilada) en buffer Tris-glicina-metanol, pH: 8.3. Luego se tiñó el gel con azul brillante de Coomassie para verificar que ésta se realizó correctamente. Se lavó brevemente la membrana con agua para eliminar el metanol y se colocó en solución salina tamponada rápidamente. Se realizó un bloqueo de sitios inespecíficos (procedimiento similar al utilizado en el dot blot). Se lavó tres veces con buffer borato pH 7.2 y una vez más con solución salina. Se incubó 18 horas a 4 °C en una solución del primer anticuerpo (1/10 en PBS).

Luego se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente en la misma solución y se lavó con PBS. Se reveló con un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa (procedimiento similar al utilizado en el dot blot). Se utilizaron los mismos anticuerpos mencionados en el dot blot.

2.3.7 Inmunofluorescencia Indirecta en macrófagos murinos.

Se prepararon extendidos de macrófagos en portaobjetos, se dejaron secar y se fijaron en acetona durante 10 minutos. Luego se dejaron secar hasta evaporar la acetona (1 hora mínimo). Se hizo un bloqueo de sitios inespecíficos (leche descremada 5 % en PBS durante 30 minutos con agitación). Se marcaron los bordes del extendido con lápiz de cera y se agregó el primer anticuerpo (ver dot blot, dilución 1/5) sobre el portaobjetos dentro de los límites de la cera.

Se incubó 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente. Luego se realizaron tres lavados con PBS. Se incubaron con el segundo anticuerpo fluorescente (anti- inmunoglobulinas de conejo, realizado en cabra, goat anti-rabbit IgG Fluorescein conjugate sc-2012, Santa Cruz Botechnology dilución 1/100 en PBS) durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente y en la oscuridad. Se

realizaron 3 lavados con PBS y se observaron los preparados al microscopio de fluorescencia.

3 LÍNEA CELULAR U-937

3.1 CULTIVO DE LAS CÉLULAS

Se cultivaron 2×10^5 células/ml en medio MEM, suero fetal bovino 10 % y antibióticos (penicilina, estreptomicina y anfotericina B) durante 48 horas a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂. Se agregó AGE-BSA (tratadas) o sólo BSA (controles) al medio de cultivo en concentraciones crecientes (50-250 µg/ml) y se incubó por 24 horas. Luego se incubó con LPS (1 µg/ml) e IFN-γ (50 U/ml) durante 24 horas.

3.2 DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS U-937.

2×10^5 células U-937/ml suspendidas en el medio RPMI, SFB 10 %, antibióticos, DMSO 1 % se colocaron en una placa de 24 pocillos de 1 ml de volumen final cada uno. Se dejaron durante 48-72 horas a 37 °C y 5 % CO₂ hasta diferenciación a macrófagos. Se observaron alícuotas de células teñidas con May-Grünwald-Giemsa. Se realizaron recuentos celulares cada 24 horas, durante la diferenciación celular el recuento celular no debe aumentar. Luego se eliminaron el medio sobrenadante, se efectuaron dos lavados con PBS y se colocó el medio MEM, SFB 1 % y antibióticos durante 2 horas. Se realizó el *test* de viabilidad con Trypan Blue. A continuación se agregó BSA-AGE o BSA, según correspondió, al cultivo y se incubó durante 24 horas a 37 °C y 5 % CO₂. Luego, se efectuó la inducción con TNFα, PMA o LPS, de acuerdo al caso, durante 4-24 horas a 37 °C y 5 % CO₂ (Figura N° 26). Se determinaron nitritos en el sobrenadante y expresión de iNOS en las células. Se realizaron controles celulares y de inducción de acuerdo al caso.

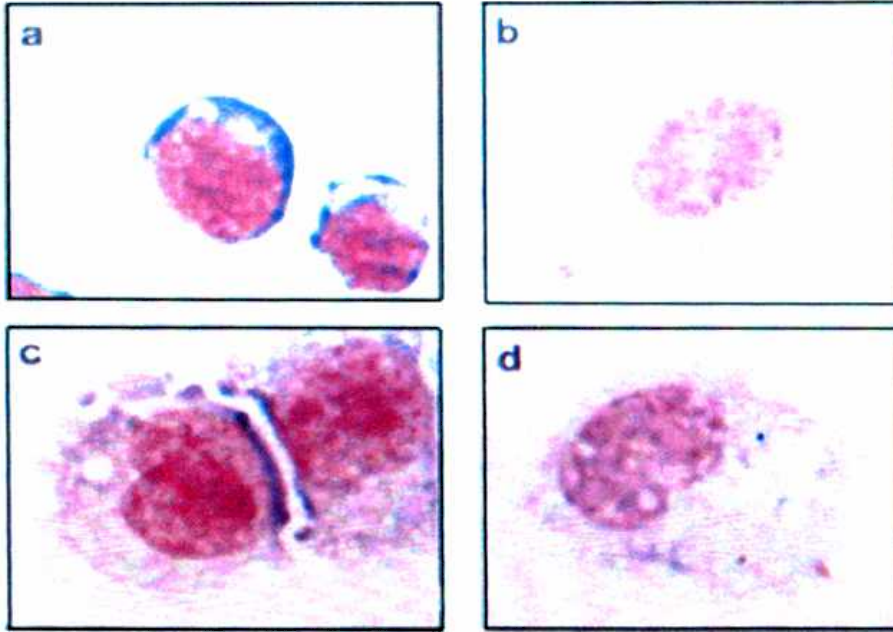


Figura N° 26: Diferenciación de la línea celular U 937 a macrófagos. a: U937 original; b, c y d: distintas etapas de diferenciación.

3.3 MEDICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO

Se midieron los niveles de nitritos en los sobrenadantes de cultivo con el reactivo de Griess.

3.4 EXPRESIÓN DE LA ENZIMA iNOS

Se analizó mediante las técnicas de dot blot y western blot.

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron tres series de experimentos independientes por triplicado para ambos tipos celulares (macrófagos peritoneales murinos y U-937). Los valores se expresaron como la media $\pm$ 2DE. Se utilizó el *test t* de Student para datos pareados. Valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Para el análisis estadístico y la presentación de los datos se utilizó el programa SPSS.

A continuación se enumeran los parámetros y pruebas realizadas²⁴³.

Análisis de datos cuantitativos

Para evaluar la distribución de las variables analizadas se realizaron histogramas y gráficos de tipo *Box & Wisker plot*. Se probó normalidad con el *test* de Shapiro-Wilk.

Se calcularon medidas de posición y dispersión. Los resultados fueron expresados como media $\pm$ DE, o S.E.M. (distribuciones simétricas) o mediana y rango (distribuciones asimétricas).

Medidas de posición

Media: promedio aritmético de las observaciones. Es una medida muy sensible a la presencia de datos anómalos (*outliers*).

Mediana: dato central, divide a la muestra ordenada en dos partes de igual tamaño. Es una medida resistente a la presencia de datos atípicos.

Medidas de dispersión

- *Desvío estándar* (DE): dispersión de los datos alrededor de su media.

Error estándar de la media (S.E.M. en inglés): es el desvío estándar de las medias en una distribución muestral.

Rango: diferencia entre el dato mayor y el menor. También se expresó mostrando el valor máximo y el mínimo de los datos.

Coefficiente de Variación (CV): desvío estándar dividido por la media, multiplicado por 100 (%). Es el modo de expresión del DE como porcentaje de la media.

- *Percentiles* (α %): dato de la muestra ordenada que deja α de valores debajo de sí mismo. Los percentiles 2.5 % y 97.5 % se utilizaron para determinar los límites del rango de fibrinógeno.

Cuando los datos mostraron una distribución normal, esos límites coinciden con los valores de la media ± 1.96 DE, conteniendo el 95 % central de los resultados.

Comparación de poblaciones

Según las características de los datos a evaluar, se utilizaron pruebas paramétricas y no paramétricas: *test* de Student, *test* de *z*, *test* del signo y *test* de Mann-Whitney-Wilcoxon. En todos los casos se consideró significación estadística cuando el valor de *p* resultó menor a 0.05.

Pruebas de asociación

Para evaluar la asociación entre dos variables numéricas se utilizaron diagramas de dispersión (*Scatter plot*). Se realizaron análisis de regresión lineal y para describir el grado de asociación entre las variables se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson (cuando los datos presentaron distribución normal) o de Spearman (cuando la distribución no fue normal).

Comparación de métodos analíticos

Para comparar las técnicas de determinación de PRP y sangre entera en la determinación de activación plaquetaria y establecer la equivalencia de ambos métodos se realizó la prueba de Bland J.M.-Altman D.G.²⁴⁴.

Resultados
y
Discusión

Estudios Clínicos

ESTUDIOS CLÍNICOS

- **EVALUACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE FIBRINÓGENO EN UNA POBLACIÓN DE INDIVIDUOS SANOS Y SU RELACIÓN CON EL PESO, PERFIL LIPÍDICO, GLUCEMIA Y HÁBITO DE FUMAR.**
- **ESTUDIOS CLÍNICOS EN PACIENTES DIABÉTICOS E HIPERTENSOS.**

ESTUDIO DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DEL FIBRINÓGENO EN UNA POBLACIÓN DE INDIVIDUOS SANOS Y SU RELACIÓN CON EL PESO, PERFIL LIPÍDICO Y HÁBITO DE FUMAR.

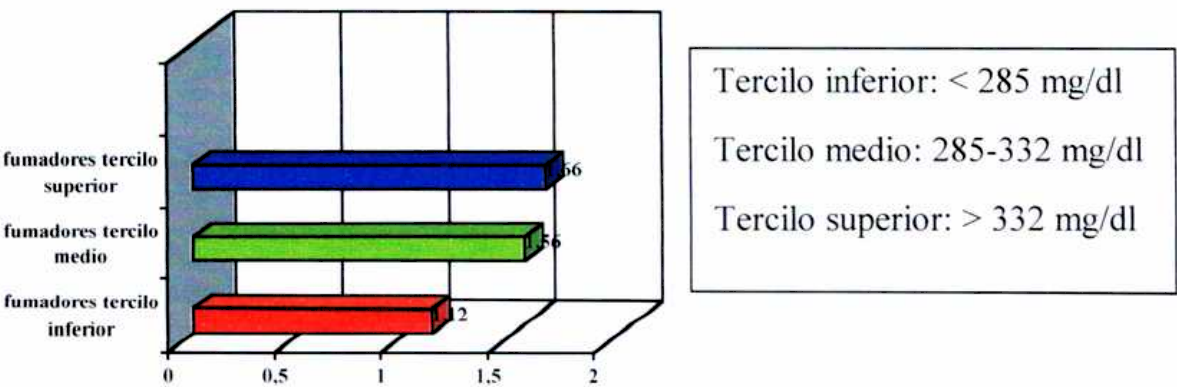
Se determinó el rango de referencia del nivel plasmático de Fibrinógeno (Fg) en una población de 2059 individuos sanos, 57 % del sexo masculino, de 39.9 ± 9.0 años de edad y su relación con los niveles plasmáticos de colesterol total (Ct), HDL colesterol (HDL), LDL colesterol (LDL), Triglicéridos (TG) y Glucosa (Gl), también con el peso corporal (P), las Tensiones arteriales sistólica (TAS) y diastólica (TAD) y el hábito de fumar. Se tomaron en cuenta las normativas del Comité de expertos en estandarización de la Sociedad Internacional de Hemostasia y Trombosis²⁴⁵.

La concentración plasmática de Fg se determinó por el método de Clauss en el coagulómetro automático ACL 200 (Werfen Medicals, EE.UU) en plasmas obtenidos por centrifugación de las muestras de sangre anticoaguladas con citrato de sodio a 1.500 x g durante 15 minutos. Los niveles plasmáticos de Ct, TG, HDL y Gl se determinaron en el autoanalizador Beckman (Beckman, EE.UU). Los resultados se expresaron como media $\pm$ desvío estándar (DE)

Tabla de resultados:

Fg (mg/dl)	315.27 ± 62.0
P (kg)	84.4 ± 13.0
tCol (mg/dl)	203.7 ± 43.0
TG (mg/dl)	144.5 ± 108.0
HDL (mg/dl)	44.0 ± 10.0
LDL (mg/dl)	131.0 ± 38.0
Gl (g/l)	1.07 ± 0.20
TAS (mm Hg)	132.8 ± 12.0
TAD (mm Hg)	81.3 ± 9.0
% de fumadores	43.5

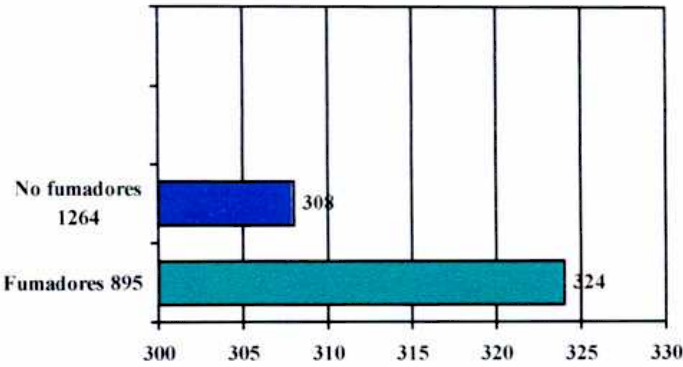
Se dividió a la población en terciles según el valor de Fg:



El Fg correlacionó con el P ($p < 0,05$), tCol ($p < 0,03$), LDL ($p < 0,05$), TAS ($p < 0,01$) y TAD ($p < 0,05$).

El número de cigarrillos promedio que consumían los individuos fumadores fue de $14,1 \pm 10,0$ cigarrillos por día. El nivel de Fg fue significativamente más elevado en los individuos fumadores que en los no fumadores:

Fg (mg/dl) Fumadores	$324,44 \pm 65,6$	$p < 0,001$
Fg (mg/dl) No fumadores	$308,2 \pm 58,0$	



En los individuos fumadores se encontró una correlación directa entre los niveles plasmáticos de Fg con:

el número de cigarrillos/día ($p < 0.05$), P ($p < 0.03$), tCol ($p < 0.01$), LDL ($p < 0.05$), Gl ($p < 0.001$), TAS ($p < 0.05$) y TAD ($p < 0.05$) y una correlación inversa con HDL ($p < 0.05$).

En los individuos no fumadores no se encontraron diferencias significativas de los resultados obtenidos para la población general.

La mayoría de los individuos fumadores se ubicaron en el tercio medio y superior: 72% ($p < 0.001$) con respecto a los no fumadores que se ubicaron en el tercio inferior: 48 % ($p < 0.03$). La probabilidad de un fumador de tener un nivel de Fg < 285 mg/dl fue OR: 1,12 (IC = 95 %, 0.89-1.48). La probabilidad de un fumador de tener un nivel de Fg > 285 mg/dl fue OR: 1.56 (IC = 95 %, 1.13-1.98) y en el tercio superior OR: 1.46 (IC 95% = 0.9-2.1).

Conclusión el hábito de fumar se relacionó con las concentraciones más elevadas de Fg plasmático, por lo tanto los estudios que incluyan la determinación de Fg deberían indicar el porcentaje de fumadores presente en la población estudiada, en particular, en la evaluación de la angiopatía presente en los pacientes diabéticos e hipertensos.

Los datos obtenidos presentaron una distribución normal luego el rango de referencia se expresó como Media ± 1.96 DE.

El rango de referencia del nivel plasmático de Fg utilizado para los estudios clínicos posteriores fue:

$$193.27 - 437.27 \text{ mg/dl.}$$

$$\text{Media} \pm 2 \text{ DS} = 315.27 \pm 124.00 \text{ mg/dl.}$$

1 ACTIVACIÓN PLAQUETARIA EN ANGIOPATÍA DIABÉTICA TIPO 2

1.1 RESULTADOS

No se encontraron diferencias significativas entre los niveles séricos de lípidos (TG, LDL, HDL y tCol) entre los pacientes del **Grupo 1** y los del **Grupo 2**. El recuento de plaquetas en sangre periférica en promedio fue de (Media ± DE): $278.3 \pm 49.9 \times 10^9/l$ (rango de referencia = $150 - 450 \times 10^9 /l$).

El TP y APTT y los hemogramas de todos los individuos estudiados se hallaron dentro de los rangos normales. La Tabla N° 8 muestra los valores obtenidos para Glucemia (Gl), Hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}), expresión de P-Selectina (CD62P) y GP 53 (CD63) en las muestras de los pacientes y los valores normales.

	Grupo 1	Grupo 2	Valores normales
Gl (g/l)	1.89 ± 0.75	1.60 ± 0.70	0.70 – 1.10
HbA _{1c} (%)	10.5 ± 3.4	8.5 ± 3.1	6.5 ± 0.8
CD62P (%)	39 ± 31	4.0 ± 0.7	5.0 ± 0.5
CD63 (%)	27 ± 23	4.2 ± 0.9	5.2 ± 1.4

Tabla N° 8: Resultados de la evaluación de Gl, HbA_{1c} y de expresión en membrana plaquetaria de P-Selectina (CD62P) y de GP 53 (CD63) determinadas por citometría de flujo. Gl: Glucemia; HbA_{1c}: Hemoglobina glicosilada. Los valores obtenidos están expresados como Media ± DE. Se encontraron diferencias significativas entre el Grupo 1 y el Grupo 2 en los parámetros de activación plaquetaria CD62P y CD63 ($p < 0.05$).

El **Grupo 1** se separó en dos subgrupos según el grado de vasculopatía periférica presentado por los pacientes. Los resultados se detallan en la Tabla N° 9.

	Pacientes con vasculopatía periférica severa o moderada	Pacientes con vasculopatía periférica leve
Gl (g/l)	2.18 ± 0.59	1.34 ± 0.23
HbA _{1c} (%)	11.8 ± 2.9	8.5 ± 1.6
CD62P (%)	53 ± 23	15 ± 5
CD63 (%)	37 ± 25	15 ± 5

Tabla N° 9: Evaluación de Gl, HbA_{1c}, CD62P y CD63 en los pacientes del Grupo 1 separados según el grado de la vasculopatía presentada. Los resultados están expresados como Media ± DE. Se encontraron diferencias significativas (p < 0,05) entre los dos grupos de pacientes en los parámetros medidos

1.2 CORRELACIONES

En el **Grupo 1** se halló una correlación positiva entre Gl y CD63 (p < 0.0003) y entre Gl y CD62P (p < 0.01). HbA_{1c} y CD62P (p < 0.05) y CD62P y CD63 (p < 0.0005). La Figura N° 27 muestra las curvas correspondientes al análisis de regresión (coeficientes de correlación de Pearson) en este grupo de pacientes. Los histogramas de citometría de flujo para la determinación de CD62P y CD63 se detallan en las Figuras N° 28, 29 y 30.

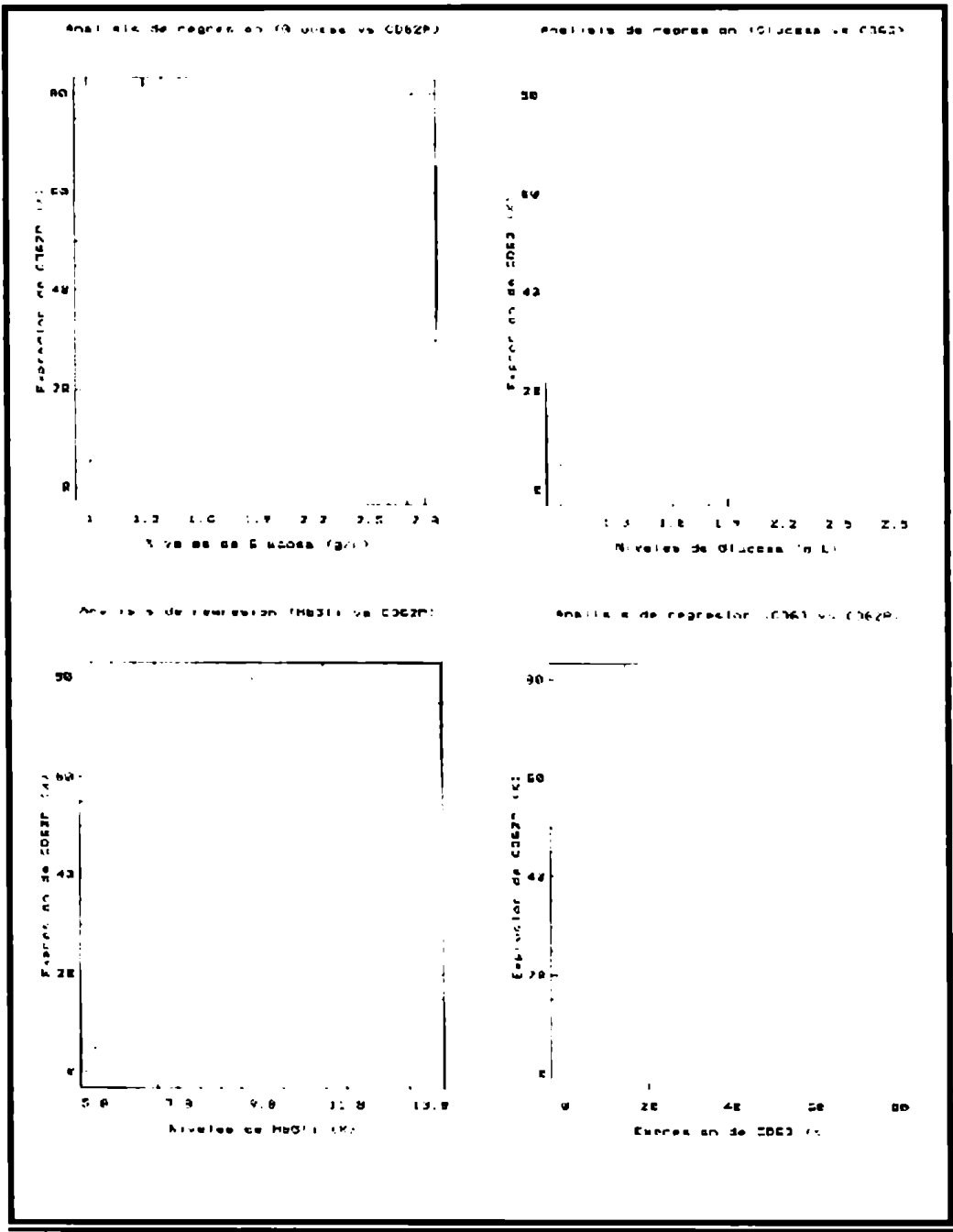
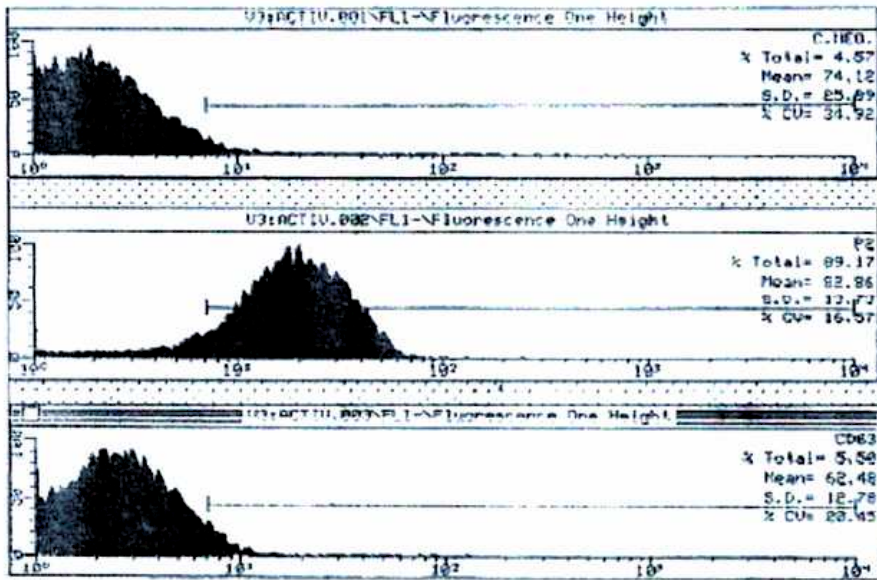


Figura N° 27: Análisis de regresión simple. Curvas de correlación entre Gl y CD63 ($p < 0,0003$); entre Gl y CD62P ($p < 0,01$); entre HbA_{1c} y CD62P ($p < 0,05$) y entre CD62P y CD63 ($p < 0,0005$).



B

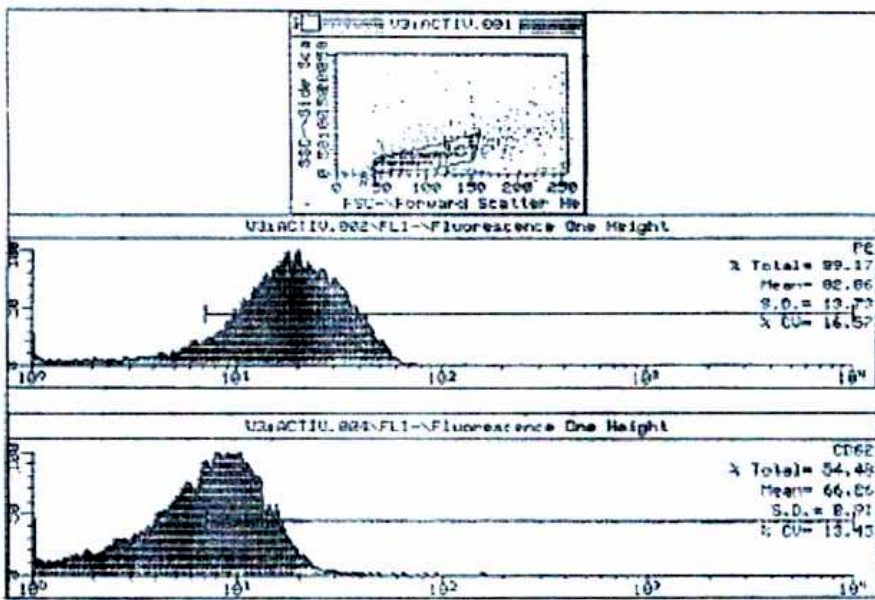


Figura N° 28: Marcadores de activación plaquetaria. Histogramas de citometría de flujo **A**: control negativo de CD62P, control de población plaquetaria con GP IIbIIIa (P₂) y control negativo de CD63; **B**: expresión de GP IIbIIIa plaquetas activadas y de CD62P en plaquetas activadas.

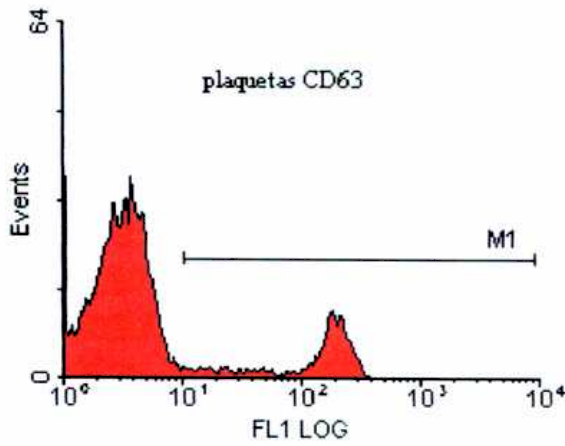


Figura N° 29: Análisis de las plaquetas de un paciente del Grupo 1 marcadas con anticuerpo anti-CD63. Programa WinMDI 2,8. Histograma de 10.000 eventos. Se observa positividad débil: 20 % de las plaquetas.

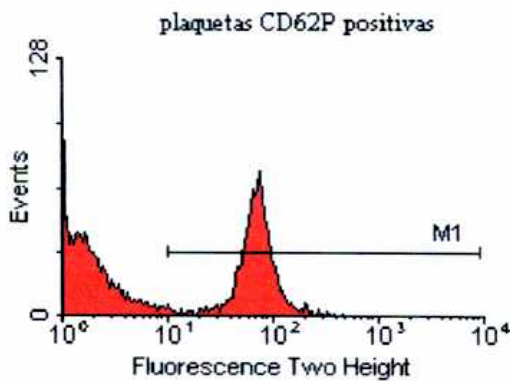


Figura N° 30: Análisis de plaquetas de un paciente del Grupo 1 marcadas con anticuerpo antiCD62P. Programa WinMDI 2,8. Histograma de 10.000 eventos. Se observa positividad de 45 % de las plaquetas.

1.3 DISCUSIÓN

Dentro de las complicaciones que presentan los pacientes diabéticos, la microangiopatía refleja, a largo plazo, junto al daño renal, las alteraciones metabólicas propias de esta enfermedad. La activación plaquetaria correlaciona con el daño endotelial producido y la liberación de factores estimulantes.

La expresión de CD62P y CD63 en la membrana plaquetaria es consecuencia de la acción de agonistas tales como trombina, ADP, colágeno, etc. Los pacientes DBT tipo 2 estudiados se dividieron en dos grupos. Dentro del **Grupo 1**, el 70 % (14/20 pacientes) expresaron los mayores niveles de CD62P y CD 63, que correspondieron a los niveles más elevados de Gl y HbA_{1c} (Tablas N° 8 y N° 9).

En el **Grupo 2** de pacientes, con características clínicas diferentes al **Grupo 1**, se hallaron niveles similares de Gl y HbA_{1c}, (Tabla N° 8) sin embargo, ninguno de los casos presentó vasculopatía periférica evidenciable ni expresión CD62P y/o CD63 en la membrana plaquetaria. En estos pacientes, con menor daño endotelial, la dosis de aspirina administrada (325 mg), sería adecuada para inhibir la activación plaquetaria.

En el **Grupo 1** de pacientes, en presencia de vasculopatía periférica, se produjo activación plaquetaria y consecuentemente, se expresaron P-Sel y GP 53 en la membrana plaquetaria, aún en los casos con daño endotelial menor (30 % de la población).

La HbA_{1c} se ha utilizado como índice de disfunción de proteínas involucradas en las señales de transducción. La formación de productos de glicosilación finales (AGEs), debida a la persistente hiperglucemia y la consecuente glicosilación de proteínas estructurales y plasmáticas, afectarían la función endotelial en los pacientes diabéticos y favorecerían la activación plaquetaria.

2. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL, OXIDO NITRICO Y ACTIVACION PLAQUETARIA EN HIPERTENSIÓN Y DIABETES TIPO 2.

2.1 RESULTADOS

En la Tabla N° 10 se detallan los resultados de los dos grupos de pacientes y del grupo de controles. Se encontró una diferencia significativa en los niveles plasmáticos de NO entre los tres grupos (Figura N° 31), en la expresión de CD62P en membrana plaquetaria (Figura N° 32) y en los niveles de Insulina.

	GRUPOS			Comparaciones entre Grupos (p)		
	A	B	C	A vs B	A vs C	B vs C
N	32	37	35			
HbA _{1c} (%)	9,58±0,33	6,6±0,09	5,90±0,07	<0,001	<0,001	<0,01
Gl (g/l)	1,43±0,07	0,98±0,02	0,86±0,01	<0,001	<0,005	<0,001
I (UI/ml)	14,4±1,7	10,3±0,6	8,2±0,3	<0,05	<0,001	<0,01
CD62P (%)	38,2±3,5	8,4±0,9	5,6±0,2	<0,001	<0,001	<0,005
TNFα (pg/ml)	21,3±2,5	16,3±0,3	15,1±0,2	<0,05	<0,001	NS
NO (μM)	68,3±3,7	56,1±3,1	39,3±2,2	<0,01	<0,001	<0,001
FvW (UI/ml)	1,43±0,05	1,21±0,04	1,13±0,04	<0,05	<0,05	NS
sP-Sel (ng/ml)	48,9±3,8	40,4±2,9	37,5±0,8	NS	<0,05	0,05
TAS (mmHg)	149,0±2,1	145,0±2,1	128,0±1,7	NS	<0,001	<0,001
TAD (mmHg)	90,0±1,6	86,0±1,3	81,0±1,4	NS	<0,001	<0,001

Tabla N° 10: Parámetros clínicos y de laboratorio de pacientes y controles.

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

HbA_{1c}: Hemoglobina glicosilada; Gl: glucemia; I: Insulinemia; sP-Sel : P-Selectina soluble; TAS : Tensión arterial sistólica; TAD : Tensión arterial diastólica.

Se hallaron diferencias significativas en los niveles del FvW entre los **Grupos A** y **B** ($p < 0.05$) y entre los **Grupos A** y **C** ($p < 0,05$), sin embargo, entre **B** y **C** no se detectaron diferencias (Figura N° 33).

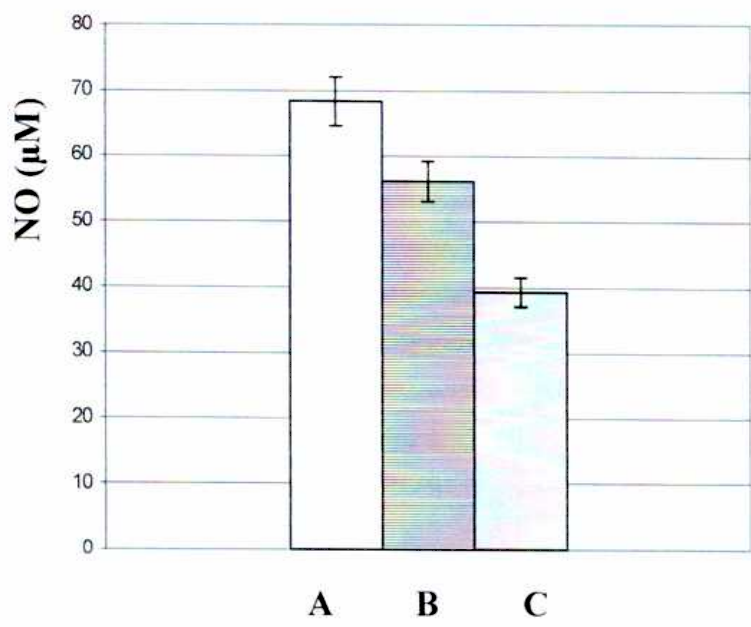


Figura N° 31: Niveles plasmáticos de NO. Determinados como nitritos + nitratos en plasmas heparinizados por el método de Griess. Grupo A vs B $p < 0,01$; Grupo A vs C, $p < 0,001$; Grupo B vs C, $p < 0,001$

Los niveles plasmáticos de $\text{TNF}\alpha$ se encontraron elevados en el **Grupo A** respecto del **B** y del **C** ($p < 0,05$ y $p < 0,001$ respectivamente), pero no entre el **Grupo B** y el **Grupo C**.

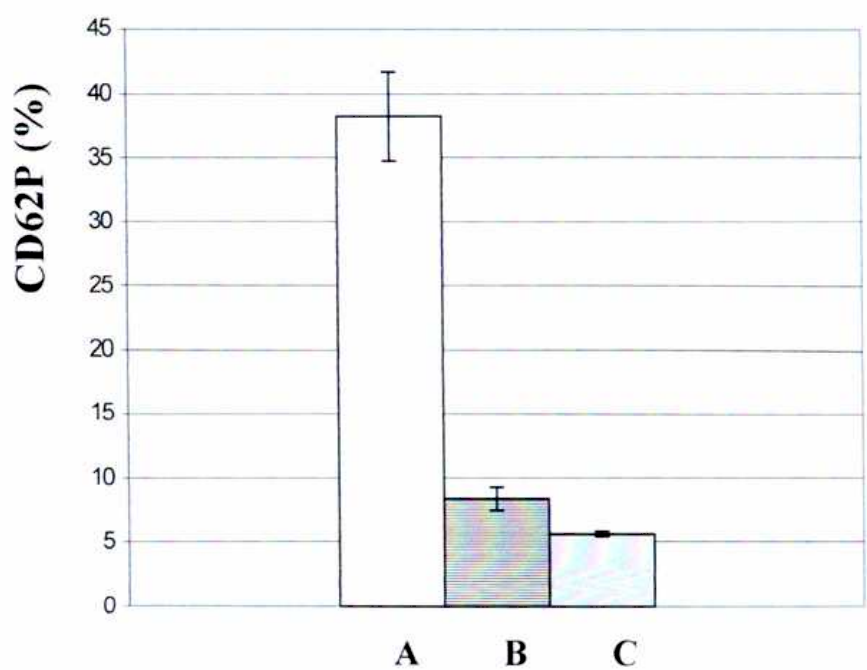


Figura N° 32: Expresión plaquetaria de CD62P (%) determinada por citometría de flujo. Grupo A vs B $p < 0,001$; Grupo A vs C $p < 0,001$; Grupo B vs C $p < 0,005$

El nivel plasmático de sP-Sel, considerado un marcador de activación plaquetaria, se encontró aumentado en el **Grupo A** respecto del **Grupo B** ($p < 0,05$) y respecto de **C** ($p < 0,001$). Como se detalla en la Tabla N° 10, los valores de I, Gl, y HbA1c en los **Grupos A** y **B** resultaron significativamente más elevados que los del grupo control, a pesar de que para el **Grupo B** estos valores se encontraron dentro de rangos normales.

Las pruebas de coagulación TP y TTPA y los hemogramas de todos los sujetos estudiados estuvieron dentro de los rangos de referencia.

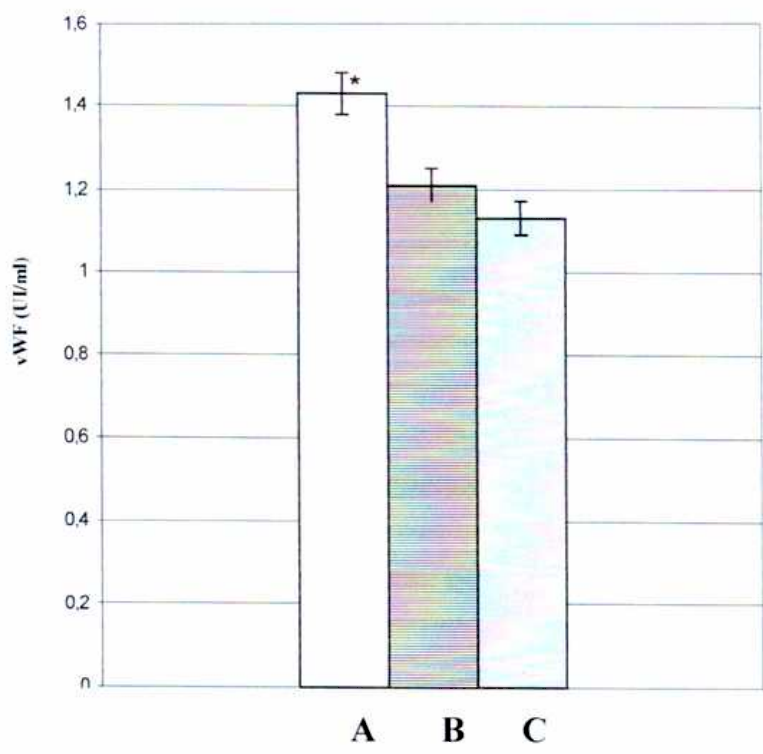


Figura N° 33: Niveles plasmáticos de FvW determinados por el método ELISA. Grupo A vs B $p < 0,05$; Grupo A vs C $p < 0,05$; Grupo B vs C p NS.

2.2 CORRELACIONES

En el **Grupo A** se observó una correlación positiva entre CD62P y HbA1c, Gl e I ($p < 0,001$). En la Figura N° 30 se muestra la correlación entre CD62P e I. En el mismo grupo de pacientes se halló correlación entre I con sP-Sel y NO ($p < 0,006$ y $p < 0.01$ respectivamente). En la Figura N° 34 se observa la correlación entre NO e I. En el **Grupo B** sólo se encontró una correlación positiva entre NO e I ($p < 0,001$) que se detalla en la Figura N° 35.

Figura N° 34: Correlación entre CD62P e I en el Grupo A. Coeficiente de correlación de Pearson $r = 0,9521$; $r^2 = 0,9066$; $p < 0,01$

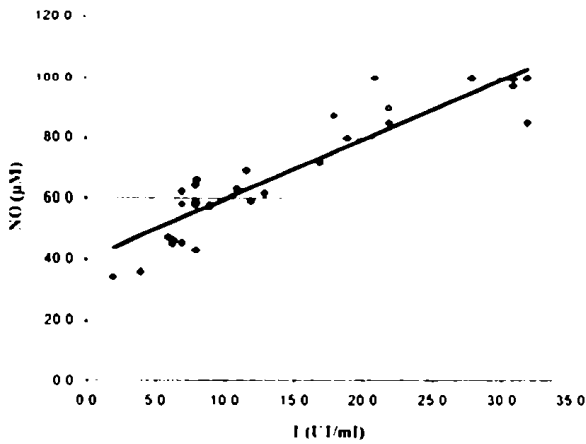
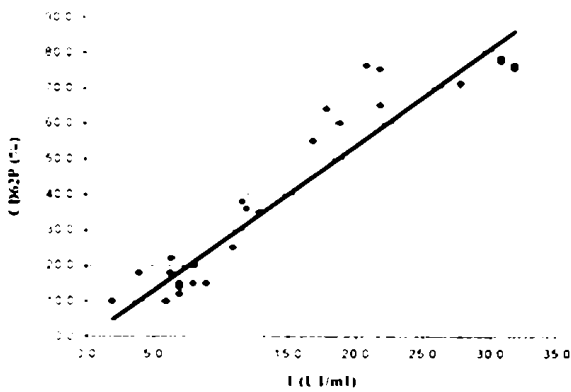
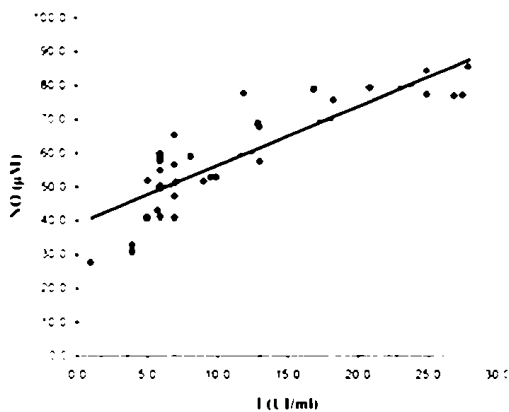


Figura N° 35: Correlación entre NO e I en el Grupo A. Coeficiente de correlación de Pearson $r = 0,9226$; $r^2 = 0,8512$; $p < 0,01$.

Figura N° 36: Correlación entre NO e I en el Grupo B. Coeficiente de correlación de Pearson $r = 0,8536$; $r^2 = 0,7287$; $p < 0,001$.



2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como media $\pm$ DE. Se consideró significativo un nivel de $p < 0.05$. Las comparaciones entre grupos se realizaron con el *t test* y el análisis de correlaciones de Pearson.

2.4 DISCUSIÓN

Los AGEs se acumulan en los tejidos en función del tiempo y de la concentración de glucosa e inducen alteraciones permanentes en los componentes de la matriz extracelular, estimulan la liberación de citoquinas y la producción de especies reactivas de oxígeno a través de receptores específicos y modifican las proteínas intracelulares. En el **Grupo B**, de pacientes hipertensos, los niveles de I se encontraron significativamente elevados respecto del **Grupo C**; algunos autores han reportado que la hipertensión arterial podría considerarse un estado de insulino-resistencia con niveles elevados de dicha hormona para mantener el nivel de glucemia relativamente normal²⁴⁶.

A pesar de los altos niveles de NO encontrados en los pacientes estudiados, el estado hipertensivo persistió; en estas situaciones la biodisponibilidad de NO podría estar reducida por mecanismos que involucrarían al anión superóxido. Los niveles aumentados de NO podrían ser citotóxicos y estar relacionados con la fisiopatología del infarto de miocardio, cardiomiopatía y shock séptico²⁴⁷.

Tanto en el **Grupo A** como en el **Grupo B** correlacionaron los niveles de NO e I. Esta correlación se explicaría debido a que la I induce la expresión del mRNA de la iNOS y también la de eNOS, produciendo, por lo tanto, un aumento en la síntesis de NO. El aumento de la liberación de $\text{TNF}\alpha$ está asociado a una mayor cantidad de NO, debido a que esta citoquina proinflamatoria induce la expresión de la iNOS. Los niveles elevados de HbA_{1c} y GI correlacionaron con el aumento de expresión de CD62P, es decir, con el aumento de activación plaquetaria en los pacientes diabéticos.

No se observó correlación entre los niveles plasmáticos de FvW y de sP-Sel, sugiriendo que esta última tendría un mecanismo de liberación que no dependería de los mismos parámetros que el FvW, lo que indicaría que sP-Sel podría ser un producto de liberación endotelial y mayoritariamente plaquetaria en estos pacientes. En el **Grupo A** se encontró también una correlación positiva de la I con P-Sel y con CD62P, indicando

que la insulinemia estaría directamente relacionada a la activación plaquetaria en los pacientes hipertensos diabéticos tipo 2.

3 ENDOTELINA Y OXIDO NITRICO EN PACIENTES HIPERTENSOS Y DIABÉTICOS TIPO 2.

3.1 RESULTADOS

Los resultados obtenidos en los pacientes estudiados y los controles se detallan en la Tabla N° 11. Los niveles plasmáticos de ET-1 y NO de los pacientes se encontraron significativamente elevados respecto de los controles ($p < 0.01$ y $p < 0.05$). Se encontró una correlación positiva entre NO e I ($p < 0.05$) (Figura N° 37) y NO y FvW ($p < 0.05$) (Figura N° 38) en el grupo de pacientes.

En este estudio se determinó también la homocisteinemia, como factor de riesgo vascular asociado a la ET-1.

En la población de pacientes diabéticos estudiada el nivel plasmático de homocisteína resultó: $16.35 \pm 4.48 \mu\text{M}$. No hubo diferencias significativas con el valor hallado en los controles ($15.0 \pm 7.4 \mu\text{M}$).

	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 (U/ml)	1.65±0.05	1.09±0.04	<0.05
HbA _{1c} (%)	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
tCol (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
PCR (mg/dl)	0.77±0.56	0.50±0.05	<0.05
Fg (mg/dl)	368.8±2.9	315.3±62.0	<0.05
TAS (mmHg)	155.3±0.5	128.0±0.9	<0.05
TAD (mmHg)	95.2±0.3	81.0±0.1	<0.05

Tabla N° 11: Parámetros plasmáticos de los pacientes y controles. ET-1: Endotelina-1; NO: Óxido Nítrico; FvW: Factor von Willebrand; HbA_{1c}: Hemoglobina glicosilada; Gl: Glucemia; I: Insulinemia; TG: Triglicéridos; tCol: Colesterol total; PCR: Proteína C reactiva; Fg: Fibrinógeno; TAS: Tensión Arterial Sistólica y TAD: Tensión Arterial Diastólica. Los resultados se expresan como Media ± DE.

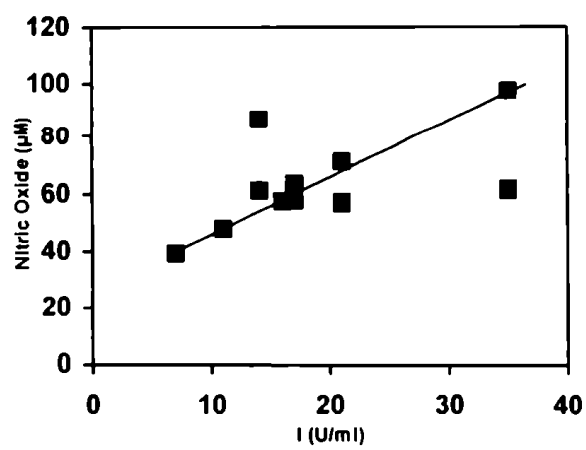


Figura N° 37: Gráfico de correlación entre NO e I

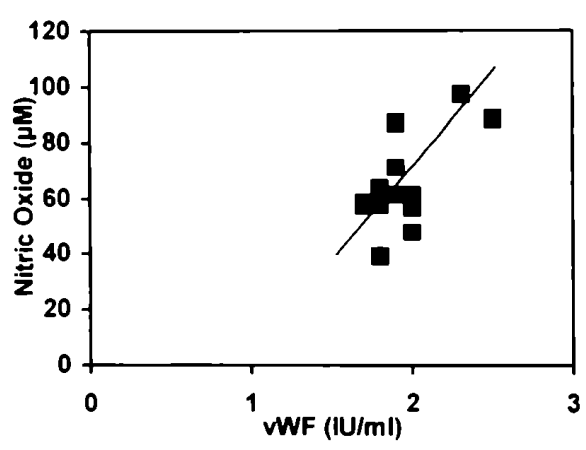


Figura N ° 38: Gráfico de correlación entre NO y FvW

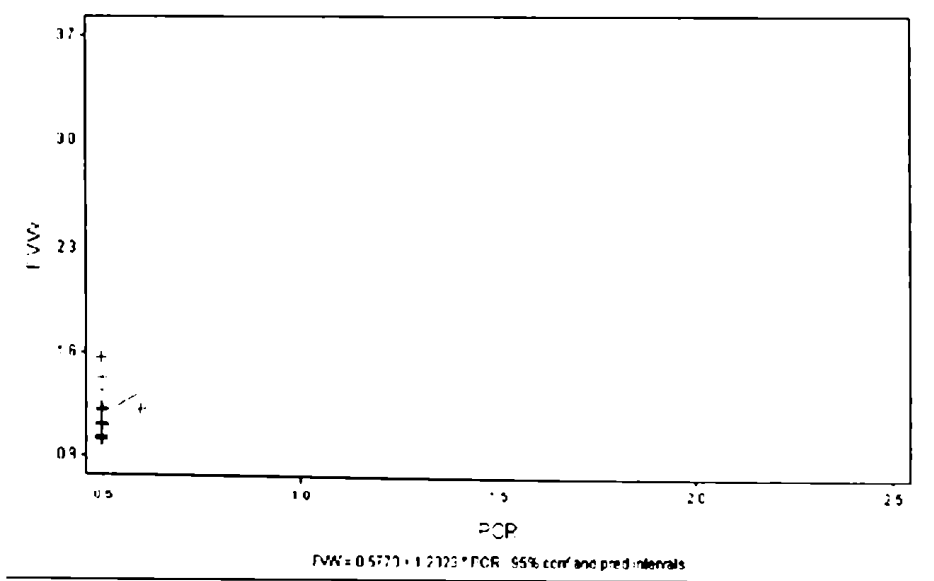


Figura N° 39: Regresión lineal Factor von Willebrand vs Proteína C reactiva.
 $r^2 = 0,8668$; $p < 0,001$.

3.2 DISCUSSION

Se encontró una correlación positiva y significativa entre NO e I y entre NO y FvW ($p < 0.05$) y PCR vs FvW ($p < 0.001$) en el grupo de pacientes. Todos los parámetros estudiados se hallaron aumentados en los pacientes respecto de los controles (Tabla 11).

Las proteínas reactantes de fase aguda como FvW, Fg y PCR estuvieron significativamente elevadas en estos pacientes ($p < 0.05$), como reflejo del estado inflamatorio y el daño endotelial presente, agravado por el perfil lipídico alterado.

A pesar del nivel elevado de NO, el estado hipertensivo persistió, como ya se mencionó anteriormente, debido a la baja biodisponibilidad de NO como resultado del aumento del stress oxidativo, y además por la elevación en los niveles plasmáticos de ET-1.

4. RELACION ENTRE LOS NIVELES PLASMATICOS DE PAI-1, OXIDO NITRICO, INSULINA Y PEPTIDO C.

4.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación del rango de referencia de la actividad plasmática de PAI-1 en 20 sujetos normales para el método y equipo utilizados (ver materiales y métodos)

Rango de referencia obtenido: mediana (rango) =1.20 (0.7-3.4) U/ml.

Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla N° 12.

	Pacientes (n = 20)	Controles (n = 17)	p
Edad (años)	59,1 ± 4,7	60,3 ± 3,9	NS
Sexo (H/M)	11/9	9/8	NS
IMC (kg/m²)	27,8 ± 3,7	26,9 ± 4,8	NS
Fumadores	8	6	NS
Gl (gr/l)	1,7 ± 0,7	9,6 ± 1,3	0.001
I (U/ml)	21,3 (7,8-45,4)	7,3 (5,1-16,5)	0.003
Pépt C (ng/ml)	2,8 ± 1,3	1,7 ± 0,7	0.03
HbA _{1c} (%)	10,0 ± 2,4	5,5 ± 1,7	0.001
Fg (mg/dl)	315,3 ± 62,0	254,6 ± 35,9	0.01
FvW (UI/ml)	2,5 ± 0,4	1,1 ± 0,6	0.001
PAI-1 (U/ml)	4,0 (2,8-6,9)	1,2 (0,7-3,4)	0.001
NO (µM)	70,2 ± 22,5	36,0 ± 12,2	0.001
TAS (mmHg)	153 ± 23	128 ± 21	0,02
TAD (mmHg)	106 ± 15	91 ± 10	0,03

Tabla N° 12: Resultados de pacientes y controles. Gl: Glucemia; IMC: Indice de masa corporal; I: Insulinemia; Pépt. C: Péptido C; HbA_{1c}: Hemoglobina glicosilada; Fg: Fibrinógeno; FvW: Factor von Willebrand; PAI-1: Inhibidor del activador tisular del plasminógeno; NO: Óxido nítrico; TAS: Tensión arterial sistólica y TAD: Tensión arterial diastólica.

El número de fumadores fue similar en ambos grupos. En el grupo de pacientes se hallaron las siguientes correlaciones entre:

I con NO ($p = 0,01$)

FvW ($p = 0,05$)

HbA_{1c} ($p = 0,03$)

PAI-1 ($p < 0,05$)

Además:

NO correlacionó con HbA_{1c} y FvW ($p = 0,04$ y $p < 0,05$)

FvW correlacionó con Fg ($p = 0,02$)

HbA_{1c} correlacionó con Gl ($p = 0,04$).

En estos pacientes se ha relacionado a la hiperinsulinemia con una actividad fibrinolítica disminuida debido a los elevados niveles plasmáticos de PAI-1. La relación entre PAI-1 y la I no ha sido bien establecida. Si bien hay controversia, algunos autores han concluido que en los pacientes diabéticos los niveles de PAI-1 correlacionan con el nivel de insulino-resistencia²⁴⁸. En este estudio se halló también esta asociación.

Se estudió, además, la relación entre todas las variables y el Péptido C (Pépt. C). Este péptido es clivado de la proinsulina, liberándose además la insulina. No se halló relación entre el Pépt C y los otros parámetros estudiados. El Pépt C es una hormona activa con efecto fisiológicos potencialmente importantes. Aunque es co-secretado con la insulina, se debería considerar que el Pépt. C es una entidad separada con características bioquímicas y fisiológicas diferentes de las de la insulina. Hay evidencias de interacciones entre el Pépt. C y diferentes membranas celulares a través de un receptor distinto al de la insulina y al de otras hormonas relacionadas²⁴⁹. Esto explicaría la falta de correlación encontrada entre los niveles de Pépt. C y de PAI-1.

5 EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL POR ECO-DOPPLER

Se obtuvieron los siguientes resultados:

GRUPO		DIAMETRO (cm)	% DE AUMENTO	FvW (UI dl)	% DE AUMENTO	NO (μM)	% DE VARIACIÓN
Grupo Control	DB	0.4093	15.07 % p < 0.01	88.75±3.53	15.49 % p < 0.001	10.5 ± 2.1	13.3 % p < 0.03
	DPI	0.4710		102.50±7.07		11.9 ± 2.3	
HTA-DBT Basal	DB	0.4235	7.2 % p NS	100.35±12.10	0.71 % p NS	13.1 ± 3.0	-6.9 % p < 0.05
	DPI	0.4542		101.07±12.80		12.2 ± 1.1	
HTA-DBT Postrat.	DB	0.4281	11.24 % p < 0.05	108.21±6.90	10.89 % p < 0.01	13.1 ± 2.1	7.2 % p < 0.05
	DPI	0.4814		120.0±8.5		14.0 ± 4.1	

Tabla N° 13: Resultados de los % de Variación del diámetro arterial (DA), nitritos y FvW pre y post-isquemia, pre y post-tratamiento con quinapril. DB: DA basal, DPI: DA post-isquemia, HTA-DBT basal: pacientes hipertensos diabéticos pre-tratamiento, HTA-DBT Postrat: pacientes hipertensos diabéticos post-tratamiento con quinapril.

5.1 DISCUSION

La función endotelial evaluada por la vasodilatación post-isquemia de la arteria braquial presenta una marcada alteración en los pacientes diabéticos y en hipertensión. La evaluación del DA por eco Doppler es una técnica incruenta, que puede repetirse en el mismo paciente y que permite estratificar el riesgo de eventos cardíacos en sujetos sin manifestaciones clínicas de enfermedad cardiovascular. Esta prueba, refleja la importancia de los distintos factores de riesgo que afectan la función endotelial en cuanto a su actividad vasoreguladora.

Alterada la biología del endotelio, la respuesta a la Ach es paradójal: en vez de producir vasodilatación, produce vasoconstricción. El estudio de la respuesta coronaria se realiza mediante una coronariografía, pero éste es un método invasivo, que conlleva riesgos para el paciente y que no puede repetirse en el mismo individuo, por esta razón se estudia la respuesta arterial en vasos superficiales, por ejemplo la arteria braquial, que es considerada subrogante de las coronarias. Por este motivo en este estudio se evaluó la respuesta vasodilatadora en la arteria braquial midiendo por eco Doppler su

diámetro pre y post-isquemia de 5 minutos de duración, aplicando una presión de 200 mm Hg. La vasodilatación producida por la isquemia es una acción dependiente del endotelio.

En los pacientes la respuesta vasodilatadora post-isquemia estuvo por debajo del límite considerado normal, es decir, fue menor de 10 % y en el grupo control fue mayor del 10 %. Esta prueba evalúa el aspecto vasomotor del endotelio, que se encuentra alterado en diabetes, hipertensión, dislipemias, tabaquismo, etc. La posibilidad de mejorar la función endotelial disminuiría en estos pacientes el riesgo asociado de padecer eventos trombóticos, por esta razón se los reevaluó luego de 8 semanas de tratamiento con una droga antihipertensiva del grupo de los IECA que tiene efectos no sólo sobre la disminución de la tensión sanguínea, sino también sobre la función endotelial, hallándose que ésta mejoró en estos pacientes (Figura N° 40). La respuesta vasodilatadora a la isquemia fue significativamente mayor ($p < 0.05$) después del tratamiento. La diferencia entre las respuestas pre y post-tratamiento fue mayor del 2 %, siendo este valor indicativo de mejoría endotelial²³⁷. Luego del tratamiento la variación del DA en los pacientes fue mayor del 10 %. En este estudio el tratamiento con un IECA no modificó el DA basal (previo a la isquemia), pero sí la respuesta post-isquemia, dada por un mayor DA debido a la mejoría endotelial.

En cuanto al nivel plasmático de FvW, se halló una diferencia significativa entre los pacientes pre-tratamiento y los controles ($p < 0.02$) (Figura N° 39). En el grupo control la diferencia entre los niveles de FvW pre y post-isquemia hiperémica fue de 15.07 % ($p < 0.01$) y en los pacientes pre-tratamiento esta diferencia fue de 7.2% ($p = \text{NS}$). Luego del tratamiento con quinapril los pacientes presentaron una mayor liberación de FvW post-isquemia: 10.89% ($p < 0.05$), asemejándose esta respuesta a la de los controles (Figura N° 38).

La isquemia hiperémica es un estímulo para la liberación de NO y en los controles se halló una diferencia pre y post-isquemia de 13.3 % ($p < 0.03$). En los pacientes pre-tratamiento no se encontró diferencia entre los niveles pre y post-isquemia, que además resultaron mayores que los de los controles ($p < 0.05$). Luego del tratamiento con quinapril los pacientes presentaron un nivel de NO pre-isquemia significativamente menor respecto a su nivel basal ($p < 0.04$) (Figura N° 41), posiblemente debido a que al mejorar la función endotelial habría una menor activación de iNOS, y consecuentemente, un menor nivel plasmático de NO y una mayor respuesta a la isquemia.

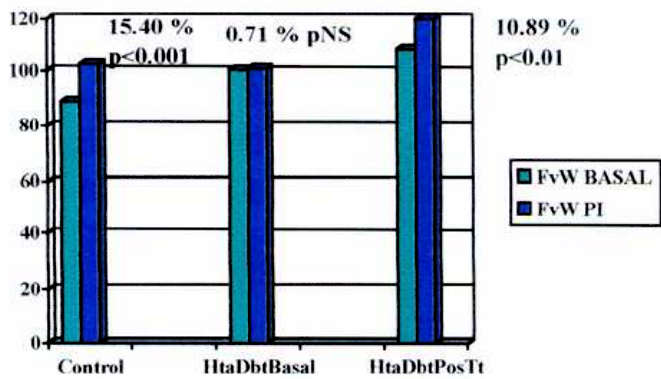


Figura N° 38: Nivel de FvW pre y post-isquemia en el grupo control: porcentaje de variación = 15,40% ($p < 0,001$); en los pacientes pre-tratamiento: porcentaje de variación = 0,71% (p NS) y en los pacientes post-tratamiento: porcentaje de variación = 10,89% ($p < 0,02$). HtaDbtBasal: nivel de FvW basal en los pacientes diabéticos hipertensos; HtaDbtPosTt: nivel de FvW post-tratamiento en los pacientes diabéticos hipertensos.

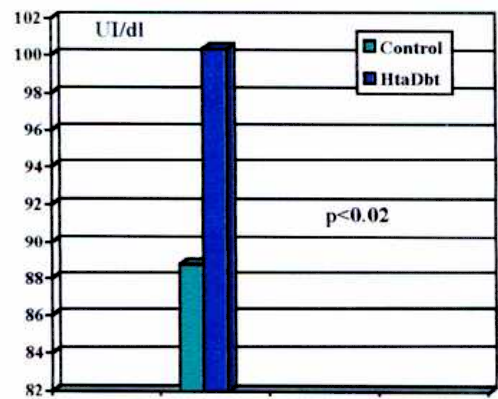


Figura N° 39: Nivel de FvW basal (pre-tratamiento) de pacientes y controles ($p < 0,02$).

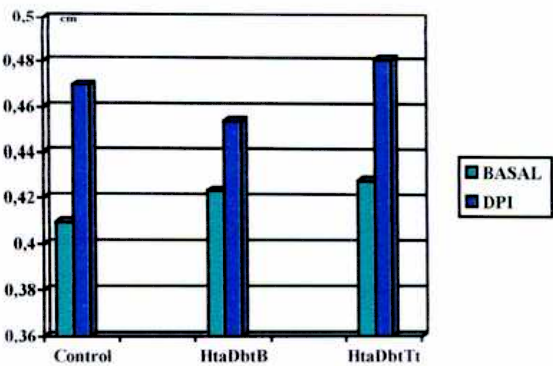


Figura N° 40: Diámetro arterial (cm) de los pacientes pre y post-isquemia pre tratamiento con quinapril (HtaDbtB): porcentaje de variación = 7,2 % (p NS); diámetro arterial pre y post-isquemia post-tratamiento con quinapril (HtaDbtTt): porcentaje de variación = 11,24% ($p < 0,05$) y controles pre y postisquemia: porcentaje de variación = 15,07 % ($p < 0,01$).

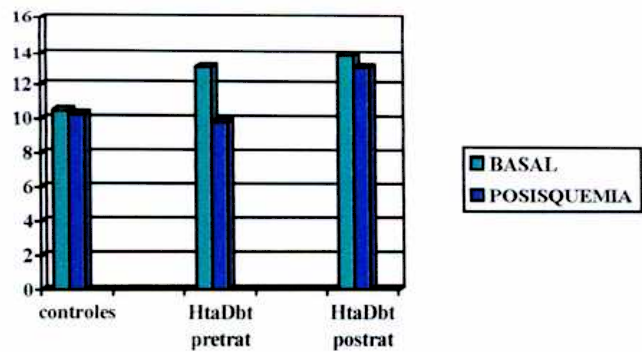


Figura N° 41: Nivel de NO en los pacientes pre y post-isquemia pre-tratamiento con quinapril. (HtaDbt pretrat), porcentaje de variación = -6,9 % ($p < 0,05$); nivel de NO en los pacientes pre y post-isquemia post-tratamiento (HtaDbtpostrat), porcentaje de variación = 7,2 % ($p < 0,05$) y controles pre y post-isquemia: porcentaje de variación = 13,3 % ($p < 0,03$).

En las Figuras N° 42 y 43 se observan las fotografías de la medición del diámetro de la arteria braquial por ecografía Doppler pre y post-isquemia respectivamente.



Figura N° 42: Medición del diámetro pre-isquemia de la arteria braquial por eco Doppler.



Figura N° 43: Medición del diámetro arterial post-isquemia de la arteria braquial por eco-Doppler.
Isquemia: Se aplicó en el antebrazo un manguito de presión insuflado a 200 mm Hg durante 5 minutos.

5.2 CONCLUSIONES

La droga utilizada controla la tensión arterial a través de la inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina, y también, mejoraría la función endotelial. Si bien el diámetro arterial basal, tanto pre- como post-tratamiento, no se modificó, la respuesta vasodilatadora a la isquemia hiperémica se incrementó. La función endotelial post tratamiento, medida a través de la liberación de FvW y de NO, se asemejó a la del grupo control.

6 EFECTO DE DOS DROGAS ANTIHIPERTENSIVAS SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL. EVALUACIÓN POR ECO-DOPPLER.

6.1 Porcentaje de variación del diámetro de la arteria braquial en la prueba de isquemia hiperémica.

6.2 Medición de parámetros plasmáticos asociados a disfunción endotelial: FvW y PAI-1.

6.3 EVALUACIÓN PRE-TRATAMIENTO

Se evaluaron 30 pacientes diabéticos tipo 2 hipertensos, con función renal conservada, bajo tratamiento con sulfanilureas y un grupo de 10 individuos sanos (Grupo C) comparables en edad, sexo, índice de masa corporal (IMC), hábitos alimentarios y de fumar.

Los pacientes se dividieron en dos grupos de 15, **Grupo A** y **Grupo B**.

En la Tabla N° 14 se detallan los datos de pacientes y controles.

Variable	Grupo A	Grupo B	Grupo C
Edad (años)	55,4 ± 5,8	52,9 ± 7,2	53,5 ± 6,7
Sexo (H/M)	8/7	8/7	5/5
IMC (kg/m²)	27,7	28,1	26,9
Fumadores (%)	4	3	1
Glucemia (g/l)	1,43 ± 0,51	1,52 ± 0,59	1,07 ± 0,15
TAS (mmHg)	155,5 ± 6,1	159,4 ± 5,8	128,4 ± 2,3
TAD (mmHg)	98,8 ± 8,1	99,1 ± 8,2	85,4 ± 3,7

Tabla N° 14: IMC: índice de masa corporal; TAS: tensión arterial sistólica; TAD: tensión arterial diastólica. Grupo A: n = 15; Grupo B: n = 15; Grupo C: n = 10. Entre los Grupos A y B no hay diferencias significativas en todas las variables. En Gl A vs C y B vs C $p < 0,05$, en TAS A vs C y B vs C $p < 0,04$ y en TAD A vs C y B vs C $p < 0,05$.

Los resultados están expresados como media ± DE.

6.3.1 Medición de la variación del diámetro de la arteria braquial por eco Doppler pre y post-isquemia:

	Grupo A	Grupo B	Grupo C
Variación del diámetro arterial (%)	7.2	6.9	15.1

p A vs B = NS; p A vs C = 0.001; p B vs C = 0.001

6.3.2 Porcentajes de variación pre y post-isquemia de los marcadores plasmáticos de disfunción endotelial:

% de variación	Grupo A	Grupo B	Grupo C
FvW	0.78	0.82	15.5
PAI-1	0.91	0.86	12.4

FvW: p A vs C, p B vs C = 0.001

PAI-1: p A vs C, p B vs C = 0.01

6.4 REEVALUACIÓN DE LOS PACIENTES LUEGO DE 8 SEMANAS DE TRATAMIENTO CON:

Quinapril (20 mg/día)
Nebivolol (5 mg/día)

Mecanismo de acción de quinapril: actúa inhibiendo a la enzima convertidora de angiotensina (IECA).

Mecanismo de acción de nebivolol: actúa como antagonista de los β_1 -adrenoreceptores cardio-selectivos produciendo vasodilatación mediada por NO.

Post administración durante 8 semanas de:

Grupo A : quinapril

Grupo B : nebivolol

Grupo C : placebo

Reevaluación a las 72 horas de suspendido el tratamiento.

6.4.1 Medición de la variación del diámetro de la arteria braquial por eco Doppler pre y post-isquemia:

	Grupo A	Grupo B	Grupo C
Variación del diámetro arterial (%)	11.2	14.4	15.9

$p_{A \text{ vs } B} = 0.02; p_{A \text{ vs } C} = 0.01; p_{B \text{ vs } C} = \text{NS}$

6.4.2 Porcentajes de variación pre y post-isquemia de los marcadores plasmáticos de disfunción endotelial:

% de variación	Grupo A	Grupo B	Grupo C
FvW	10.9	14.8	16.7
PAI-1	12.5	17.3	18.2

$FvW : p_{A \text{ vs } C} = 0.01, p_{B \text{ vs } C} = 0.07, p_{A \text{ vs } B} = 0.04$

$PAI-1 : p_{A \text{ vs } C} = 0.01, p_{B \text{ vs } C} = \text{NS}, p_{A \text{ vs } B} = 0.03$

6.5 CORRELACIONES

Se halló una correlación positiva entre el nivel de FvW y el diámetro arterial ($p<0,001$) del **Grupo C** vs los **Grupos A y B**.

6.6 CONCLUSIONES

En esta evaluación se encontró que el tratamiento con ambas drogas mejora la función endotelial.

Los pacientes tratados con nebivolol presentaron una mayor respuesta en la vasodilatación endotelio-dependiente y en los marcadores plasmáticos que los pacientes medicados con quinapril, indicando que la vía metabólica del NO sería más eficiente que la de inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina, en cuanto a al efecto restaurador sobre el endotelio y a mejorar su función vasodilatadora.

7 SEGUIMIENTO DE 49 PACIENTES HIPERTENSOS BAJO TRATAMIENTO CON NEBIVOLOL DURANTE 5 MESES

7.1 RESULTADOS

Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla N° 15. Entre la consulta inicial y el primer control la diferencia en los valores medios de TAS resultó significativa: TAS vs TAS1C $p < 0,05$, entre la consulta inicial y el 2^{do} control: TAS vs TAS2CO $p < 0,05$ y entre la consulta inicial y el 3er control: TAS vs TAS3CON $p < 0,05$, pero entre el segundo y el tercer control no se registraron diferencias significativas: TAS2CO vs TAS3CON $p = NS$ (Figura N° 45). En la TAD se encontraron diferencias significativas entre los valores medios de la consulta inicial (TAD) y el 1^{ro}, 2^{do} y 3^{er} control, $p < 0,05$ respectivamente, mientras que entre el 1^{ro} y 2^{do} control, como en el caso de la TAS, no se observaron diferencias significativas ($p = NS$) (Figura N° 46). Las variaciones tanto en la TAS como en la TAD de cada paciente entre la consulta inicial y el control a los 5 meses se observan en las Figuras N° 47 y 47bis, $p < 0,001$ y $p < 0,05$ respectivamente.

Como se observó un descenso significativo en TAS en 47 de los 49 pacientes, la respuesta a la droga fue buena. En la TAD no se observó el marcado descenso registrado con la TAS. Esto indicaría que el efecto principal de la droga sería sobre la tensión sistólica y no sobre la diastólica.

No se observaron cambios en el IMC, Gl e I ($p = NS$). En cuanto al perfil lipídico se observó un descenso en el tCol ($p < 0,05$) y en TG ($p < 0,05$) pero no en LDL y HDL ($p = NS$). Se encontraron diferencias significativas entre la visita inicial y el control a los 5 meses en los valores de FvW ($p = 0,001$) y PAI-1 ($p < 0,001$). (Figuras 48 y 50 respectivamente), estos descensos indicarían una mejoría de la función endotelial. El nivel plasmático de NO aumentó entre la consulta inicial y el control a los 5 meses ($p < 0,05$) esto es debido a que la acción de la droga es producir vasodilatación a través de la liberación de NO y bloquear los receptores β_1 adrenérgicos.

Luego de los 5 meses de tratamiento los pacientes mostraron un significativo descenso en la tensión sistólica y una significativa mejoría en la función endotelial.

Tabla N° 15: Resultados obtenidos en el grupo de 49 pacientes hipertensos en tratamiento con nebivolol 5mg/día durante 5 meses.

	IMC	GI	tCol	LDL	HDL	TG	I	TAS	TAD	FvW	NO	PAI-1
	(kg/m ²)	(g/l)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(U/ml)	(mmHg)	(mmHg)	(U/ml)	(µM)	(U/ml)
Con.1	29.1±6.0	107.1±15.1	224.4±37.0	147.4±34.4	44.1±6.9	171.8±56.8	12.3±8.1	155.5±6.1	90.8±7.9	1.38±0.44	37.2±9.8	3.33±0.98
1ªCon	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	139.2±10.7	85.5±7.6	-----	-----	-----
2ªCon	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	139.2±10.7	85.5±7.6	-----	-----	-----
3ªCon	28.4±5.9	106.8±20.0	210.7±21.5	137.7±35.9	44.5±6.9	153.8±32.6	11.78±6.7	130.9±8.4	82.4±6.7	1.23±0.31	41.2±12.2	2.41±0.65

Con.1: consulta inicial; 1ªCon: primera consulta; 2ªCon: segunda consulta; 3ªCon: tercera consulta; IMC: índice de masa corporal (kg/m²); GI: glucemia (g/l); tCol: colesterol total (mg/dl); TG: triglicéridos (mg/dl); I: insulinemia (U/ml); TAS: tensión arterial sistólica (mm Hg); TAD: tensión arterial diastólica (mm Hg); FvW: factor von Willebrand (U/ml); NO: óxido nítrico (µM); PAI-1: inhibidor del activador tisular del plasminógeno (U/ml). Los resultados están expresados como media ± DE.

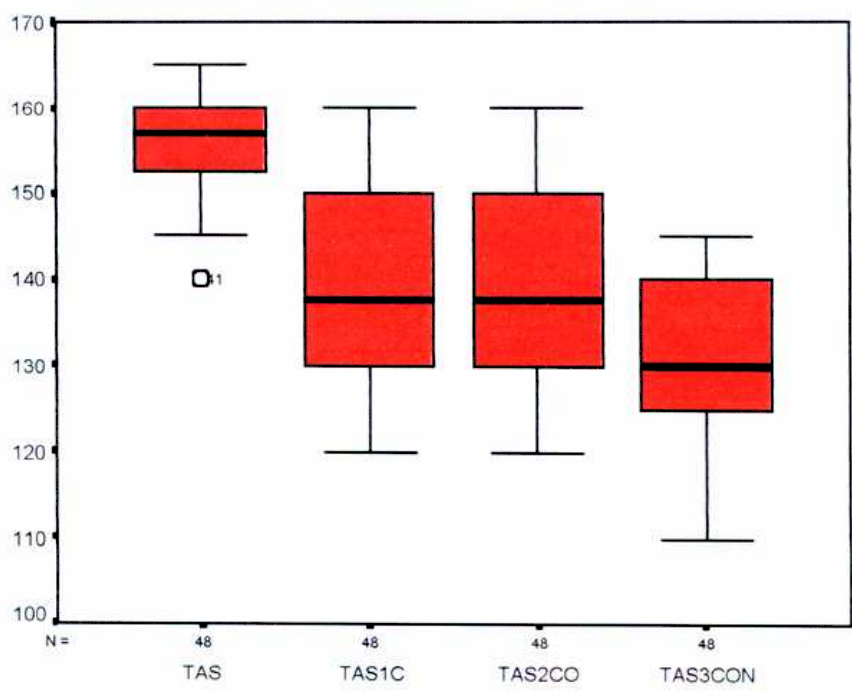


Figura N° 45: Comparación entre los valores medios de la Tensión Arterial Sistólica en la consulta inicial (TAS); en el 1^{er} control (TAS1c); en el 2° control (TAS2CO) y en el 3^{er} control a los 5 meses (TAS3CON). Valores de .p TAS y TAS1C < 0,05; pTAS y TAS2CO < 0,05; pTAS y TAS3CON < 0,001; pTAS2CO y TAS3CON = NS

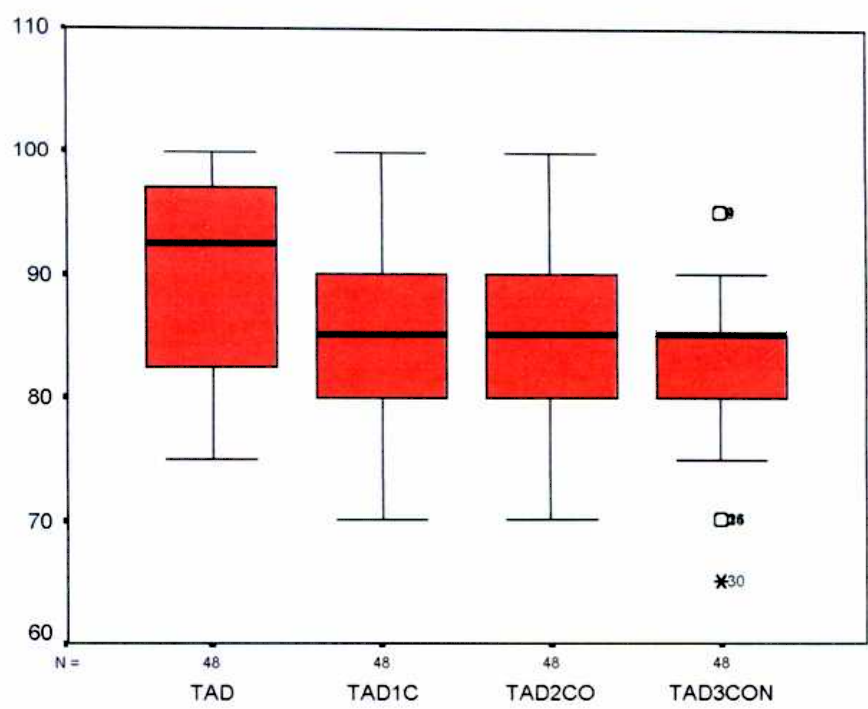


Figura N° 46: Comparación entre los valores medios de la Tensión Arterial Diastólica en la consulta inicial (TAD); en el 1^{er} control (TAD1C); en el 2° control (TAD2CO) y en el 3^{er} control a los 5 meses (TAD3CON); pTAD y TAD1C < 0,05; pTAD y TAD2CO < 0,05; pTAD y TAD3CON < 0,001; pTAD2CO y TAD3CON = NS

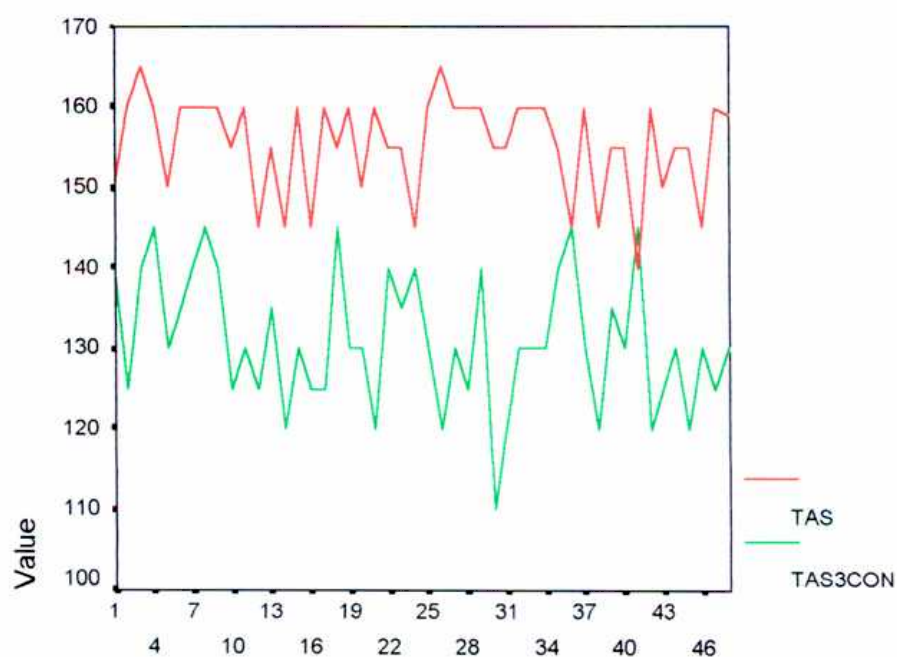


Figura N° 47: Variación de TAS (mm Hg) en cada paciente controlado (49 pacientes), al inicio (TAS —) y a los 5 meses de tratamiento (TAS3CON —)

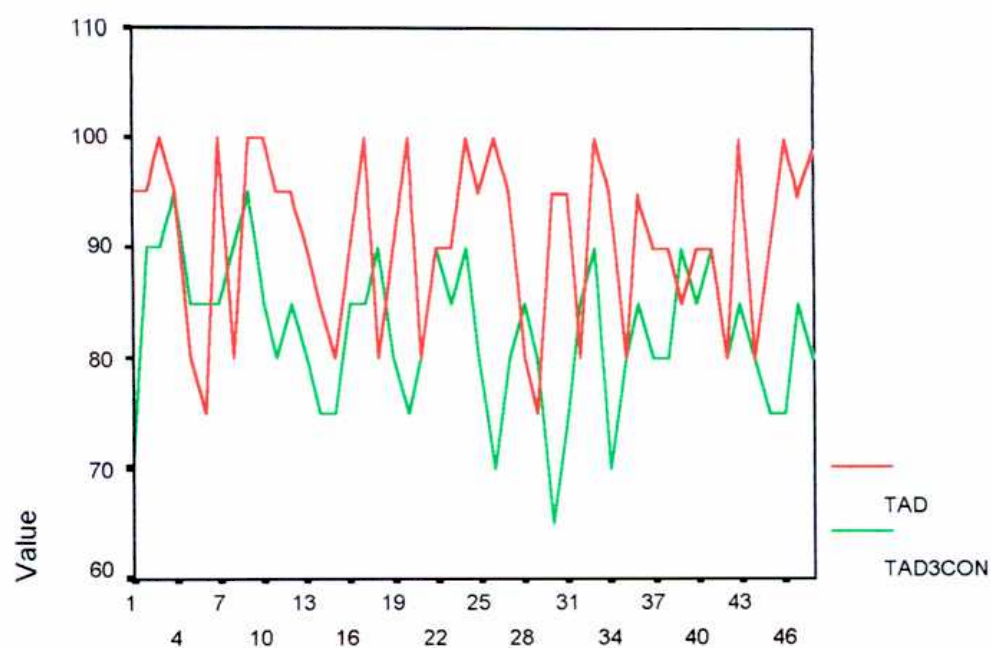


Figura N° 47bis: Variación de TAD (mm Hg) en cada paciente controlado (49 pacientes) al inicio (TAD —) y a los 5 meses de tratamiento (TAD3CON —)

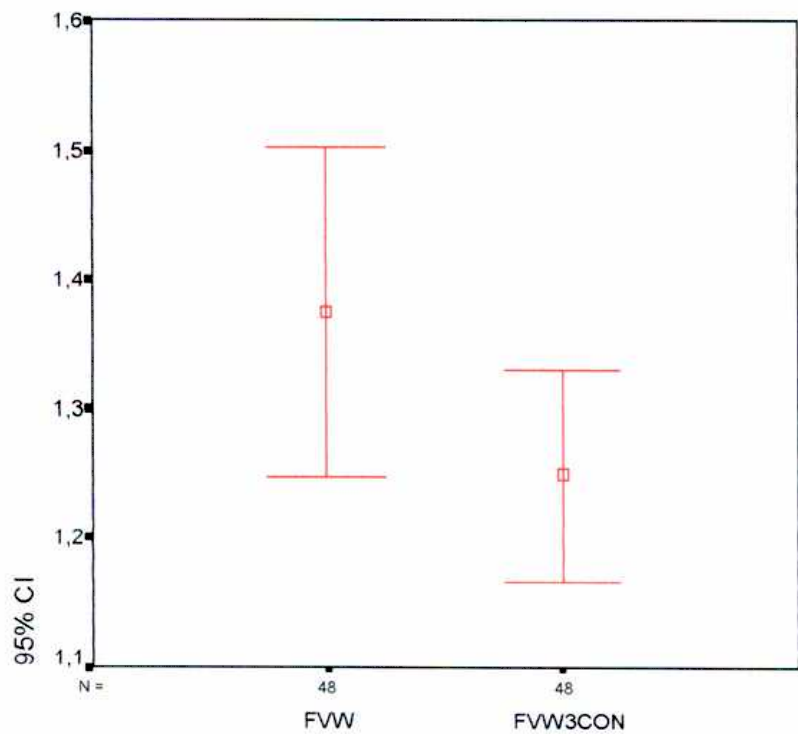


Figura N° 48: Descenso en los niveles de FvW (UI/ml) luego de los 5 meses. ($p < 0,001$). FvW: consulta inicial; FvW3CON: a los 5 meses.

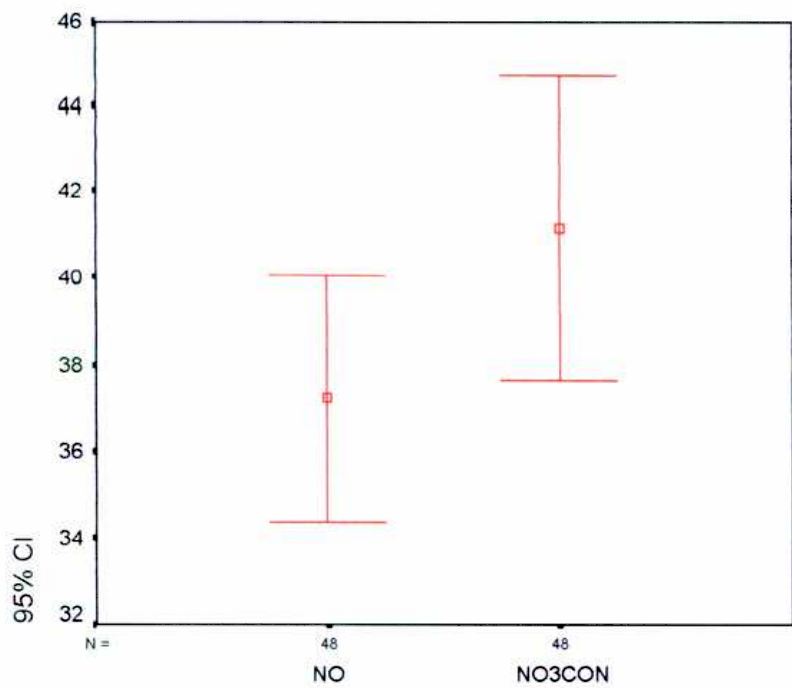


Figura N° 49: Aumento en los niveles de NO (μM) entre la consulta inicial (NO) y a los 5 meses (NO3CON), $p < 0,05$.

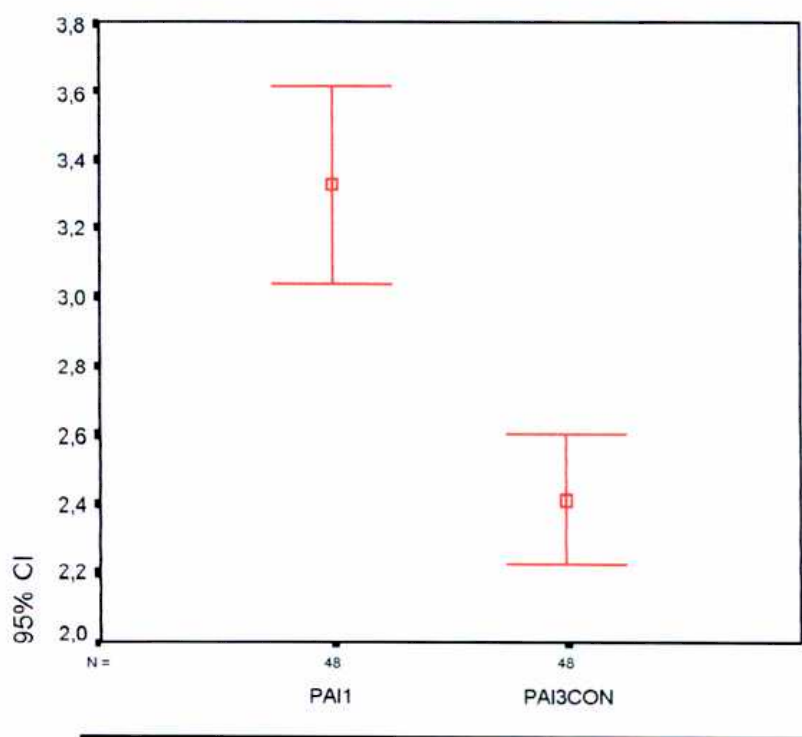


Figura N° 50: Descenso en los niveles de PAI-1 (UI/ml) entre la consulta inicial (PAI) y a los 5 meses (PAI3CON), $p < 0,001$.

8 RESULTADOS DEL SEGUIMIENTO DE 30 PACIENTES HIPERTENSOS

Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla N° 16. Entre la consulta inicial, el 2^{do} y 3^{er} control la diferencia en TAS resultó significativa $p < 0.05$ respectivamente, entre el segundo control y el tercero no se registraron diferencias significativas (Figura N° 51). En la TAD no se observaron diferencias significativas, entre los valores de la consulta inicial y los controles posteriores (Figura N° 52). En la 3^a consulta los valores de TAS fueron similares a los de la consulta inicial, debido a ésto en la Figura N° 53 se observa la variación entre la consulta inicial y la 2^a. Como esta variación se encontró en 25 de los 30 pacientes, ésto estaría indicando que en este grupo de pacientes no sería suficiente el régimen higiénico-dietético para controlar su tensión arterial. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los valores de TG, tCol., y LDL entre la consulta inicial y el control a los 5 meses, pero no en los valores de FvW, NO y PAI-1.

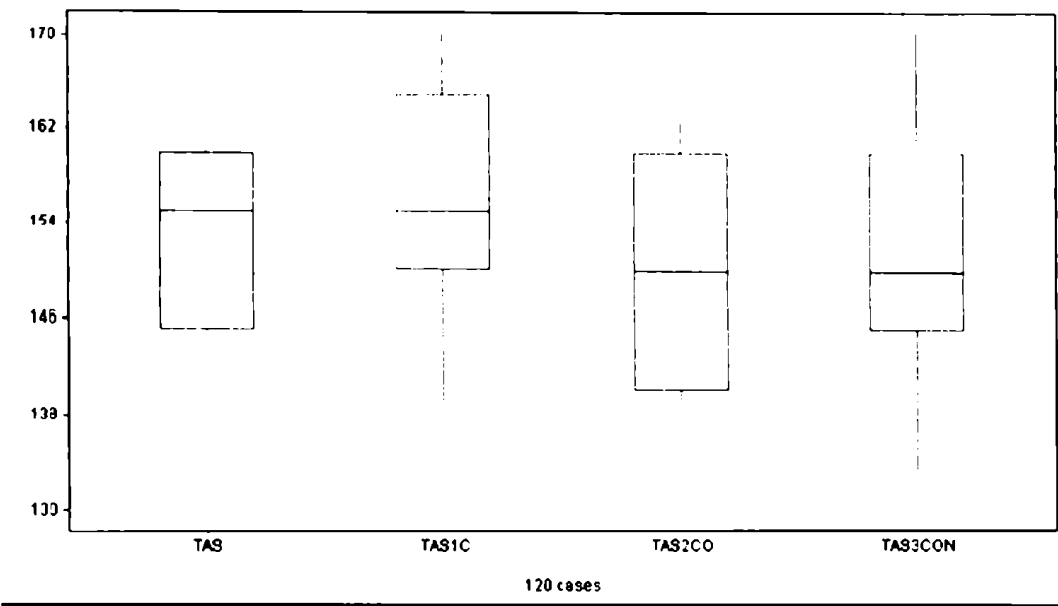


Figura N° 51: Comparación de los valores medios de las Tensiones Arteriales Sistólicas expresados en mm Hg en la consulta inicial (TAS); en el 1^{er} control (TAS1C); en el 2^o control (TAS2CO) y en el 3^{er} control (TAS3CON); $p \text{ TAS vs TAS1C} = \text{NS}$; $p \text{ TAS vs TAS2CO} < 0.05$; $p \text{ TAS vs TAS3CON} < 0.05$; $p \text{ TAS1C vs TAS2CO} = \text{NS}$.

Tabla N° 16: Resultados obtenidos en el grupo de 30 pacientes hipertensos con régimen higiénico-dietético controlados durante 5 meses.

	IMC	GI	tCol	LDL	HDL	TG	I	TAS	TAD	FvW	NO	PAI-1
	(kg/m ²)	(g/l)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(U/ml)	(mm Hg)	(mm Hg)	(U/ml)	(μM)	(U/ml)
Con.I	29.9±5.4	108.1±19.1	225.0±33.2	143.6±27.9	41.8±8.8	193.3±149.5	13.3±7.7	154.2±6.3	90.3±7.4	1.49±0.4	39.7±10.3	3.6±1.0
1ªCon	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	155.2±11.4	90.5±6.5	-----	-----	-----
2ªCon	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	151.3±10.3	90.2±5.6	-----	-----	-----
3ªCon	29.7±5.3	106.8±20.0	210.7±21.5	137.7±35.9	44.5±6.9	153.8±32.6	14.0±8.2	152.2±10.1	82.4±6.7	1.48±0.36	39.5±11.9	3.5±1.0

Con I: Consulta Inicial; 1ªCon: primera consulta; 2ªCon: segunda consulta; 3ªCon: tercera consulta.

IMC: índice de masa corporal (kg/m²); GI: glucemia (g/l); tCol: colesterol total (mg/dl); TG: triglicéridos (mg/dl); I: insulinemia (U/ml);

TAS: tensión arterial sistólica (mm Hg); TAD: tensión arterial diastólica (mm Hg); PAI-1 (U/ml); FvW: factor von Willebrand (U/ml);

NO: óxido nítrico (μM). PAI-1: inhibidor del activador tisular del plasminógeno (U/ml). Los resultados están expresados como media ± DE.

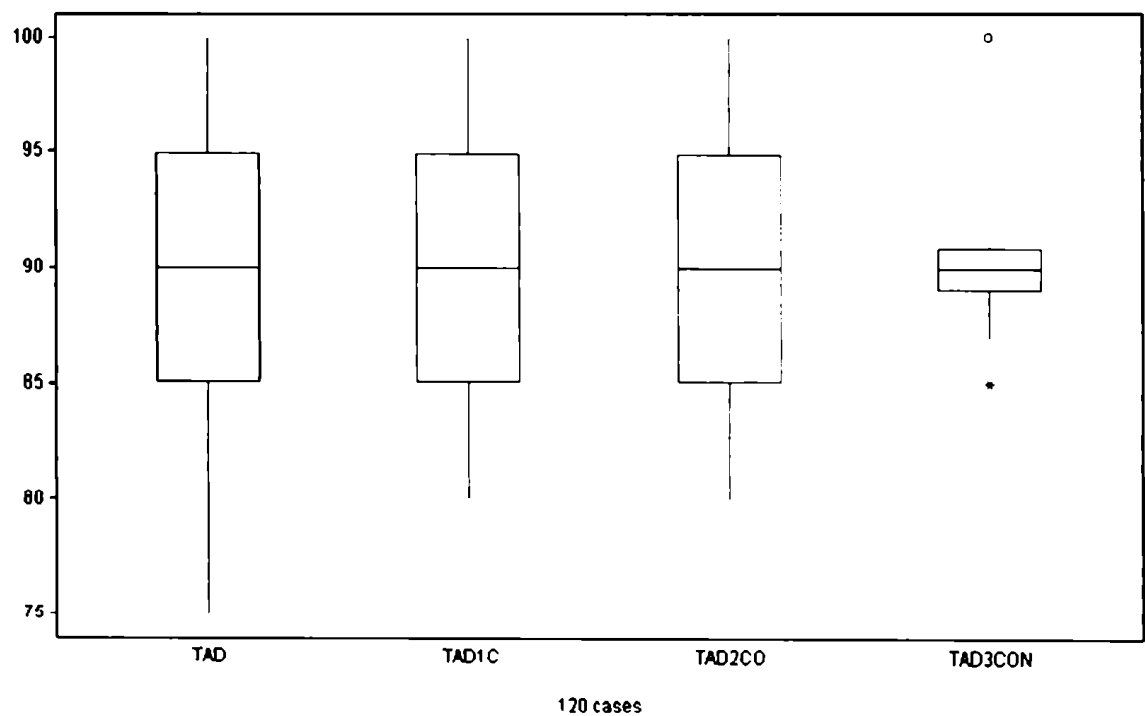


Figura N° 52: Comparación de los valores medios de las Tensiones Arteriales Diastólicas expresados en mmHg en la consulta inicial (TAD); en el 1° control (TAD1C); en el 2° control (TAD2CO) y en el 3° control (TAD3CON).
 $p_{TAD, TAD1C} = NS$; $p_{TAD, TAD2CO} = NS$; $p_{TAD, TAD3CON} = NS$.

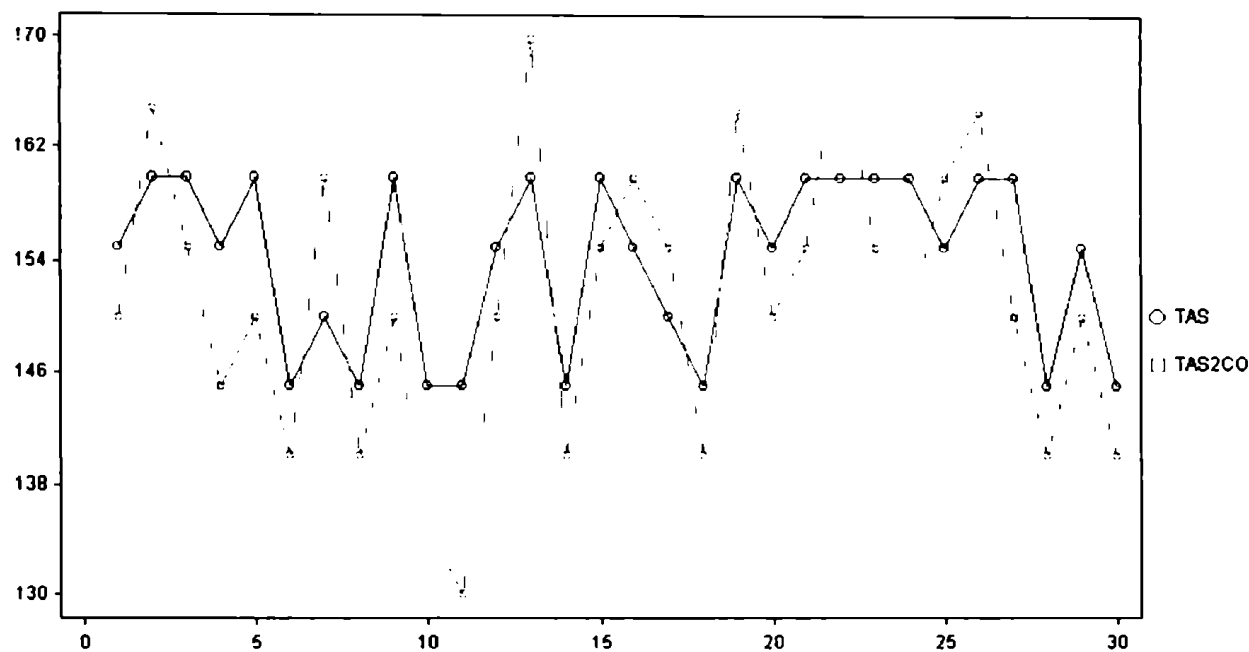


Figura N° 53: Variación de la Tensión arterial sistólica (TAS) entre la consulta inicial (TAS) y la consulta a la 2ª consulta (TAS2CO) de cada paciente controlado (30 pacientes) TAS— y TAS2CO

La mejoría observada en el perfil lipídico se debe a la dieta hipocalórica e hiposódica que seguían los pacientes, pero no fue suficiente para controlar la tensión arterial ni para mejorar la función endotelial, ya que no se observó una disminución de los niveles plasmáticos de FvW ni de PAI-1. El NO se encontró dentro de los valores normales y no se modificó luego de los 5 meses de dieta hiposódica e hipocalórica.

En consecuencia la dieta presentó beneficios en cuanto a la disminución de los lípidos, que representan un factor de riesgo cardiovascular, pero no logró modificar sustancialmente la tensión arterial, si bien hubo una disminución global de TAS entre el inicio y los 5 meses, hubo una gran variación en la respuesta individual y en varios pacientes no fue efectiva para controlarla. El efecto de la dieta sobre TAD resultó menor que sobre TAS.

Estudios Experimentales

1 CULTIVOS CELULARES: CÉLULAS ENDOTELIALES HUMANAS DE CORDÓN UMBILICAL (HUVEC)

1.1 ACCIÓN DE AGEs Y TNFα SOBRE HUVEC

En la Tabla N° 17 se detallan los resultados obtenidos por cuadruplicado

	FvW (%)	Nitritos (μM)
CE	1,1±0,1	20,0±0,2
CE + BSA (300 μg/ml)	1.4±0.1	27.1±0.2
CE + AGEs (300 μg/ml)	2.5±0.2	40.5±0.3
CE + AGEs + TNFα	4.0±0.3	94.4±0.3
CE + TNFα (17 ng/l)	3.0±0.2	45.0±0.3

Tabla N° 17: Activación de células endoteliales vasculares (HUVEC) por AGEs

1.2 SOBRENADANTES DE CULTIVOS HUVEC. RESULTADOS DE LA ELECTROFORESIS EN PAGE- SDS.

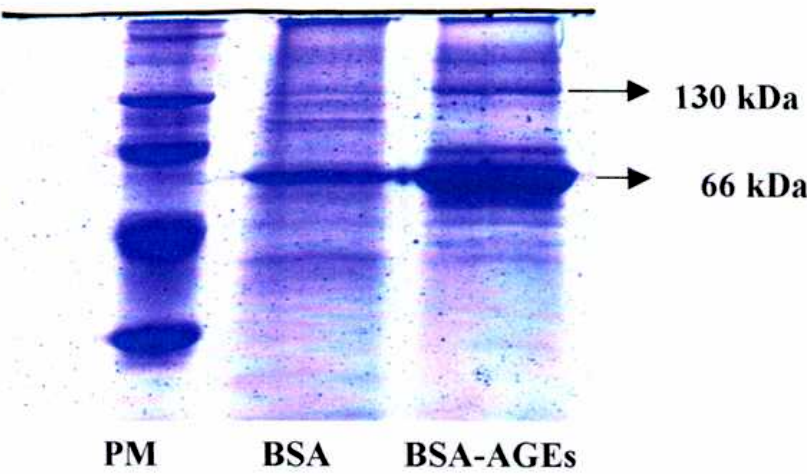


Figura N° 58: Electroforesis de los sobrenadantes de los cultivos de HUVEC. Se observa una banda de 130 kDa correspondiente a y otra a 66 kDa correspondiente a.....**PM:** Marcadores de Pesos Moleculares; **BSA:** HUVEC + BSA; **BSA-AGEs:** HUVEC + BSA-AGEs

1.3 EXPRESIÓN DE iNOS EN CÉLULAS ENDOTELIALES. RESULTADOS DEL WESTERN BLOT.

El western blot del gel indicó la expresión de iNOS dentro de la fracción proteica de 130 KDa correspondiente a la pista BSA-AGEs.

Control BSA BSA-AGEs
Negativo

Figura N° 59: Western Blot

1.4 RESULTADOS DE INMUNOFLUORESCENCIA EN CE.

Marcación de HUVEC post activación con AGEs.

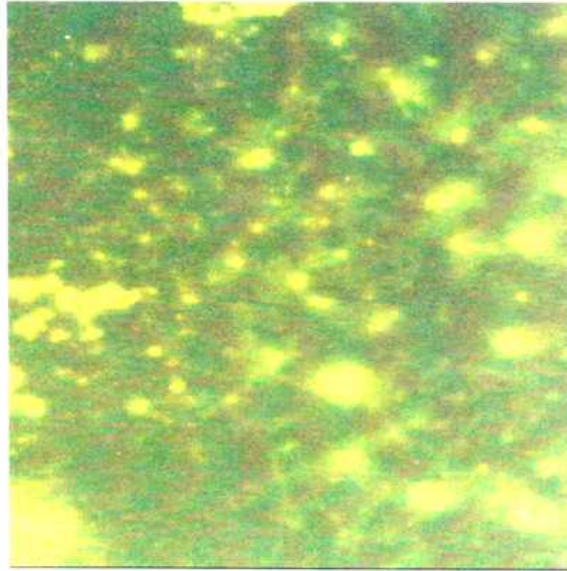


Figura N° 60: Expresión del FvW post AGEs en CE vasculares cultivadas en vidrios móviles (630x)

1.5 RESULTADOS Y CONCLUSIONES DE LOS ENSAYOS DE MIGRACIÓN DE CE.

Las células tratadas con anticuerpo anti-VE-caderina migraron más que las controles. (Figura 61, color rojo).

La diferencia en la migración no se debió a una proliferación diferente ya que el número de células inhibidas no varió significativamente respecto del de las células controles.

La migración en presencia de AGEs fue intermedia entre el control y el ensayo con anticuerpo, sugiriendo que los AGEs actuarían inhibiendo las uniones célula-célula en un grado menor respecto del anticuerpo. (Figura 61, color azul).

La VE-caderina incrementó la cohesión de las uniones célula-célula y por este motivo es menor la migración celular respecto de las células inhibidas. Es un marcador específico de las CE y un marcador temprano de la diferenciación de las CE *in vivo*.

Dadas sus propiedades adhesivas y su localización en las uniones célula-célula, participa en el reconocimiento de CE-CE durante el ensamblado de las estructuras

formadoras de los vasos. Su persistencia en la vasculatura adulta sugiere que juega un rol primario en el mantenimiento de la integridad de los vasos.

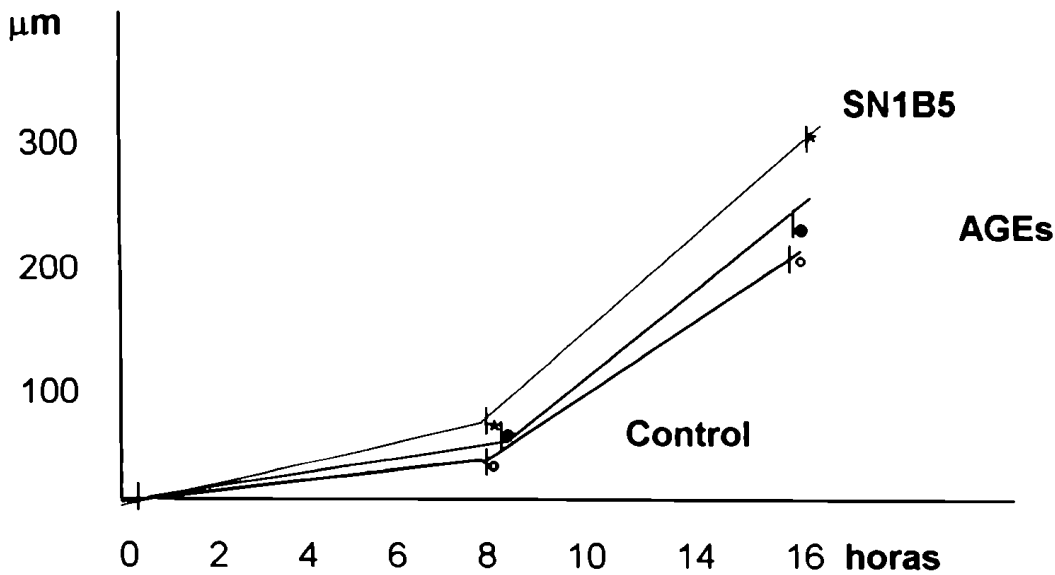


Figura N° 61: Migración de HUVEC en presencia de AGEs.

La VE-caderina, se localiza en las uniones estrechas de las CE. Está presente en todos los tipos y tamaños de los vasos sanguíneos. Cuando la permeabilidad de las CE se incrementa por la acción de agentes tales como: trombina, elastasa y factor de necrosis tumoral ($\text{TNF}\alpha$) en combinación con γ -interferón (γINF), el patrón de distribución de VE-caderina se ve severamente alterado²⁵⁰.

El estudio de la expresión de VE-caderina en una variedad de situaciones en las cuales se afecta el normal funcionamiento del endotelio vascular aporta un dato fundamental en la evaluación de las angiopatías, en especial en la angiopatía diabética, su expresión alterada puede contribuir a la disfunción y a la discontinuidad del endotelio vascular.

2 ANIMALES: RATONES BALB/c

2.1 Cortes histológicos de arterias



Figura N° 62:
Arteria elástica 20x eosina

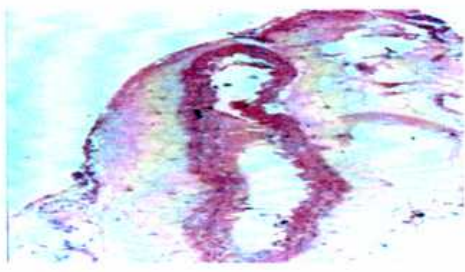


Figura N° 63:
Arteria elástica 20x PAS

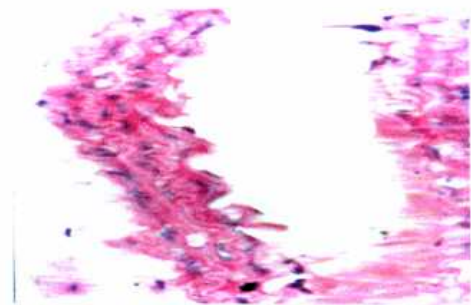


Figura N° 64:
Arteria post-AGEs 100x

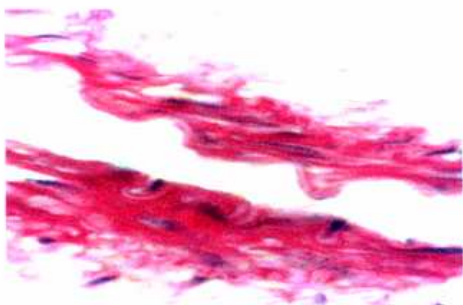


Figura N° 65:
Arteria post-AGEs 100x PAS

2.2 Cortes histológicos de riñones

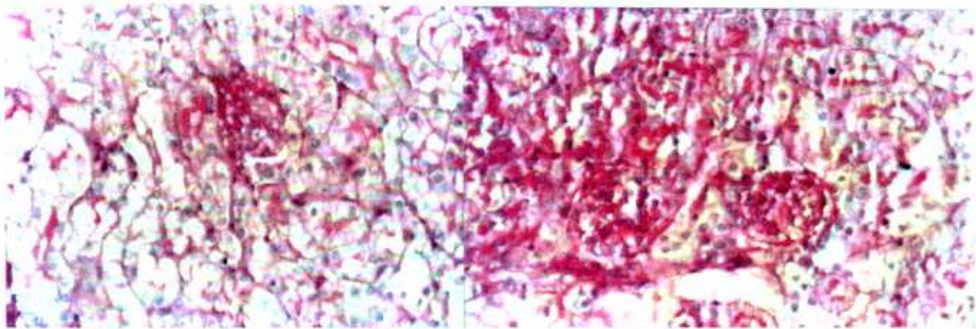


Figura N° 66:
Glomérulo control (BSA) 40x

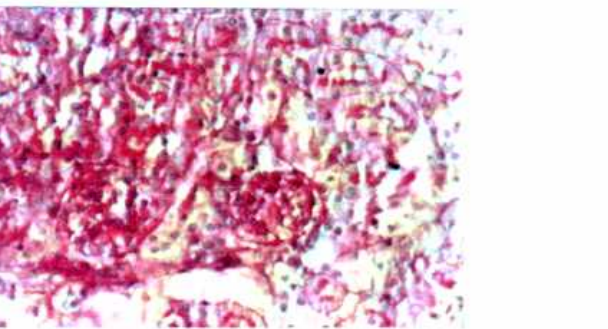


Figura N° 67:
Glomérulo de animal tratado (AGEs) 40x

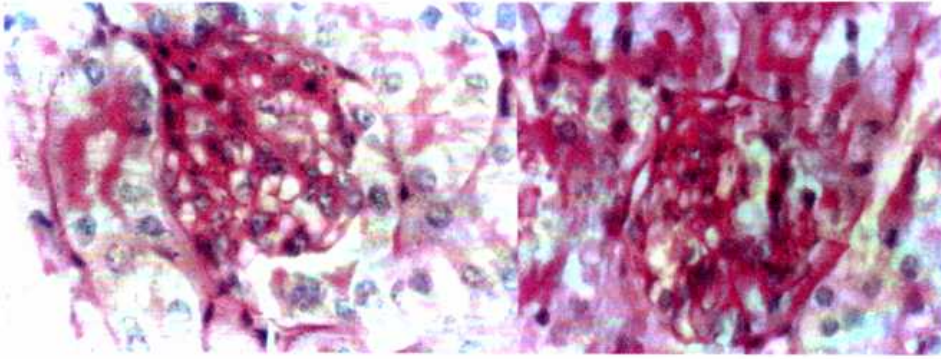


Figura N° 68:

Glomérulo control 100x

Figura N° 69:

Glomérulo de animal tratado 100x

Los cortes histológicos realizados luego del tratamiento con AGEs mostraron imágenes alteradas. El endotelio vascular se vio interrumpido en varios segmentos en las arterias elásticas obtenidas de los ratones tratados.

Resultados similares se observaron en los glomérulos renales de los ratones Balb/c tratados con altas dosis de BSA-AGEs. Fue evidente la acumulación de AGEs en las células endoteliales que se demostró por la técnica histoquímica de PAS.

2.3 MEDICIÓN DE PARÁMETROS SÉRICOS

Luego de dos semanas del tratamiento con AGEs no se observaron diferencias significativas de la glucemia respecto de los controles. Sin embargo, hubo un marcado aumento de la insulinemia y del nivel de hemoglobina glicosilada.

Se observó una marcada disminución del óxido nítrico en los sueros de los ratones tratados con AGEs.

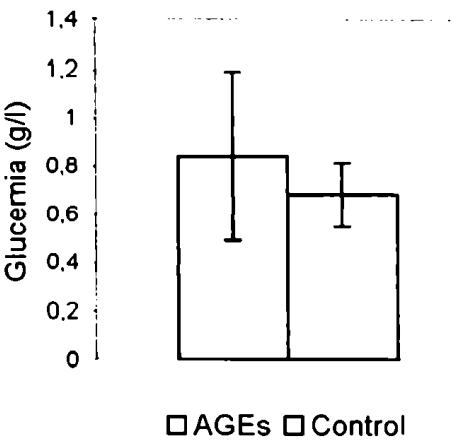


Figura 70: Nivel de glucosa en sueros de ratones. Método de glucosa oxidasa. $p: NS$.

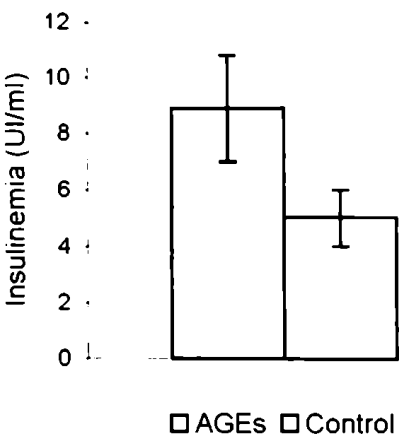


Figura 71: Nivel de insulina en sueros de ratones. Método de ELISA. $p<0.05$.

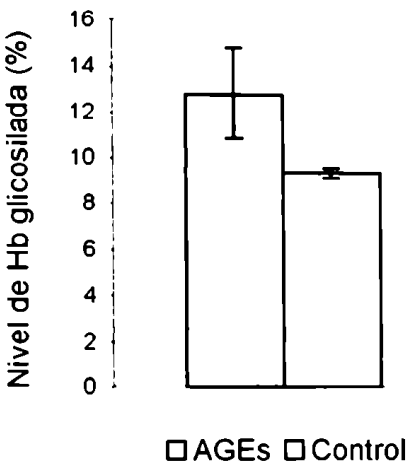


Figura 72: Nivel de hemoglobina glicosilada en sueros de ratones. $p<0.05$.

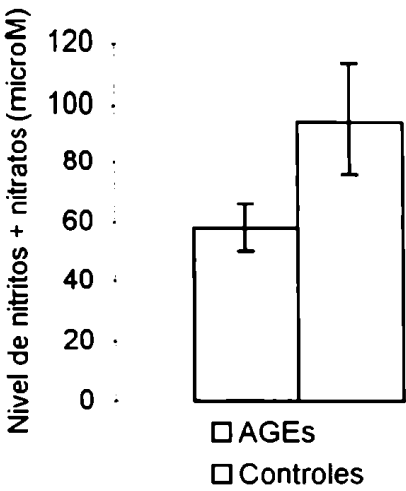


Figura 73: Nivel de NO en sueros de ratones. Método de Griess (nitritos + nitratos). $p<0.05$.

Grupo	Glu (g/l)	Ins (UI/ml)	HbA _{1c} %	Concentración de nitritos + nitratos (μM)
A) AGEs	0,84 ± 0,35	8,9 ± 1,9	12,8 ± 2,0	58 ± 8
B) Control	0,68 ± 0,13	5,0 ± 1,0	9,3 ± 0,2	95 ± 19
p	NS	<0,05	<0,05	<0,05

Tabla N° 18: Parámetros séricos de ratones controles y tratados con AGEs. Los resultados están expresados como media ± DE.

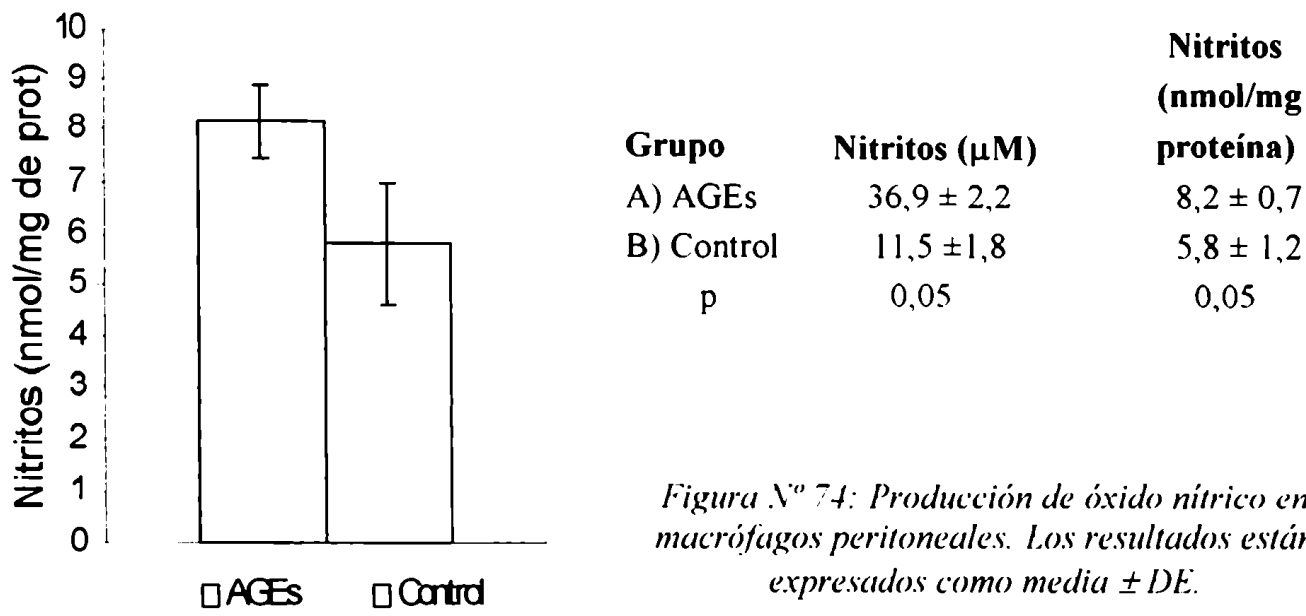
2.4 ANÁLISIS DE LA INDUCCIÓN DE iNOS EN MACRÓFAGOS PERITONEALES

2.4.1 Observación microscópica de extendidos de macrófagos

La activación con LPS fue efectiva para macrófagos provenientes de ambos grupos de ratones. Se observó el mismo cambio de morfología: un aumento de tamaño del citoplasma y degranulación.

2.4.2 Medición de nitritos en sobrenadantes de cultivos de macrófagos

La concentración de nitritos de los medios de cultivo de los macrófagos provenientes de animales pretratados con AGEs fue significativamente mayor (p < 0,05) que la de los controles. Esto refleja una mayor producción de óxido nítrico y sugiere la activación de eNOS y/o la inducción de iNOS.



2.4.3 Expresión de la enzima iNOS

El dot blot mostró un reconocimiento positivo de la enzima iNOS para el grupo A (tratados con BSA-AGEs) y negativo para el grupo B (tratados con BSA), sugiriendo la posible inducción de la síntesis de la proteína bajo la estimulación de AGEs. (Figura N° 75). El western blot mostró el mismo resultado. Además, las células tratadas con AGEs y marcadas por inmunofluorescencia indirecta, fueron positivas, mientras que las controles fueron negativas para iNOS.

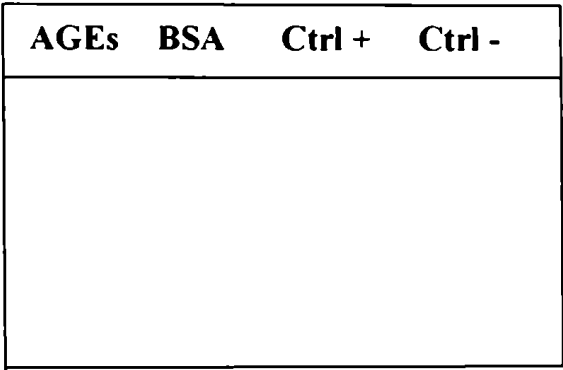


Figura N° 75: Dot Blot. Ctrl. + : control positivo, Ctrl.-: control negativo.

2.5 DISCUSIÓN.

2.5.1 Señalización Intracelular en respuesta a AGEs

Wu C. *et al*²⁵¹, demostraron que, en la línea celular RAW 264.7, macrófagos murinos, los AGEs son capaces de activar la traslocación de NF-kappaB a través de una cascada de fosforilaciones que involucra a PI3K, PKC y p38 MAPK. Si bien en el presente trabajo no se midió directamente expresión o translocación de NF-kB, los resultados obtenidos a partir de los animales inoculados apoyan el modelo propuesto inicialmente. Sin embargo no se puede descartar otro tipo de sensibilización a la acción de LPS como la inducción o activación de la expresión de receptores, intermediarios en la transducción de la señal u otros factores de transcripción.

2.5.2 El modelo experimental

Luego de cuatro semanas de inyecciones intraperitoneales de AGEs no se detectaron diferencias significativas en la glucemia. Sin embargo, los animales desarrollaron hiperinsulinemia y el nivel de hemoglobina glicosilada aumentó significativamente con respecto a los controles.

El aumento de la insulinemia en los ratones tratados puede llevar a la desensibilización de los receptores de insulina por endocitosis. Con el tiempo el animal dejaría de responder a la hormona y no podría regular la glucemia.

La glicosilación de la hemoglobina evidencia la presencia de AGEs en circulación.

Debido al aumento de la insulina, la glucosa permanece regulada, al menos en el momento de la extracción. Esto es característico de la diabetes tipo 2. La intolerancia a la glucosa es previa a la enfermedad. Esto es debido a que la complicación vascular comienza en una etapa preclínica.

En esta etapa, la glucemia basal puede resultar normal enmascarando así el problema cuando el análisis es de rutina. Por el contrario, el nivel de hemoglobina glicosilada puede predecir la enfermedad macrovascular. A su vez, la glucemia postprandial (o glucemia de segunda hora) correlaciona mejor con el riesgo de enfermedad cardiovascular. Algunos autores sugieren que la hiperglucemia postprandial debería ser considerada como un marcador de riesgo²⁵².

En los pacientes diabéticos tipo 2 en la etapa post-prandial se activan factores de la coagulación, se pierde la capacidad de vasodilatación, se activa la PKC en células vasculares y mesangiales, aumenta el *stress* oxidativo y la glicosilación no enzimática de proteínas dando lugar a la producción de AGEs. Como consecuencia, se dan las condiciones para que ocurra el daño vascular.

En este estudio se observaron los daños producidos por los AGEs. El monitoreo continuo de la glucemia no fue posible, sin embargo, los ratones resultaron un modelo interesante. Aunque no se reprodujeron todos los aspectos de la enfermedad, mostraron un cuadro similar a la intolerancia a la glucosa.

3 ANÁLISIS DE LA INDUCCIÓN DE iNOS EN CÉLULAS U-937.

La línea celular U-937 fue diferenciada a macrófagos (ver Materiales y Métodos, Figura N° 26). La diferenciación de U-937 a macrófagos fue corroborada por su habilidad de reducir el azul nitro-tetrazolio (NTB). Las células tratadas con DMSO 1% fueron teñidas con NTB y aproximadamente el 65 % mostró actividad fagocítica²⁵³.

3.1 MEDICIÓN DE NITRITOS EN SOBRENADANTES DE CULTIVO

Grupo	Nitritos (µM)	Nitritos (nmol/mg proteína)
A) AGEs	16.54 ± 5.76	2.52 ± 1.00
B) Control	2.89 ± 1.54	0.30 ± 0.04
p	0,05	0.05

Tabla N° 19: Los resultados están expresados como media ± DE.

3.2 EXPRESIÓN DE LA ENZIMA iNOS

Los lisados de células tratadas con AGEs mostraron reactividad positiva para iNOS por western blot, mientras que los controles sólo mostraron el *background* inespecífico. Esto indicaría que el aumento encontrado en la producción de óxido nítrico correspondería a una inducción de iNOS *in vitro* por acción de AGEs.

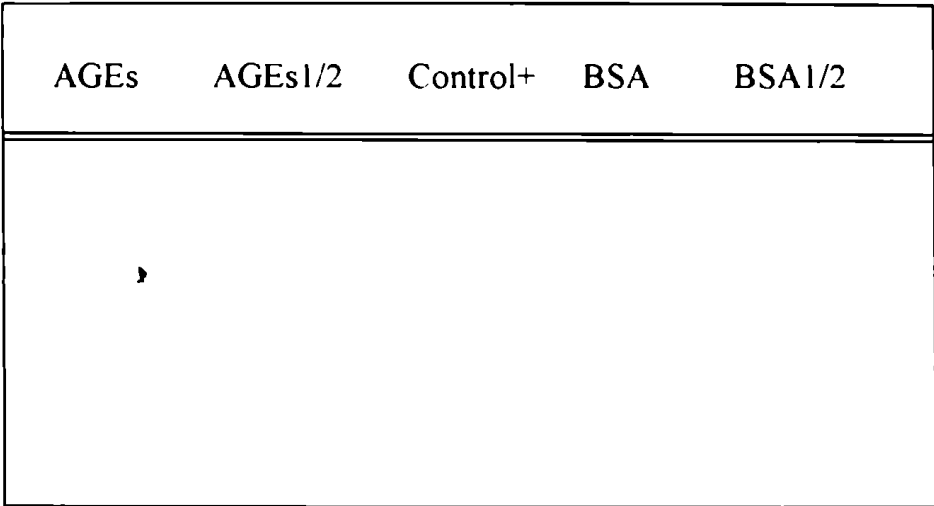


Figura N° 76: Dot Blot. AGEs y BSA: 300 µg/ml. AGEs y BSA ½: 150µg/ml.
Control+: iNOS obtenida a partir de macrófagos murinos.

Control BSA BSA-AGEs
Negativo

Figura N° 77: Western Blot. Expresión de iNOS en las células tratadas con AGEs.

3.3 DISCUSIÓN

3.3.1 Los productos de glicosilación avanzada en la disfunción endotelial

Los AGEs juegan un papel importante en el desarrollo de la disfunción endotelial en pacientes con DBT tipo 2. El daño endotelial observado en las aortas abdominales de los ratones inyectados vía intra-peritoneal con AGE-BSA confirma la primera hipótesis del trabajo: la presencia de AGEs (AGE-BSA) en circulación, y no la misma proteína sin glicosilar (BSA), contribuye al deterioro endotelial.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Pankewycz O.G. *et al*²⁵⁴ y con los de Popov D. *et al*²⁵⁴ (ratones espontáneamente diabéticos). En lesiones ateroscleróticas humanas también se detectaron, por métodos inmunohistoquímicos, una deposición extracelular de AGEs difusa y deposiciones intracelulares densas en células espumosas derivadas de macrófagos y en CMLV.

Se ha sugerido que estas moléculas glicosiladas depositadas en las lesiones ateroscleróticas son endocitadas por los macrófagos en una etapa temprana y luego por las CMLV a través de un RAGE en una etapa avanzada²⁵⁵.

El aumento de la expresión de iNOS es una de las respuestas celulares a la interacción AGE-RAGE. Según los resultados obtenidos, tanto los macrófagos peritoneales murinos como los macrófagos derivados de la línea celular monoblástica humana U-937 aumentan su producción de NO y la expresión de la enzima iNOS luego de la incubación con AGEs. Esta respuesta se observó también en CE y en macrófagos RAW 264.7²⁵⁶. Estos resultados confirman otra de las hipótesis: los AGEs aumentan la expresión de iNOS *in vitro* e *in vivo*.

Ante estos resultados y teniendo en cuenta los altos niveles séricos de NO hallados en pacientes hipertensos y con DBT tipo 2, se esperaba que los sueros de los ratones tratados con AGEs dieran el mismo resultado. Sin embargo, los resultados fueron contrarios (Figura N° 73). Los animales tratados mostraron un nivel de NO significativamente menor a los controles. El método utilizado mide indirectamente NO biodisponible (a través de nitritos y nitratos) y no otros compuestos nitrosilados. Es probable que el NO producido por iNOS en estas condiciones reaccione con anión superóxido (O_2^-) y forme peroxinitritos ($ONOO^-$) que no son detectados. En condiciones normales, la generación de O_2^- es mínima (controles) sin embargo ésta aumenta significativamente en condiciones altamente oxidativas (presencia de AGEs, hiperglucemia). También debe tenerse en cuenta que los AGEs son capaces de neutralizar el NO por un fenómeno de *quenching*.

Dado que los peroxinitritos son altamente citotóxicos, se presume que mediaron algunos de los efectos de citotoxicidad por AGEs y contribuyeron al deterioro endotelial.

Conclusiones

CONCLUSIONES

La evaluación de la disfunción endotelial que presentan los DBT tipo 2 implicó que se realizaran diferentes estudios en los cuales se determinaron siempre los parámetros metabólicos basales que definen a la enfermedad. En cada uno de los grupos de pacientes diabéticos se determinaron, además, distintos parámetros especiales y no habituales en el *screening* clínico.

El tamaño de las poblaciones de pacientes evaluadas, en cada caso clínico, se debió a la disponibilidad de los mismos en los diferentes momentos en que fueron estudiados.

En todos los casos, se seleccionaron a los pacientes en función del perfil clásico de DBT tipo 2 y se analizaron sus variantes de angiopatías.

1. Los pacientes DBT tipo 2 expresan marcadores de activación plaquetaria: CD62P y CD63.

La expresión de CD62P y CD63 en la membrana plaquetaria es consecuencia de la acción de agonistas tales como trombina, ADP, colágeno, etc. Los pacientes DBT tipo 2 estudiados se dividieron en dos grupos. Dentro del **Grupo 1**, el 70 % expresaron los mayores niveles de CD62P y CD 63, que correspondieron a los niveles más elevados de Gl y HbA_{1c} (Tablas N° 8 y N° 9). En el **Grupo 2** de pacientes, con características clínicas más moderadas de diabetes respecto al **Grupo 1**, se hallaron niveles similares de Gl y HbA_{1c}, (Tabla N° 8) sin embargo, ninguno de los casos presentó expresión CD62P y/o CD63 en la membrana plaquetaria. En estos pacientes, con menor daño endotelial, la dosis de aspirina administrada (325 mg), sería suficiente para inhibir la activación plaquetaria.

2. Los pacientes DBT tipo 2, hipertensos tienen alterado el metabolismo del NO y presentan altos niveles de sP-Sel.

A pesar de los altos niveles de NO encontrados en los pacientes estudiados, el estado hipertensivo persistió; en estas situaciones la biodisponibilidad de NO podría estar reducida por mecanismos que involucrarían al anión superóxido. Se encontró que los niveles de NO e I correlacionaron en los dos grupos de pacientes y que niveles elevados de HbA_{1c} y Gl correlacionaron con el aumento de expresión de CD62P, es decir, con el aumento de activación plaquetaria en los pacientes diabéticos.

En la diabetes los niveles de sP-Sel se encuentran aumentados y relacionados con la activación plaquetaria y la trombosis. En los pacientes estudiados no se observó correlación entre los niveles plasmáticos del FvW y de sP-Sel, sugiriendo que esta última tiene un mecanismo de liberación que no depende de los mismos parámetros que el FvW, pero se encontró una correlación positiva en el **Grupo A** entre sP-Sel e I. sP-Sel podría ser un producto de liberación endotelial y especialmente plaquetaria en estos pacientes.

Se halló que los niveles de I correlacionaron con los valores de CD62P, NO y sP-Sel en los pacientes diabéticos y con los niveles de NO en los pacientes hipertensos.

El aumento en el nivel de FvW, en la expresión de CD62P, en la liberación de sP-Sel y de las citoquinas proinflamatorias como el $\text{TNF}\alpha$, contribuyeron en estos pacientes, a un mayor riesgo de padecer eventos trombóticos.

3. Existe un desbalance entre la síntesis y liberación de ET-1 y NO por el endotelio vascular alterado. Se encuentran niveles aumentados de reactantes de fase aguda tales como Fg, FvW y PAI-1.

Se encontró una correlación positiva y significativa entre NO e I y entre NO y FvW ($p < 0.05$) y PCR vs FvW ($p < 0.001$) en el grupo de pacientes. Se hallaron niveles de ET-1, NO, FvW, PCR y Fg aumentados en los pacientes respecto de los controles (ver Tabla N° 11).

A pesar de los niveles altos de NO, como ya se dijo, el estado hipertensivo de los pacientes, se mantuvo, por la baja biodisponibilidad NO y también por los elevados niveles de ET-1. La acumulación de metilargininas endógenas²⁵⁷ conduce a la generación alterada de NO y también incrementa la producción de anión superóxido y en consecuencia la formación de peroxinitritos.

La hipercolesterolemia, la hiperglucemia y la aterosclerosis interfieren con la producción de NO endotelial. El estado de insulino-resistencia agrava, sin dudas, la patología vascular aumentando la producción y liberación de ET-1.

El Fg y el FvW, reactantes de fase aguda, están significativamente elevados y este conjunto de factores de riesgo conducen inexorablemente a un estado protrombótico.

4. La condición de insulino-resistencia está asociada al aumento de liberación de FvW y PAI-1.

El nivel de PAI-1 correlaciona con la insulinemia. Esto concuerda con la fibrinólisis disminuida hallada en el estado de insulino resistencia.

5. Las drogas antihipertensivas del tipo IECA mejoran significativamente la función endotelial de los pacientes

Las drogas tipo IECA producen una mejoría de la función endotelial, produciendo una mayor vasodilatación, medida a través del aumento del DA post-isquemia. Los β -bloqueantes que además inducen la síntesis de NO, producen una mayor respuesta vasodilatadora que los IECA.

6. Las HUVEC son sensibles a la acción de AGEs modificando la expresión de iNOS y la producción de NO y FvW.

Los estudios experimentales realizados con HUVEC en presencia de AGEs, dieron resultados que concordaron con lo hallado en los pacientes diabéticos tipo2 ya que hubo mayor liberación de FvW y se expresó la iNOS.

La migración incrementada de HUVEC en presencia de AGEs, podría explicar las interrupciones que se ocasionan en el endotelio vascular en la DBT 2.

7. Los ratones tratados con AGEs producen un cuadro de hiperinsulinemia y aumento significativo de HbA_{1c}, manteniendo controlada la glucemia.

La producción de NOS se ve afectada. Hay daño vascular en los grandes vasos y en los riñones.

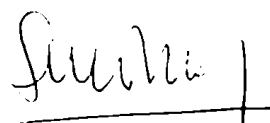
8. Los macrófagos peritoneales de ratones tratados con AGEs expresan grandes cantidades de iNOS.

En los ratones se vio un cuadro de hiperinsulinemia, con glucemia conservada, pero con aumento de hemoglobina glicosilada y modificaciones del metabolismo del NO. También se expresó la iNOS en macrófagos peritoneales, además, se produjo daño endotelial de los grandes vasos y en los glomérulos renales de los animales. Se observó acumulación de AGEs en las CE.

9. La línea celular monoblástica humana U-937 diferenciada a macrófagos expresa grandes cantidades de iNOS cuando es cultivada en presencia de AGEs.

En la línea celular U-937 diferenciada a macrófago, se produjo la expresión de iNOS por acción de AGEs, de forma similar a la de los macrófagos provenientes de ratones tratados con AGEs. Uno de los mecanismos de inducción iNOS sería a través de la acción de AGEs.

Los resultados experimentales obtenidos concuerdan con los hallados en los pacientes estudiados y explican desde el punto de vista de la acción de los AGEs parte de los trastornos presentes en la angiopatía diabética tipo 2.


Susana M. Cecilia


Dra. Beatriz Sussuth

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

1. Dobrin PB. Vascular mechanics. In: Sheperd JT, Abboud FM, eds. Geiger SR, exec. ed. *Handbook of Physiology. Section 2: The Cardiovascular System. Volume III. Peripheral Circulation and Organ Blood Flow. Part I*. Bethesda, Maryland: American Physiological Society 1983; 65-102.
2. Opie LH. The Heart: physiology and metabolism. Second edition. New York, Mc Graw Hill, 1991.
3. Latham RD, Pulse propagation in the systemic arterial tree. In: Westerhof N, Gross DR, eds. *Vascular Dynamics: Physiological perspectives*. New York and London: Plenum Press 1989; 49-68.
4. Taylor MG. Wave travel in arteries and the desing of cardiovascular system. In: Attinger EO, ed. *Pulsatile Blood Flow*. New York: Mc Graw Hill 1964; 343-347.
5. Yin FCP, Zharong L. Arterial compliance-physiological viewpoint. In: Westerhof N, Gross DR, eds. *Vascular Dynamics: Physiological perspectives*. New York and London: Plenum Press 1989; 9-22.
6. Burton AC. Relation of structure to function of tissues of the wall of blood vessels. *Physiol Rev* 1954; 34: 619-642.
7. Milnor WR. *Hemodynamics*. Baltimore/London: Williams & Wilkins 1982; 56-96.
8. Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* 1995; 75: 510-560.
9. Noll G, Tschudi M, Nava E, Luscher TF 1997) Endothelium and high blood pressure. *Int J Microcirc Clin Exp* 1997; 17(5): 273-279.
10. Cines D, Pollak E, Buck C *et al*. Endothelial cells in Physiology and in the Pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998; 91: 3527-81.
11. Vapaatalo H, Mervaala E. Clinically important factors influencing endothelial function. *Med Sci Monit* 2001; 7(5): 1075-1085.
12. Takeda K, Duchene A, Snetkov V. Endothelial ion channels and their functions. *Vascular Endothelium* 1997; 177-204. Born GVR, Schwartz CJ, eds. Stuttgart, Alemania.
13. Luscher TF, Barton M. Biology of the endothelium. *Clin Cardiol* 1997; 20 (11 Suppl 2): II-3-10.
14. Dejana E. La cellula endoteliale: una cellula strutturalmente semplice ma funzionalmente molto complessa. *Resenti Progressi in Medicina* 1992, 83 (10): 582-591.

-
15. Zalba G, Beaumont J, San Jose G, *et al.* Vascular oxidant stress: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol Biochem* 2000; 56 (1): 57-64.
 16. Fajardo LF. The complexity of endothelial cells. *Am J Clin Pathol* 1989; 92: 241-250.
 17. Bercker CC. Contractile and relaxing proteins of smooth muscle and platelets: their presence in the endothelium. *Ann N Y Acad Sci* 1976; 275: 78-86.
 18. Citi S. The molecular organization of tight junctions. *J Cell Biol* 1993; 121: 485-9.
 19. Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 1996; 84: 345-357.
 20. Frenette PS, Wagner DD. Molecular medicine. Adhesion molecules - Part I. *N England J Med* 1996; 334 (23): 1526-1529.
 21. Dejana E, Corada M, Lampugnani MG. Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J* 1995; 9: 910-918.
 22. Jaffe EA. Cell biology of endothelial cells. *Hum Pathol* 1987; 234-239.
 23. García JGN, Pavalko FM, Patterson CE. Vascular endothelial cell activation and permeability responses to thrombin. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995; 6: 609-626.
 24. Casnocha SA, Eskin SG, Hall ER *et al.* Permeability of human endothelial monolayers: effect of vasoactive agonists and cAMP. *J Appl Physiol* 1989; 67: 1997-2005.
 25. García JGN, Fenton JW, Natarajan V. Thrombin stimulation of human endothelial cell phospholipase D activity. Regulation by phospholipase C, protein kinase C and cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate. *Blood* 1992; 79: 2050-2067.
 26. Byers HR, White GE, Fujiwara K. Organization and function of stress fibers *in vitro* and *in situ*: a review. *Cell Muscle Motil* 1983; 5: 83-137.
 27. Cowin P, Burke B. Cytoskeleton-membrane interactions. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8: 56-65.
 28. Harris JR. *Blood Cell Biochemistry*. Vol 2. 1991. Editorial Plenum. New York.
 29. Born GV, Palinski W. Unusually high concentrations of sialic acids on the surface of vascular endothelia. *Br J Exp Pathol* 1985; 66 (5): 543-549.
 30. Glagov S, Zarins C, Giddens D P, *et al.* Hemodynamics and atherosclerosis: insights and perspectives gained from studies of human arteries. *Arch. Pathol. Lab. Med* 1988; 112: 1018-31.

-
31. Stary H C, Blankenhorn D H, Chandler A B, *et al.* A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. *Circulation* 1992; 85: 391-405.
 32. Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, *et al.* Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 1992; 68(4): 673-82.
 33. Takeda K, Duchene A, Snetkov V. Endothelial ion channels and their functions. *Vascular Endothelium* 1997; 177-204. Born GVR, Schwartz CJ, eds. Stuttgart, Alemania.
 34. Chang W-J, Ying Y-S, Rothberg KG, *et al.* Purification and characterization of smooth muscle cell caveolae. *J Cell Biol* 1994; 126:127-38.
 35. Gerritsen M.F. Functional heterogeneity of vascular endothelial cells. *Biochem. Pharmacol.* 1987; 2701-11.
 36. Cosentino F, Rubattu S, Savoia C, *et al.* Endothelial dysfunction and stroke. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001 Nov; 38 Suppl 2: S75-8.
 37. Stehouwer CDA, Lambert J, Donker AJM, *et al.* Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy. *Cardiovasc Res* 1997; 34: 55-68.
 38. Vane JR, Angaard EE, Botting RM. Mechanisms of disease: Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990; 323: 27-36.
 39. Goto M, Liu Y, Yang XM, *et al.* Role of bradykinin in protection of ischaemic preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res* 1995; 77: 611-621.
 40. Grossman E, Messerli FH. Diabetic and hypertensive heart disease. *Ann Inter Med* 1996; 125: 304-310.
 41. Pinkney JH, Stehouwer CD, Coppack SW, *et al.* Endothelial dysfunction: cause of the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 1997; 46 (Suppl 2): S9-S13.
 42. Cosentino F, Luscher TF. Effects of blood pressure and glucose on endothelial function. *Curr Hypertens Rep.* 2001 Feb; 3(1): 79-88.
 43. Boullier A, Bird DA, Chang MK, *et al.* Scavenger receptors, oxidized LDL, and atherosclerosis. *Ann NY Acad Sci* 2001 Dec; 947:214-22.
 44. Aronson D, Rayfield EJ. *Diabetes*. In: Topol EJ (editor) Textbook of cardiovascular medicine. Lippincott-Raven 1998: 171-194.
 45. Napoli C, de Nigris F, Palinski W. Multiple role of reactive oxygen species in the arterial wall. *J Cell Biochem.* 2001; 82(4): 674-82.
 46. Juhan-Vague I, Alessi MC, Vague P. Increased plasma plasminogen activator inhibitor 1 levels: a possible link between insulin resistance and atherothrombosis. *Diabetologia* 1991; 34: 457-462.

-
47. Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 77-804.
 48. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of the endothelial cells in the relaxation of the arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1981; 288: 373-376.
 49. Furchgott RF. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ Res* 1983; 53 (5): 557-573.
 50. Ignaro LJ, Buga GM, Wood KS, *et al.* Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9265-9269.
 51. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526.
 52. Snyder SH, Bret DS. Funciones biológicas del óxido nítrico. *Investigación y Ciencia* 1992; Jul: 12-20.
 53. Li H, Fostermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* 2000; 190: 244-54.
 54. Mayer B, Hemmens B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 477-481.
 55. Moncada S, Higgs EA. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J* 1995; 13: 19-30.
 56. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N England J Med* 1993; 329: 2001-2012.
 57. Griendling K K, Minieri C A, Ollerenshaw J D, *et al.* Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994; 74: 1141-8.
 58. Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 1999; 43: 521-531.
 59. Papapetropoulos A, Rudic RD, Sessa WC. Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 1999; 43: 509-520.
 60. Wang Y, Marsden PA. Nitric oxide synthases: gene structure and regulation. *Adv Pharmacol* 1995; 34: 71-90.
 61. Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer and medicine. *Lancet* 1994; 343: 1199-1206.

-
62. Segal SS, Brett SE, Sessa WC. Co-distribution of NOS and caveolin throughout peripheral vasculature muscle of hamster. *Am J Physiol* 1999; 277 (3 Pt 2): H1167-H1177.
63. Nakane M, Mitchell J, Forstermann U, *et al.* Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 180: 1396-1402.
64. Forstermann U, Kleinert H, Gath I, *et al.* Expression and expressional control of nitric oxide synthases in various cell types. *Adv Pharmacol* 1995; 34: 171-186.
65. Cosentino F, Luscher TF. Tetrahydrobiopterin and endothelial nitric oxide synthase activity. *Cardiovasc Res.* 1999 Aug 1; 43(2): 274-8.
66. Giulini C, Poderoso JJ, Boveris A. Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem* 1998; 273: 11038-43.
67. Radomski MK, Moncada S. Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide. *Thrombosis and Haemostasis* 1993; 70 (1): 36-41.
68. Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 1994; 269: 13725-13728.
69. Corson MA, James NL, Latta SE, *et al.* Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res* 1996; 79: 984-991.
70. Thadani U. Oral nitrates: more than symptomatic therapy in coronary artery disease? *Cardiovasc Drugs & Ther* 1997; 11 (Suppl 1): 213-218.
71. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142.
72. Uematsu M, Ohara Y, Navas JP, *et al.* Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol* 1995; 269: C1371-C1378.
73. Lüscher T, Barton M. Biology of Endothelium. *Clin Cardiol* 1997; 20 (Suppl 2): 1-3-10.
74. Ignarro LJ, Byrns RE, Wood KS. Endothelium-dependent modulation of cGMP levels and intrinsic smooth muscle tone in isolated bovine intrapulmonary artery and vein. *Circ Res* 1987; 60 (1): 82-92.
75. Marsden PA, Heng HII, Scherer SW, *et al.* Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1993; 268: 17478-17488.
76. Hibbs Jr JB, Taintor RR, Vavrin Z, *et al.* Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 157: 87-94.

-
77. Haynes WG, Webb DJ. The endothelin family of peptides: local hormones with diverse roles in health and disease?. *Clin Sci* 1993; 84: 485-500.
78. Levin ER. Endothelins. *N Engl J Med* 1995; 333: 356-363.
79. Yanagisawa M, Masaki T. Molecular biology and biochemistry of the endothelins. *Trends Pharmacol Sci* 1998; 10: 374-378.
80. Inoue A, Yanagisawa M, Takuwa Y, *et al.* The human preproendothelin-1 gene. *J Biol Chem* 1989;264: 14954-14959.
81. Schweizer A, Valdenaire O, Nelbock P, *et al.* Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with three distinct subcellular locations. *Biochem J* 1997; 328: 871-877.
82. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, *et al.* The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 10: 374-378.
83. Masaki T. The endothelin family: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 35 (4): S3-5.
84. Lavallec M, Takamura M, Parent R *et al.* Crosstalk between endothelin and nitric oxide in control of vascular tone. *Heart Fail Rev* 2001; 6 (4): 265-276.
85. Summer MJ, Cannon TR, Mundin JM, *et al.* Endothelin ET_A and ET_B receptors mediate vascular smooth muscle contraction. *Br J Pharmacol* 1992; 107: 858-860.
86. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, *et al.* Role of endothelin in the control of peripheral vascular tone in human hypertension. *Heart Fail Rev* 2001; 6 (4): 277-285.
87. Seo B, Oemar BS, Siebenmann R, *et al.* Both ET_A and ET_B receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels. *Circulation* 1994; 89: 1203-1208.
88. Lüscher TF, Oemar BS, Boulanger CM, *et al.* Molecular and cellular biology of endothelin and its receptors – Part I. *J Hypertens* 1993; 11: 7-11.
89. Clozel M, Gray GA, Breu V, *et al.* The endothelin ET_B receptor mediates both vasodilatation and vasoconstriction in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 186: 867-873.
90. Lüscher TF, Wenzel RR. Endothelin and endothelin antagonists: pharmacology and clinical implications. *Agents Actions Suppl* 1995; 45: 237-253.
91. Lam HC. Role of endothelin in diabetic vascular complications. *Endocrine* 2001; 14 (3): 277-284.
92. Cowburn PJ, Cleland JGF. Endothelin antagonist for chronic heart failure: do they have a role?. *Eur Heart J* 2001; 22: 1772-84.

-
93. Sadler JE. von Willebrand factor. *J Biol Chem* 1991; 266: 22777-22780.
94. Wagner DD. The Weibel-Palade body: the storage granule for von Willebrand factor and P-selectin. *Thromb Haemost* 1993; 70 (1): 105-110.
95. Tsai H-M, Nagel RL, Hatcher VB, *et al.* The high molecular weight form of endothelial cell von Willebrand factor is released by the regulated pathway. *Br J Haematol* 1991; 79: 239-245.
96. Meyer D, Girma JP. von Willebrand factor: structure and function. *Thromb Haemost* 1993; 70: 99-104.
97. Federici AB, Bader R, Pagani S, *et al.* Binding of von Willebrand factor to glycoproteins Ib and IIb/IIIa complex: affinity is related to multimeric size. *Br J Haematol* 1989; 73: 93-9.
98. Budde U, Schneppenheim R. von Willebrand factor and von Willebrand disease. *Rev Clin Exp Hematol* 2001; 54: 335-368.
99. Pottinger BE, Read RC, Palcolog EM, *et al.* von Willebrand factor is an acute phase reactant in man. *Thromb Res* 1989; 53: 387-394.
100. Blann AD. von Willebrand factor and the endothelium in vascular disease. *Br J Biomed Sci* 1993; 50: 125-134.
101. Blann AD, Miller JP, Waite M, *et al.* Endothelial cell injury in the risk factor of atherosclerosis. *Br J Surg* 1992; 79: 367.
102. Thompson SG, Kienast J, Pyke SD, *et al.* Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. *N Engl J Med* 1995; 332: 635-41.
103. Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH, *et al.* von Willebrand factor and cardiovascular disease. *Thromb Haemost* 1993; 70 (1): 111-118.
104. Aso Y, Fujiwara Y, Tayama K, *et al.* Relationship between plasma soluble thrombomodulin levels and insulin resistance syndrome in type 2 diabetes: a comparison with von Willebrand factor. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001; 109: 210-216.
105. Lip G, Blann A. von Willebrand factor: a marker of endothelial dysfunction in vascular disorders?. *Cardiovasc Res* 1997; 34: 255-265.
106. Johnston GI, Bliss GA, Newman PJ, *et al.* Structure of the human gene encoding GMP-140, a member of the selectin family of adhesion receptors for leukocytes. *J Biol Chem* 1990; 265: 21381-5.
107. Mc Ever PR. GMP-140: a receptor for neutrophils and monocytes on activated platelets and endothelium. *J Cell Biochem* 1991; 45: 156-61.

-
108. Furie B, Furie BC. The Molecular basis of platelet and endothelial cell interaction with neutrophils and monocytes: role of P-selectin and the P-selectin ligand PSGL-1. *Thromb Haemost* 1995; 74: 224-27.
109. Bonfanti R, Furie BC, Furie B, *et al.* PADGEM is a component of Weibel-Palade bodies in endothelial cells. *Blood* 1989; 73: 1109-1112.
110. McEver RP. Leukocyte interactions mediated by selectins. *Thromb Haemost* 1991; 66:80-7.
111. Fijnheer R, Frijns CJ, Korteweg J, *et al.* The origin of P-selectin as a circulating plasma protein. *Thromb Haemost* 1997; 77:1081-5.
112. Blann AD, Lip GYH, Beevers DG, *et al.* Soluble P-selectin in atherosclerosis: a comparison with endothelial cell and platelet markers. *Thromb Haemost* 1997; 77:1077-80.
113. Hanley W, McCarty O, Jadhav S, *et al.* Single molecule characterization of P-selectin/ligand binding. *J Biol Chem* 2003; 278 (12): 10556-61.
114. Eniola AO, Willcox PJ, Hammer DA. Interplay between rolling and firm adhesion elucidated with a cell-free system engineered with two distinct receptor-ligand pairs. *Biophys J* 2003; 83 (4): 2720-31.
115. Ley K. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol Med* 2003; 9 (6): 263-8.
116. Gurney D, Lip GY, Blann AD. A reliable plasma marker of platelet activation: does it exist? *Am J Hematol* 2002; 70 (2): 139-44.
117. McDonagh PF, Hokama JY, Gale SC, *et al.* Chronic expression of platelet adhesion proteins is associated with severe ischemic heart disease in type 2 diabetic patients: Chronic platelet activation in diabetic heart patients. *J Diabetes Complications* 2003; 17 (5): 269-78.
118. Cha JK, Jeong MH, Jang JY, *et al.* Serial measurement of surface expressions of CD63, P-selectin and CD40 ligand on platelets in atherosclerotic ischemic stroke. A possible role of CD40 ligand on platelets in atherosclerotic ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2003; 16 (4): 376-82.
119. Wiman B, Chmielewska J, Ranby M. Inactivation of tissue plasminogen activator in plasma. Demonstration of a complex with a new rapid inhibitor. *J Biol Chem* 1984; 259: 3644-3647.
120. Carmeliet P, Collen D. Molecular genetics of the fibrinolytic and coagulation systems in haemostasis, thrombogenesis, restenosis and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1997; 8: 118-25.

-
121. Sakkinen PA, Cushman M, Psaty BM, *et al.* Relationship of plasmin generation to cardiovascular disease risk factors in elderly men and women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 499-504.
122. Ye S, Green FR, Scarabin PY, *et al.* The 4G/5G genetic polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) associated with differences in plasma PAI-1 activity but not with risk of myocardial infarction in the ECTIM study. *Thromb Haemostas* 1995; 837-41.
123. Kushner I. Regulation of the acute phase response by cytokines. *Perspect Biol Med* 1993; 36: 611-622.
124. Festa A, D' Agostino R Jr, Tracy RP, *et al.* Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes* 2002; 51 (4): 1131-1137.
125. Cesari M, Sartori MT, Patrassi GM, *et al.* Determinants of plasma levels of plasminogen activator inhibitor-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 316-320.
126. Juhan-Vague I, Alessi MC. PAI-1, Obesity, Insulin Resistance and Risk of Cardiovascular Events. *Thrombosis and Haemostasis* 1997; 78 (1): 656-660.
127. Desprès JP, Lamarche B, Mauriège P, *et al.* Hyperinsulinemia as an independent risk factor for ischemic heart disease. *N England J Med* 1996; 334:952-957.
128. 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.
129. Cosentino F, Luscher TF. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 32 Suppl 3: S54-61.
130. Schiekofer S, Balletshofer B, Andrassy M, *et al.* Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26: 503-512.
131. Creager MA, Luscher TF, Cosentino F, *et al.* Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. *Circulation* 2003; 108 (12): 1527-1532.
132. DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance: a multifacetic syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*. 1991; 14: 173-194.
133. National Data Group Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 1979; 28: 1039-1057.
134. Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1998; (suppl 1), 21: S5-S19.

-
135. Ieroith D, Draznin B. Molecular biology of diabetes: Autoimmunity and genetics: Insulin synthesis and secretion. Humana Press, 1994.
136. Luscher TF, Creager MA, Beckman JA, *et al.* Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences and medical therapy: Part II. *Circulation* 2003; 108 (13): 1655-61.
137. Wahren J, Ekberg K, Johansson J, *et al.* Role of C-peptide in human physiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278: E759-E768.
138. Mather K, Anderson TJ, Verma S. Insulin action in the vasculature: physiology and pathophysiology. *J Vasc Res* 2001; 38 (5): 415-422.
139. Festa A, D'Agostino R Jr, Tracy RP, *et al.* Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes* 2002; 51 (4): 1131-7.
140. Wautier JL, Wautier MP, Schmidt AM, *et al.* Advanced glycation end products (AGEs) on the surface of diabetic red cells bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant stress in the vasculature: a link between surface-associated AGEs and diabetic complications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 7742-7746.
141. Depres JP, Lamarche B, Maureige P, *et al.* Hyperinsulinemia as an independent risk factor for ischemic heart disease. *N Engl J Med* 1996; 334: 952-957.
142. Cleland SJ, Petric JR, Small M, *et al.* Insulin action is associated with endothelial function in hypertension and type 2 diabetes. *Hypertension* 2000; 35 (1Pt2):507-11.
143. Igarashi M, Wakasaki H, Takahara N, *et al.* Glucose or diabetes activate p38 mitogen-activated protein kinase via different pathways. *J Clin Invest* 1999; 103: 185-195.
144. Brownlee M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med* 1995; 46: 223-234.
145. Wautier JL, Guillausseau PJ. Advanced glycation end products, their receptors and diabetic angiopathy. *Diabetes Metab* 2001; 27: 535-542.
146. Schmidt AM, Brett J, Yan SD, *et al.* Cellular receptor for advanced glycation end products. Implication for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *Arteriosclero Thromb* 1994; 14: 1521-1528.
147. Brett J, Schmidt AM, Zou YS, *et al.* Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol* 1993; 143:1699-1712.
148. Bucala R, Tracey KJ, Cerami A. Advanced glycosilation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilation in experimental diabetes. *J Clin Invest* 1991; 87: 432-438.

-
149. Nagai R, Matsumoto K, Ling X, *et al.* Glycolaldehyde, a reactive intermediate for advanced glycation end products, plays an important role in the generation of an active ligand for the macrophage scavenger receptor. *Diabetes* 2000; 49 (10): 1714-23.
150. Popov D, Hasu M, Costache G, *et al.* Capillary and aortic endothelial interact in situ with nonenzymatically glycated albumin and develop specific alterations in early experimental diabetes. *Acta Diabetol* 1997; 34 (4): 285-93.
151. Vallejo S, Angulo J, Periro C, *et al.* Highly glycated oxyhaemoglobin impairs nitric oxide relaxations in human mesenteric microvessels. *Diabetologia* 2000; 43: 83-90.
152. Singer DE, Nathan DM, Anderson KM, *et al.* Association of HbA1c with prevalent cardiovascular disease in the original cohort of the Framingham Heart Study. *Diabetes* 1992; 41: 202-208.
153. Thornalley PJ. Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs. *Cell Mol Biol* 1998; 44 (7): 1013-1023.
154. Schickofer S, Balletshofer B, Andrassy M, *et al.* Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26 (5): 503-11.
155. Garg A. Insulin resistance in the pathogenesis of dyslipidaemia. *Diabetes Care* 1996; 4: 387-389.
156. Tesfamariam B, Cohen RA. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am J Physiol* 1992; 263: H321-H326.
157. WattsGF, Playford DA. Dyslipoproteinaemia and hyperoxidative stress in the pathogenesis of endothelial dysfunction in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1998; 141: 17-30.
158. Marfella R, Esposito K, Giunta R, *et al.* Circulating Adhesion Molecules in Humans: Role of Hyperglycemia and Hyperinsulinemia. *Circulation* 2000; 101: 2247-2251.
159. Duckworth WC. Hyperglycemia and cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep* 2001; 3 (5):383-91.
160. UK Prospective Diabetes Study Group. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. *BMJ* 1998; 317: 713-720.
161. Baron AD. Insulin resistance and vascular function. *J Diabetes Complications* 2002; 16 (1): 92-102.

-
162. Frayn KN. Insulin resistance and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol* 1993; 4: 194-204.
163. Wison PW, Kannel WB, Anderson KM. Lipids, glucose intolerance and vascular disease: The Framingham study. *Monogr Atheroscler* 1985; 13: 1-11.
164. Vague P, Juhan Vague I, Aillaud MF. Correlation between blood fibrinolytic activity, plasminogen activator inhibitor level, plasma insulin level and relative bodyweight in normal and obese subjects. *Metabolism* 1986; 35: 250-3.
165. Mogensen CE, Chachati A, Christensen CK, *et al.* Microalbuminuria: an early marker of renal involvement in diabetes. *Uremia Invest 1985-1986*; 9 (2): 85-95.
166. American Diabetes Association: Clinical practice recommendations. Diabetes nephropathy. *Diabetes Care* 1999; suppl 1. 22: S66-S69.
167. Haffner SM. Management of dyslipidaemia in adults with diabetes. *Diabetes Care* 1998; 21: 160-178.
168. Schneider DJ, Nordt TK, Sobel BE. Attenuated fibrinolysis and accelerated atherogenesis in type II diabetic patients. *Diabetes* 1993; 42: 1-7.
169. Yudkin JS. Abnormalities of coagulation and fibrinolysis in insulin resistance. Evidence for a common antecedent? *Diabetes Care* 1999; 22: C25-C30.
170. Mannucci PM. von Willebrand factor: a marker of endothelial damage? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1359-1362.
171. Imperatore G, Riccardia G, Iovine C, *et al.* Plasma fibrinogen: a new factor of the metabolic syndrome. A population-based study. *Diabetes Care* 1998; 21: 649-665.
172. Tkac I, Molcanyiova A. Fibrinogen and albuminuria are related to the presence and severity of peripheral arterial disease in women with type 2 diabetes mellitus. *Angiology* 1997; 48: 715-9.
173. Frohlich J, Steiner G. Dyslipemia and coagulation defects of insulin resistance. *Int J Clin Pract Suppl* 2000; 113: 14-22.
174. Lee AJ, MacGregor AS, Hau CM, *et al.* The role of haematological factors in diabetic peripheral arterial disease: the Edinburgh Artery Study. *Br J Haematol* 1999; 105 (3): 648-54.
175. Tachocpe D, Rolsen P, Schripper B. Platelets in diabetes: the role in the hemostatic regulation in atherosclerosis. *Semin Thromb Haemost* 1993; 19: 122-28.
176. Basta G, De Caterina R. Advanced glycosylation end-products and the pathogenesis of accelerated atherosclerosis in diabetes. *G Ital Cardiol* 1996; 26: 699-719.

-
177. Pahlö A, Yudkin S. Diminished fibrinolysis in diabetes mellitus and its implication for diabetic vascular disease. *Coron Artery Dis* 1996; 7 (10): 723-31.
178. Auwerx J, Bouillon R, Collen D, *et al.* Tissue-type plasminogen activator antigen and plasminogen activator inhibitor in diabetes mellitus. *Arteriosclerosis* 1988; 8 (1):68-72.
179. Lapolla A, Piarulli F, Sartore G, *et al.* Peripheral artery disease in type 2 diabetes: the role of fibrinolysis. *Thromb Haemost* 2003; 89: 91-6.
180. Finkelstein JD. Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26 (3): 219-225.
181. Schneede J, Refsum H, Ueland PM. Biological and enviromental determinants of plasma homocysteine. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26 (23): 263-279.
182. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N England J Med* 1998; 338: 1042-1050.
183. Hultberg B, Andersson A, Sterner G. Plasma homocysteine in renal failure. *Clin Nephrol* 1993; 40: 230-235.
184. Mantovani A, Bussolino F, Dejana E. Cytokine regulation of endothelial cell function. *FASEB J* 1992; 6: 2591-99.
185. Shimokawa H. Primary endothelial dysfunction: Atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31 (1): 23-37.
186. De Meyer GRY, Herman AG. Vascular endothelial dysfunction. *Prog in Cardiovasc Dis* 1997; 39: 325-42.
187. De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, *et al.* Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol* 2000; 130(5): 963-974.
188. Honing ML, Morrison PJ, Banga JD, *et al.* Nitric oxide availability in diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 1998; 14 (3): 241-249.
189. Cosentino F, Luscher TF (1998) Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 32 Suppl 3 : S54-61.
190. 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.
191. Parcel ST, Kent KC. Risk factors and their role in the diseases of the arterial wall. *Semin Vasc Surg* 1998; 11 (3): 156-168.
192. Price DT, Vita JA, Keaney JF. Redox control of vascular nitrite oxide bioavailability. *Antioxid Redox Signal* 2000; 2 (4): 919-935.

-
193. Cosentino F, Hishikawa K, Katusic Z, *et al.* High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation* 1997; 96 (1): 25-28.
194. Tooke JE, Hannemann MM. Adverse endothelial function and the insulin resistance syndrome. *J Intern Med* 2000; 247: 425-31.
195. Ferlito S, Gallina M. Nitrite plasma levels in type 1 and 2 diabetes with and without complications. *Panminerva Med* 1998; 40: 304-8.
196. Stehouwer CDA, Schaper NC. The pathogenesis of vascular complications of diabetes mellitus: one voice or many?. *Eur J Clin Invest* 1996; 26: 535-43.
197. Fenner E, King GL. Vascular dysfunction in diabetes mellitus. *Lancet* 1997; 350 (Supl I): 9-13.
198. Stehouwer CDA, Lambert J, Donker AJM, *et al.* Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy. *Cardiovasc Res* 1997; 34: 55-68.
199. Kawamura M, Heinecke JW, Chait A. Pathophysiological concentrations of glucose promote oxidative modification of low density lipoprotein by a superoxide-dependent pathway. *J Clin Invest* 1994; 94: 771-775.
200. Georg K, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* 1999; 43: 562-571.
201. Celermajer DS. Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible ?. *JACC* 1997; 30: 325-33.
202. Shimokawa H. Endothelial dysfunction in hypertension. *J Atheroscler Thromb* 1998; 4 :118-27.
203. Puddu P, Puddu GM, Zaca F, *et al.* Endothelial dysfunction in hypertension. *Acta Cardiol* 2000; 55 (4): 221-232.
204. Kaplan, NM. Primary Hypertension, pathogenesis: Clinical Hypertension. In: Williams & Wilkins editors. Baltimore, Maryland. 1998; p. 41-99.
205. Hennan JK, Diamond J. Effect of NO donors on protein phosphorylation in intact vascular and non vascular smooth muscles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280 (4): H1565-80.
206. Forte P, Copland M, Smith LM, *et al.* Basal nitric oxide synthesis in essential hypertension. *Lancet* 1997; 349: 837-842.
207. de Nigris F, Lerman LO, Ignarro SW, *et al.* Beneficial effects of antioxidants and L-arginine on oxidation-sensitive gene expression and endothelial NO synthase activity at sites of disturbed shear stresses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 Feb 4; 100(3): 1420-5.

-
208. Heitzer T, Krohn K, Alberts S, *et al.* Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation by increasing nitric oxide activity in patients with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 2000; 43: 1435-38.
209. Garcia-Cardena G, Martasek P, Masters BS, *et al.* Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem* 1997; 272: 25437-25440.
210. Rossi GP, Taddei S, Virdis A *et al.* The T-786C and Glu298Asp polymorphisms of endothelial nitric oxide gene affect the forearm blood flow responses of Caucasian hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41 (6): 938-945.
211. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2003; 5 (1): 19-25.
212. Munzel T, Heitzer T, Harrison DG. The physiology and pathophysiology of the nitric oxide/superoxide system. *Herz* 1997; 22: 157-172.
213. Bruillet MC. S-nitrosylation of proteins. *Cell Mol Life Sci.* 1999; 55: 1036-1042.
214. Tesfamariam B, Cohen RA. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am J Physiol* 1992; 263: H321-H326.
215. Gavin JR 3rd. Pathophysiologic mechanisms of postprandial hyperglycemia. *Am J Cardiol* 2001; 20; 88 (6A): 4H-8H.
216. Freedman JE, Loscalzo J. Endothelial dysfunction and atherothrombotic occlusive disease. *Drugs* 1997; 54 Suppl 3: 41-49.
217. RieberJJIC, Serruys PW, Koozman C, *et al.* Assessment of short, medium and long-term variations in arterial dimensions from computer-assisted quantification of coronary cineangiograms. *Circulation* 1985; 71: 280-288.
218. Tousoulis D, Tentolouris C, Crake T, *et al.* Basal and flowmediated nitric oxide production by atheromatous coronary arteries. *JACC* 1997; 29 (6): 1256-1262.
219. Werns SW, Walton JA, Hsia HH, *et al.* Evidence of endothelial dysfunction in angiographically normal coronary arteries of patients with coronary artery disease. *Circulation* 1989; 79: 287-289.
220. Sharp PF, Olson J, Strachan F, *et al.* The value of digital imaging in diabetic retinopathy. *Health Technol Assess* 2003; 7 (30): 1-132.
221. Silber HA, Bluemke DA, Ouyang P, *et al.* The relationship between vascular wall shear stress and flow-mediated dilation: endothelial function assessed by phase-contrast magnetic angiography. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38 (7): 1859-1865.
222. Hocks APG, Brands PJ, Smeets FAM, Reneman RS. Assessment of the distensibility of superficial arteries. *Ultrasound Med Biol* 1990; 16: 121-128.

-
223. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, *et al.* Noninvasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; 340: 1111-1115.
224. Uehata A, Gerard MD, Meredith IT, *et al.* Close relationship of endothelial dysfunction in coronary and brachial artery. *Circulation* 1993; 88(suppl 1): 1-618 (Abstract).
225. Schulz E, Tsilimingas N, Rinze R, *et al.* Functional and biochemical analysis of endothelial (dys)function and NO/cGMP signaling in human blood vessels with and without nitroglycerin pretreatment. *Circulation* 2002; 105 (10): 1170-1175.
226. Wu IID, Katz SD, Beniaminovitz A, *et al.* Assessment of endothelium-mediated vasodilation of the peripheral circulation by transcutaneous ultrasonography and venous occlusion plethysmography. *Heart vessels* 1999; 14 (3): 143-148.
227. Faulx MD, Wright AT, Hoit BD. Detection of endothelial dysfunction with brachial artery ultrasound. *Am Heart J* 2003; 145 (6): 943-951.
228. Preik M, Lauer T, Heiss C, *et al.* Automated ultrasonic measurement of human arteries for the determination of endothelial function. *Ultraschall Med* 2000; 21 (5): 195-198.
229. Beux F, Carmassi S, Salvetti MV, *et al.* Automatic evaluation of arterial diameter variation from vascular echographic images. *Ultrasound Med Biol* 2001; 27 (12): 1621-1629.
230. Böger RH, Bode-Böger SM. Asymmetric Dimethylarginine. Derangements of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Pathway and Cardiovascular Diseases. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26 (5): 539-545.
231. Michelson AD. Platelet activation by thrombin can be directly measured in whole blood through the use of peptide GPRP and flow cytometry: methods and clinical applications. *Blood Coag Fibrinol* 1994; 5: 121-131.
232. The sixth report of Joint National Committee on Prevention. Detection, Evaluation and Treatment of high blood pressure: *NIH Publication* 1997.
233. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, *et al.* Nitrite and nitrate determination in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem* 1995; 41: 892-96.
234. Clauss A. Rapid physiological coagulation method in determination of fibrinogen. *Acta Haematologica* 1957; 17 (4): 237-246.
235. 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.

-
236. Pulsed Doppler: determination of diameter, blood flow velocity and volumic flow of brachial artery in man. *Cardiovasc Res* 2000; 45 (1): 23-26.
237. Anderson TJ, Elstein E, Haber H, *et al.* Comparative study of ACE-inhibition, angiotensin II antagonism, and calcium channel blockade on flow-mediated vasodilatation in patients with coronary disease (BANFF study). *J Am Cardiol* 2000; 35 (1): 67-70.
238. Vanhoutte PM, Boulanger CM, Illiano SC, *et al.* Endothelium-dependent effects of converting-enzyme inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22: S10-S16.
239. Ignarro LJ, Sisodia M, Trinch K, *et al.* Nebivolol inhibits vascular smooth muscle cell proliferation mechanism involving nitric oxide but not cyclic GMP. *Nitric Oxide* 2002; 7 (2): 83-90.
240. Chappy O, Wantier MP, Boval B *et al.* Endothelial cells in cultures an experimental model for the study of vascular dysfunction. *Cell Biol Toxicol* 1996; 12: 199-205.
241. Lampugnani MG, Resnati M, Raiteri M, *et al.* A novel endothelial specific membrane protein as a marker of cell-cell contacts. *J. Cell. Biol* 1992; 118: 1511-1522.
242. Lowry OH, Rosenbough NJ, Farr AL, *et al.* Protein measurement with Folin-Phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
243. Altman Douglas G. Practical Statistics for medical research. Londres: Chapman & Hall; 1992.
244. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assesing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; 8: 307-310.
245. Grasbeck R, Montalbetti N, Petitelere C, *et al.* Recomendación aprobada (1987) sobre teoría de los valores de referencia. Secciones de la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC) reimpresso en Acta Bioquímica Latinoamericana 1998; XXII, 3: 443-481.
246. Petrie JR, Ueda S, Webb DJ, *et al.* Endothelial nitric oxide production and insulin sensitivity: A psysiological link with implications for pathogenesis of cardiovascular disease. *Circulation* 1996; 93: 1331-1333.
247. Shen W, Hintze TH, Wolin MS. Nitric oxide: an important signaling mechanism between vascular endothelium and parenchymal cells in the regulation of oxygen consumption. *Circulation* 1995; 92: 1086-1095.
248. Nordt TK, Sava H, Sataşlır F, *et al.* Induction of plasminogen activator inhibitor type I (PAI-1) by proinsulin and insulin *in vivo*. *Circulation* 1995; 91: 764-770.
249. Manzella D, Ragno E, Abbatecola AM, *et al.* Residual C-peptide secretion and endothelial function in patients with type II diabetes. *Clin Sci (Lond)* 2003; 105 (1): 113-118.

-
250. Breviario F, Caveda L, Corada M. *et al.* Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin 5) an endothelium specific cadherin. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 1995; 15: 1229-1239.
251. Wu C , Huang C, Lin C. *et al.* Advanced glycosilation end products induce NF-kappaB dependent iNOS expression in RAW 264.7 cells. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 30: 194 (1-2): 9.
252. Heine RJ, Dekker JM. Beyond postprandial hyperglycaemia: metabolic factors associated with cardiovascular disease. *Diabetologia* 2002; 45 (4):461-475.
253. Pankewycz OG, Guan JX, Bolton WK. *et al.* Renal TGF-beta regulation in spontaneously diabetic NOD mice with correlations in mesangial cells. *Kidney Int* 1994; 46 (3): 748-758.
254. Durante W, Sen AK, Sunahara FA. Impairment of endothelium-dependent relaxation in aortae from spontaneously diabetic rats. *Br J Pharmacol* 1988; 94: 463-468.
255. Schmidt AM, Yan SD, Wantier JL. *et al.* Activation of receptor for AGEs products. A mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res* 1999; 84: 489-497.
256. Chen CC, Chiu KT, Sun YT, *et al.* Role of the cyclic AMP-Protein Kinase a pathway in lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase expression in RAW 264.7. macrophages. *J Biol Chem* 1999; 274 (44): 31559-64.
257. Böger R, Bode-Böger S, Szuba A. *et al.* Asymmetric dimethylarginine (ADMA): A novel risk factor for endothelial dysfunction. *Circulation* 1998; 98: 1842-1847.

*Difusión
de los
Resultados*

Trabajos publicados:

1. Activación Plaquetaria en microangiopatía diabética tipo II. N. Zanaro, S. Ouviaña, M. Silva, R. La Greca, B. Sassetti. *Revista Iberoamericana de Trombosis y Hemostasia*, 11: 99-102, 1998.
2. Endothelial dysfunction, Nitric oxide and platelet activation in hypertensive and diabetic Type II patients. Ouviaña S, La Greca R, Zanaro N, Palmer L, Sassetti B. *Thromb Res* 102(2) : 107-14, 2001.

Presentaciones a Congresos Internacionales:

1. Nitric Oxide, Endotelial Dysfunction and Platelet Activation in Hypertensive NIDDM (Type II) Patients. SM Ouviaña, NL Zanaro, R La Greca, B Sassetti. *Br J Haem* 102, 1:256, 1998.
2. "Endotelial Dysfunction : Evaluation of Brachial Artery Diameter, Nitric Oxide and von Willebrand factor in Hypertensive Diabetic Patients Type II in the Hyperemic Ischemia Test Pre and Post Quinapril Treatment". Autores: Ouviaña S, La Greca R, Zanaro N, Ricon D, Castro E, Palmer L, Sassetti B. XVIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, ISTH, Paris, Francia, 6 al 12 de Julio de 2001.
3. Endotelina-1, NO y FvW en Diabéticos tipo II". Autores: Ouviaña S, La Greca R, Palmer L, Ortalli A, Sassetti B. XVII Congreso Internacional de Hemostasia y Trombosis del Grupo CLAHT, México DF, México, 6 al 9 de Octubre de 2001.
4. "P-Selectina, Oxido Nítrico y PAI-1 en pacientes hipertensos diabéticos tipo II". Autores: Ouviaña S, La Greca R, Palmer L, Sassetti B. XVIII Congreso Internacional de Hemostasia y Trombosis Grupo CLAHT, Río de Janeiro, Brasil, 20 de Mayo de 2003.