

Bioquímica Clínica

Reconocimiento a la trayectoria de la Prof. Dra. Regina L. W. de Wikinski

Evaluación de disfunción endotelial en pacientes con diabetes tipo 2

Dysfunction endothelial evaluation in type 2 diabetes patients

- María Susana Velarde¹, María Mercedes Prado¹, Teresita del Rosario Carrizo², Adela Victoria Abregú³, Sara Serafina Sánchez³

1. Bioquímicas Especialistas en Bioquímica Clínica.
2. Bioquímica.
3. Dras. en Bioquímica.

- ? - Cátedra de Práctica Hospitalaria, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán. Balcarce 747. San Miguel de Tucumán (4000).
? - Departamento de Biología del Desarrollo, INSIBIO, CONICET - Universidad Nacional de Tucumán. Chacabuco 461. San Miguel de Tucumán (4000).

Resumen

El objetivo de este trabajo fue estudiar moléculas involucradas en la activación endotelial, tales como la molécula de adhesión sE-Selectina (sE-S) y el péptido vasoconstrictor Endotelina-1 (ET-1) en individuos diabéticos tipo 2 y su asociación con otros factores de riesgo cardiovascular. Se estudiaron 62 pacientes diabéticos que se compararon con un grupo control. Las concentraciones de sE-S y ET-1 fueron significativamente mayores en los diabéticos que en los controles (sE-S: 90,6±26,2 ng/mL vs. 49,5±9,2 ng/mL, $p < 0,00001$; ET-1: 11,3±3,7 vs. 7,7±0,5 pg/mL, $p < 0,001$, respectivamente). Estas moléculas, en pacientes con índice de masa corporal (IMC) normal y aumentado, mostraron diferencias significativas (sE-S: 75,5±22,4 vs. 97,1±32,9 ng/mL, $p < 0,05$; ET-1: 8,4±2,4 vs. 14,1±4,9 pg/mL, $p = 0,001$, respectivamente). No se encontraron diferencias entre individuos diabéticos normo e hipertensos, no fumadores y fumadores, ni normo e hipercolesterolémicos. El 81% de la población estudiada presentó un pobre control glucémico ($HA1c > 7\%$), siendo significativamente mayores los niveles de ET-1 en este grupo ($p < 0,01$) no así para sE-S ($p = 0,74$). Los resultados obtenidos muestran que los pacientes diabéticos presentan activación endotelial reflejada en los niveles elevados de sE-S y ET-1. El IMC aumentado y el pobre control glucémico incrementan la disfunción endotelial en estos pacientes.

Palabras clave: diabetes * endotelio * selectina * endotelina

Summary

The object of this work was to study molecules involved in endothelial activation, such as E-selectin (sE-S) and the vasoconstrictor peptide Endothelin-1 (ET-1) in Type 2 diabetes patients, and their relation with other cardiovascular risk factors. Sixty-two patients with diabetes were compared with matched controls. sE-S and ET-1 concentrations in diabetes patients were significantly elevated compared with controls (sE-S: 90.6±26.2 ng/mL vs 49.5±9.2 ng/mL,

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

p<0.00001; ET-1: 11.3±3.7 vs 7.7±0.5 pg/mL, *p*<0.001, respectively). sE-S and ET-1 levels in diabetes patients with normal and increased body mass index showed significant differences (sE-S: 75.5±22.4 vs. 97.1±32.9 ng/mL, *p*<0.05; ET-1: 8.4±2.4 vs. 14.1±4.9 pg/mL, *p*=0.001 respectively). There were no significant differences in none of the molecules values between patients with or without hypertension, smokers or non-smokers, neither in diabetes patients with or without hypercholesterol. Eighty-one percent of the population with diabetes presented a poor glycemic control (HA1c>7%) and in these patients, ET-1 plasma levels were significantly increased (*p*<0.01), but not sE-S (*p*=0.74). These results show that obesity and a poor glycemic control increase the endothelial dysfunction in type 2 diabetes patients.

Key words: Diabetes * Endothelium * Selectin * Endothelin

Introducción

La Diabetes Mellitus es una enfermedad metabólica caracterizada por una agresión crónica al endotelio y asociada a un riesgo incrementado de enfermedad vascular prematura (1).

La disfunción endotelial juega un papel preponderante en la génesis de las complicaciones vasculares de la diabetes y precede a las evidencias anatómicas más tempranas de aterosclerosis. La etapa inicial de la misma involucra el reclutamiento de células inflamatorias y su migración a través del endotelio. Este proceso está regulado por moléculas de adhesión que se expresan en la superficie de leucocitos y células endoteliales, y que tendrían un papel importante en la predicción de los eventos cardiovasculares (2- 5).

Entre las moléculas de adhesión que intervienen están las selectinas (E-Selectina y P-Selectina), las moléculas de adhesión intracelular (ICAM-1) y las moléculas de adhesión vásculo-celular (VCAM-1). La E-Selectina (E-S) es una glicoproteína que, a diferencia de ICAM-1 y VCAM-1, se expresa exclusivamente en las células endoteliales activadas, en respuesta a citoquinas inflamatorias como la interleuquina-1b (IL-1b), y/o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (6). Se ha sugerido que niveles aumentados de formas solubles de E-S (sE-S) podrían ser marcadores específicos y precoces de endotelio vascular dañado (1) (4) (7-9).

Por otra parte, la Endotelina-1 (ET-1), un potente péptido mitogénico vasoconstrictor derivado del endotelio ha sido relacionado con el desarrollo de aterosclerosis y enfermedad vascular isquémica en pacientes diabéticos (10) (11).

El objetivo de este trabajo fue determinar los niveles de sE-S y ET-1 en diabéticos tipo 2 y la posible asociación de dichas moléculas con otros factores de riesgo cardiovascular como IMC aumentado, hipertensión arterial, hipercolesterolemia y grado de control glucémico.

Materiales y Métodos

Se estudiaron 62 pacientes con diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo 2, de ambos sexos (33 mujeres y 29 varones), de edades comprendidas entre 41 y 64 años, tratados con dieta y/o hipoglucemiantes orales, que concurren al servicio de Endocrinología del Hospital Centro de Salud Zenón Santillán de la ciudad de San Miguel de Tucumán, Argentina.

A todos se les realizó una detallada historia médica que incluyó estudios clínicos, cardiológicos y oftalmológicos. En la selección de los pacientes diabéticos los criterios de exclusión fueron: enfermedad arterial coronaria, hepática, renal, hematológica, vascular periférica y/o hipotiroidismo. Los pacientes fueron agrupados de acuerdo a: sexo, presión arterial sistólica y diastólica, IMC, tabaquismo, niveles de colesterol total (CT), colesterol de LDL (C-LDL) y grado de control glucémico.

Los individuos diabéticos fueron relacionados con un grupo de sujetos controles (n=20) de edades y sexos semejantes. Los criterios de exclusión para este grupo fueron: presencia de procesos inflamatorios, antecedentes familiares de diabetes, obesidad u otras endocrinopatías, enfermedad hepática o renal, tabaquismo, terapia con corticoides u otras drogas que afecten el metabolismo de los hidratos de carbono. Las mujeres incluidas en este protocolo, tanto diabéticas como controles, no recibieron terapias anticonceptiva u hormonal de reemplazo.

El presente estudio se realizó previo consentimiento escrito tanto de los pacientes como de los individuos controles.

Las muestras de sangre fueron obtenidas luego de un ayuno de 12 horas y centrifugadas a 4°C. Para las determinaciones de glucosa, CT, C-LDL y hemoglobina glicosilada (HA1c) se emplearon muestras frescas, mientras que los sueros para sE-S y los plasmas para ET-1 (obtenidos con EDTA), se conservaron a -70°C hasta su procesamiento.

Los niveles de glucosa, CT y C-LDL se analizaron por métodos enzimáticos (Wiener Lab). Todas las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro Metrolab 1600 (Buenos Aires, Argentina).

Los valores de HA1c se determinaron por un método de inmunoensayo (Abbott Lab, EE.UU.). Para sE-S se utilizó una técnica de enzoinmunoensayo (R&D Systems Inc, Minneapolis) con una sensibilidad menor a 0,1 ng/mL y coeficientes de variación intraensayo de 3,5% e interensayo de 5,7%. Los niveles plasmáticos de ET-1 fueron determinados por un método de ELISA en fase sólida (R&D Systems Inc, Minneapolis MN), con una reproducibilidad del 95% y coeficientes de variación intraensayo de 4,5% y interensayo de 5,5%.

VALORES DE REFERENCIA

La hipertensión arterial fue definida por valores de presión sistólica >130 mm de Hg y de presión diastólica >85 mm de Hg.

Se consideraron pacientes con buen control glucémico aquellos que presentaban niveles de HA1c ≤7%.

Se consideró IMC aumentado un valor > 25 kg/m² (OMS).

Para el CT y C-LDL se tomó como referencia lo aconsejado por el NCEP (National Cholesterol Education Program): <5,2 mmol/L y ≤3,4 mmol/L, respectivamente.

Tabaquismo: más de 5 cigarrillos por día, en forma habitual o haber abandonado el hábito hasta un año antes de realizado el estudio.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados se expresaron como la media ±DE. La diferencia entre los grupos se analizó median-

te el *test-t de Student*, para valores no apareados, considerando significativos aquellos con $p < 0,05$.

Para determinar la relación entre dos variables de interés se usó el coeficiente de correlación de Pearson.

Resultados

La **Tabla I** muestra las características clínicas y bioquímicas de los pacientes diabéticos y sujetos controles.

Las concentraciones de sE-S y ET-1 en los pacientes diabéticos fueron significativamente mayores cuando se los compara con los sujetos controles.

Entre mujeres y hombres diabéticos se observaron diferencias significativas para sE-S (101,8±30,1 y 77,9±16,4 ng/mL, respectivamente, $p < 0,005$), no así para ET-1 (8,5±4,9 vs. 13,9±11,8 pg/mL; $p = 0,20$). En los sujetos controles no se encontraron diferencias significativas entre hombres y mujeres para sE-S ($p = 0,19$) ni para ET-1 ($p = 0,94$).

Cuando se compararon los niveles de sE-S y de ET-1 entre pacientes diabéticos con IMC normal y aumentado, también se observaron diferencias significativas (sE-S: 75,5±22,4 vs. 97,1±32,9 ng/mL, $p < 0,05$ y ET-1: 8,4±2,4 vs. 14,1±4,9 pg/mL, $p = 0,001$, respectivamente).

Sin embargo, no se encontraron diferencias en los valores de sE-S y ET-1 entre diabéticos normo e hipertensos (ET-1: 79,3±24,3 vs. 97,7±29,6 ng/mL, $p = 0,12$ y ET-1: 10,9±3,8 vs. 12,4±5,6 pg/mL, $p = 0,51$, respectivamente), no fumadores y fumadores (91,4±30,5 vs. 81,2±24,1 ng/mL, $p = 0,33$ y 13,3±5,3 vs. 11,3±4,1 ug/mL, $p = 0,53$ respectivamente). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre diabéticos normo e hipercolesterolémicos (**Tabla II**).

Según las concentraciones de HA1c los pacientes fueron agrupados en: diabéticos con buen control glu-

Tabla I. Características clínicas y bioquímicas evaluadas en pacientes diabéticos y sujetos controles.

	Diabéticos	Controles	p
Nº pacientes (Varones/mujeres)	62 (29/33)	20 (10/10)	
Edad (años)	51,2±9,1	50,9±10,1	0,08
Evolución de la enfermedad (años)	4,4±3,2	- - - -	
IMC (Kg/m ²)	28,1±4,4	23,6±2,5	0,0006
Presión sistólica (mm Hg)	153±5	124±8	0,007
Presión diastólica (mm Hg)	91±8	78±5	0,01
Fumadores	16%	0%	
HA1c (%)	9,5±2,9	5,2±0,5	<0,000001
Glucemia en ayunas (mg/dL)	164±105	84±9	<0,001
Colesterol total (mmol/L)	5,0±1,4	4,7±0,4	0,11
Colesterol-LDL (mmol/L)	3,3±0,1	2,9±0,4	0,01
E Selectina (ng/mL)	90,6±26,2	49,5±9,2	<0,00001
Endotelina-1 (pg/mL)	11,3±3,7	7,7±0,5	<0,001

Los valores se expresan como la media ±DS. IMC: índice de masa corporal; HA1c: hemoglobina glicosilada

Tabla II. Niveles de sE-selectina y Endotelina-1 en diabéticos sin/con factores de riesgo cardiovascular.

	n	sE-selectina (ng/mL)	Endotelina-1 (pg/mL)
CT Normal	41 (66%)	87,5±22,6	10,7±4,2
CT aumentado	21 (34%)	89,9±33,3	12,8±5,1
C-LDL Normal	40 (65%)	82,2±28,3	10,3±4,5
C-LDL Aumentado	22 (35%)	101,7±34,6	13,4±5,9
Normotensos	36 (60%)	79,3±24,3	10,9±3,8
Hipertensos	26 (40%)	88,1±39,6	12,4±5,6
No fumadores	52 (84%)	91,4±30,5	13,3±5,3
Fumadores	10 (16%)	81,2±24,1	11,3±4,1
IMC normal	26 (42%)	75,5±22,4	8,4±2,4
IMC aumentado	36 (58%)	97,1±32,9*	14,1±4,9*
DBCG	12 (19%)	88,4±28,1	7,6±1,4*
DPCG	50 (81%)	91,9±27,2	13,0±4,6*

Los valores se expresan como la media ± DS. CT: colesterol total; LDL-C: colesterol de LDL; IMC: índice de masa corporal; DBCG: diabéticos con buen control glucémico; DPCG: diabéticos con pobre control glucémico. * p<0,05.

cémico (DBCG, HA1c≤7%) y diabéticos con pobre control glucémico (DPCG, HA1c>7%). Cabe destacar que el 81% de la población diabética estudiada correspondía al grupo DPCG. Los niveles plasmáticos de ET-1 fueron significativamente mayores en este último grupo (13,0±4,6 vs. 7,6±1,4 pg/mL, p<0,01), pero para sE-S los valores de entre ambos grupos no fueron estadísticamente diferentes (91,9±27,2 vs. 88,4±28,1 ng/mL, p=0,74).

Cuando se aplicó el coeficiente de correlación de Pearson, en los pacientes diabéticos se encontró una buena correlación entre la sE-S y ET-1 (r=0,48) y entre sE-S y niveles de CT (r=0,33) y sE-S y LDL-C (r=0,37).

Discusión

Los resultados del presente trabajo muestran que los niveles de sE-S y ET-1 en pacientes con diabetes tipo 2 están significativamente elevados cuando se los compara con los sujetos controles. Este hallazgo fue coincidente con los de diversas publicaciones previas (4) (10-14), sin embargo, hay autores que no encontraron diferencias para estas moléculas entre pacientes diabéticos y controles sanos (15-17).

En los pacientes estudiados se hallaron valores de sE-S significativamente mayores en mujeres que en hombres. Si bien la mortalidad por enfermedad cardiovascular es 3 a 5 veces mayor en mujeres con diabetes tipo 2 que en no diabéticas, no se conoce completamente el mecanismo por el cual la diabetes modifica el efecto protector de las hormonas femeninas para las

enfermedades cardiovasculares. Algunos autores describen una interacción entre hiperglucemia y estradiol, por la que niveles elevados de glucemia reducirían la producción de óxido nítrico mediada por estradiol en las células endoteliales, contribuyendo a la aterosclerosis acelerada en mujeres diabéticas (18) (19). Este mecanismo explicaría en parte, la diferencia observada en los niveles de sE-S entre mujeres y hombres diabéticos lo que se sumaría a la edad de las pacientes estudiadas que promedió los 51 años. Los niveles plasmáticos de ET-1 en estos pacientes, no mostraron diferencias significativas entre ambos sexos, coincidiendo con los resultados de Ak y col (20).

Por otra parte, Blann y cols. estudiando sujetos sanos de ambos sexos encontraron en hombres niveles mayores de moléculas de adhesión respecto de las mujeres, lo cual sostendría la hipótesis que el estrógeno podría suprimir la expresión de dichas moléculas *in vivo*, explicando la incidencia reducida de aterosclerosis en mujeres premenopáusicas comparada con hombres de edades similares (17).

La obesidad es un factor de riesgo independiente de enfermedad cardiovascular que favorece el desarrollo de aterosclerosis. En este estudio se encontró que el 58% de la población diabética tenía un IMC aumentado y niveles de sE-S significativamente mayores, coincidiendo con los hallazgos de Bagg y col (21). Además, en otros trabajos observaron que las moléculas de adhesión estaban aumentadas en hombres obesos, ya sean normo o hipertensos (22) (23).

Los diabéticos con IMC aumentado también presentaron niveles de ET-1 significativamente mayores

que los de IMC normal, coincidiendo con los resultados de Viswanathan y col (24). Sin embargo, hay autores que no encontraron diferencias entre ambos grupos (20) (25).

Si bien no son totalmente conocidas las bases moleculares de la relación entre obesidad y enfermedad vascular, está establecido que la obesidad central es un factor de riesgo más importante que la obesidad periférica para el desarrollo de enfermedad vascular (21) (26) (27). La causa de la disfunción endotelial en diabéticos obesos podría estar relacionada en parte con la insulinorresistencia presente en estos individuos sE-S (28). Por otro lado, el tejido adiposo parece ser un determinante del incremento plasmático de sE-S en los individuos diabéticos. Este hecho apoya la posibilidad, sugerida por Targher y col, que el tejido adiposo liberase uno o más factores que podrían afectar adversamente la función endotelial (14).

Estudios poblacionales mostraron que la hipertensión arterial es dos veces más frecuente en diabéticos que en no diabéticos (29). En el presente trabajo se encontró que el 40% de los pacientes estudiados tenían hipertensión arterial y niveles de sE-S y ET-1 más elevados que los normotensos, pero las diferencias entre ambos grupos no fueron estadísticamente significativas. Coincidiendo con estos resultados De Souza y otros investigadores no encontraron una influencia significativa de la presión arterial sobre las variables endoteliales (7) (21) (23) (30-32). Por otra parte, Viswanathan y col hallaron que los valores de ET-1 se correlacionaban con la presión arterial aumentada (24). Los resultados obtenidos sugieren que la coexistencia de hipertensión y diabetes no ejercería un efecto aditivo sobre los niveles de estas moléculas.

El tabaquismo está relacionado con el desarrollo prematuro de complicaciones vasculares en la diabetes debido a que altera la función endotelial, aunque los mecanismos no estén totalmente aclarados (33-35). Estudios realizados en animales de experimentación mostraron que la nicotina causaría un daño en la vasodilatación dependiente del endotelio por un incremento del estrés oxidativo (36). En la población diabética estudiada, solamente el 16% eran fumadores, y sus valores de sE-S y Et-1 no fueron diferentes de los de no fumadores, coincidiendo con los hallazgos de Ak y col. (20). Sin embargo, se considera que estos resultados no son concluyentes dado el pequeño número de pacientes con este hábito tóxico.

No se encontraron diferencias significativas en los valores de sE-S y ET-1 en diabéticos normo e hipercolesterolémicos. No obstante, se ha sugerido que lípidos y lipoproteínas anormales juegan un papel importante en la disfunción endotelial en diabetes tipo 2 (31) (37-39). La sE-S correlacionó con los valores aumentados de CT y LDL-C coincidiendo con los hallazgos de Thorand y col. (40).

En este trabajo se observó que el grado de control glucémico tiene influencia en los niveles de ET-1, ya que pacientes con pobre control glucémico presentan valores más elevados de esta molécula. Esto mismo fue evidenciado anteriormente por este grupo de trabajo y otros autores (10) (24).

Los resultados del presente trabajo mostraron una correlación entre sE-S y el control glucémico, en concordancia con los hallazgos de Cominacini y col que observaron una disminución de sE-S cuando mejoraban los niveles de HbA.c (12). Sin embargo, Bagg y Pontiroli muestran que la sE-S no está asociada a la hiperglucemia (21) (41).

Conclusiones

En este estudio se observó que los pacientes con diabetes tipo 2 presentan niveles elevados de sE-S y ET1, moléculas marcadoras de activación endotelial.

Los diabéticos con IMC aumentado presentaron un incremento significativo de sE-S y ET1, potenciando la disfunción endotelial en estos pacientes.

El grado de control glucémico se asoció con niveles elevados de ET-1, lo que confirmaría que la hiperglucemia crónica afecta la vasodilatación dependiente del endotelio.

Estos resultados sugieren que la detección temprana de marcadores bioquímicos de disfunción endotelial contribuirían a la prevención de enfermedad cardiovascular en estos pacientes de alto riesgo.

AGRADECIMIENTO

A Laboratorios Wiener Lab por la donación de reactivos empleados en la realización de este trabajo.

CORRESPONDENCIA

DRA. SARA S. SÁNCHEZ

Dpto. Biología del Desarrollo, INSIBIO (CONICET-UNT)

Corrientes 198, 5° Piso "B"

(4000) SAN MIGUEL DE TUCUMÁN, Tucumán, Argentina

Telefax: (+54) (381) 424-8025

E-mail: ssanchez@fbqf.unt.edu.ar

Referencias bibliográficas

1. Wagner OF, Jilma B. Putative role of adhesion molecules in metabolic disorders. *Horm Metab Res* 1997; 29: 627-30.
2. Blankerberg S, Barboux S, Tired L. Adhesion molecules in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003; 170: 191-203.
3. Caballero AE, Arora S, Saouaf R, Lim S, Smakowski P, Park JY, *et al.* Microvascular and macrovascular reac-

- tivity is reduced in subjects at risk for type 2 diabetes. *Diabetes* 1999; 48: 1856-62.
4. Albertini JP, Valensi P, Lormeau MD, Arousseau MH, Ferriere F, Attali JR, *et al.* Elevated concentrations of soluble E-Selectin and vascular cell adhesion molecule in NIDDM. *Diabetes Care* 1998; 21: 1008-13.
 5. Poredos P. Endothelial dysfunction in the pathogenesis of atherosclerosis. *Int Angiol* 2002; 21: 109-16.
 6. Roldan V, Marin F, Lip GY, Blann AD. Soluble E-Selectin in cardiovascular disease and its risk factors. A review of the literature. *Thromb Hemost* 2003; 90: 1007-20.
 7. DeSouza CA, Dengel DR, Macko RF, Cox K, Seals DR. Elevated levels of circulating cell adhesion molecules in uncomplicated essential hypertension. *Am J Hypertens* 1997; 10: 1335-41.
 8. Peter K, Nawroth P, Conradt C, Nordt T, Weiss T, Boehme M, *et al.* Circulating vascular cell adhesion molecule-1 correlates with the extent of human atherosclerosis in contrast to circulating intercellular adhesion molecule-1, E-Selectin, P-Selectin and thrombomodulin. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 505-12.
 9. Wojakowski W, Gminski J. Soluble ICAM-1, VCAM-1 and E-Selectin in children from families with high risk of atherosclerosis. *Int J Mol Med* 2001; 7: 181-5.
 10. Sanchez SS, Aybar MJ, Velarde MS, Prado MM, Carrizo T. Relationship between plasma endothelin-1 and glycemic control in type 2 diabetes mellitus. *Horm Metab Res* 2001; 33: 748-51.
 11. Schiekofer S, Balletshofer B, Andrassy M, Bierhaus A, Nawroth P. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26: 503-11.
 12. Cominacini L, Fratta Pasini A, Garbin U, Davoli A, De Santis, A, *et al.* Elevated levels of soluble E-Selectin in patients with IDDM and NIDDM: relations to metabolic control. *Diabetologia* 1995; 38: 1122-4.
 13. Steiner M, Reinhardt K, Krammer B, Ernst B, Blann A. Increased levels of soluble adhesion molecule in type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus are independent of glycaemic control. *Thromb Haemost* 1994; 72: 979-84.
 14. Targher G, Bonadonna R, Alberiche M, Zenere M, Muggeo M, Bonora E. Relation between soluble adhesion molecules and insulin sensitivity in type 2 diabetic individuals. *Diabetes Care* 2001; 24: 1961-6.
 15. Devaraj S, Jialal I. Low-density lipoprotein postsecretory modification, monocyte function, and circulating adhesion molecules in type 2 diabetes patients with and without macrovascular complications: the effect of alpha-tocopherol supplementation. *Circulation* 2000; 102:191-6.
 16. Predel HG, Meyer-Lehnert H, Backer A, Stelkens H, Kramer HJ. Plasma concentrations of endothelin in patients with abnormal vascular reactivity. Effects of ergometric exercise and acute saline loading. *Life Sci* 1990; 47: 1837-43.
 17. Blann A, Daly R, Amiral J. The influence of age, gender and ABO blood group on soluble endothelial cell markers and adhesion molecule. *Br J Haematol* 1996; 92: 498-500.
 18. Bloomgarden Z. The American Diabetes Association'48th Annual Postgraduate Course. *Diabetes Care* 2001; 24: 1489-95.
 19. Steinberg H, Paradisi G, Cronin J, Crowde K, Hempfling A, Hook G, *et al.* Type 2 diabetes abrogates sex differences in endothelial function in premenopausal women. *Circulation* 2000; 101: 2040-6.
 20. Ak G, Buyukberber S, Sevinc A, Turk HM, Ates M, Sari R, *et al.* The relation between plasma endothelin-1 levels and metabolic control, risk factors, treatment modalities, and diabetic microangiopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 2001; 15: 150-7
 21. Bagg W, Ferri C, Desideri G, Gamble G, Ockelford P, Braatvedt G. The influences of obesity and glycemic control on endothelial activation in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5491-7.
 22. Ferri C, Desideri G, Valenti M, Bellini C, Pasin M, Santucci A, *et al.* Early upregulation of endothelial adhesion molecule in obese hypertensive men. *Hypertension* 1999; 34: 568-73.
 23. Boulbou MS, Koukoulis GN, Makri ED, Petinaki EA, Gourgoulis KI, Gemenis AE. Circulating adhesion molecules in type 2 diabetes mellitus and hypertension. *Int J Cardiol* 2005; 98: 39-44.
 24. Viswanathan V, Snehalatha C, Fair MB, Ramachandran A. Markers of endothelial dysfunction in hyperglycaemic Asian Indian subjects. *J Diabetes Complications* 2004; 18: 47-52.
 25. Wollesen F, Berglund L, Berne C. Plasma endothelin-1 and total insulin exposure in diabetes mellitus. *Clin Sci (Lond)* 1999; 97 (2):149-56.
 26. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, *et al.* Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 1999; 100: 2473-6.
 27. Franco C, Bengtsson BA, Johannsson G. Visceral obesity and the role of the somatotrophic axis in the development of metabolic complications. *Growth Horm IGF Res* 2001; 11: S97-S102.
 28. Stehouwer C, Lambert J, Donker A, van Hinsbergh V. Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy. *Cardiovascular Res* 1997; 34: 55-68.
 29. Preik M, Kelm M, Rosen P, Tschöpe D, Stauer BE. Additive effect of coexistent type 2 diabetes and arterial hypertension on endothelial dysfunction in resistance arteries of human forearm vasculature. *Angiology* 2000; 51: 545-54.
 30. Schneider JG, Tilly N, Hierl T, Sommer U, Hamann A, Dugi K, *et al.* Elevated plasma endothelin-1 levels in diabetes mellitus. *Am J Hypertens* 2002; 15: 967-72.
 31. Bruno CM, Melli S, Marcinno M, Iema D, Sciacca C, Neri S. Plasma ET-1 levels and albumin excretion rate in normotensive, microalbuminuric type 2 diabetes patients. *J Biol Regul Homeost Agents* 2002; 16: 114-7.

32. Perfetto F, Tarquini R, de Leonardis V, Piluso A, Beccucci A, Anselmi B et al. Vascular damage and not hypertension per se influences ET-1 plasma levels in patients with NIDDM. *Recenti Prog Med* 1997; 88: 317-20.
33. American Diabetes Association. Smoking and diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27: 574-5.
34. Pretorius M, Rosenbaum DA, Lefebvre J, Vaughan DE, Brown NJ. Smoking impairs bradykinin-stimulated t-PA release. *Hypertension* 2002; 39: 761-71.
35. Barua RS, Ambrose JA, Eales-Reynolds LJ, De Voe MC, Zervas JG, Saha DC. Dysfunctional endothelial nitric oxide biosynthesis in healthy smokers with impaired endothelium-dependent vasodilatation. *Circulation* 2001; 104: 1905-10.
36. Neunteufl T, Heher S, Kostner K, Mitulovic G, Lehr S, Khoschorur, et al. Contribution of nicotine to acute endothelial dysfunction in long-term smokers. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 251-6.
37. Watts GF, O'Brien SF, Silvester W, Millar JA. Impaired endothelium-dependent and independent dilatation of forearm resistance arteries in men with diet-treated non-insulin-dependent diabetes: role of dyslipidaemia. *Clin Sci (Lond)* 1996; 91: 567-73.
38. Ceriello A, Quagliaro L, Piconi L, Assaloni R, Da Ros R, Maier A, et al. Effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on circulating adhesion molecules and oxidative stress generation and the possible role of simvastatin treatment. *Diabetes* 2004; 53: 701-10.
39. Seligman BG, Biolo A, Polanczyk CA, Gross JL, Clausell N. Increased plasma levels of ET-1 and von Willebrand factor in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care* 2000; 23: 1395-400.
40. Thorand B, Baumert J, Doring A, Schneider A, Chambless L, Lowel H, et al. Association of cardiovascular risk factors with markers of endothelial dysfunction in middle-aged men and women. Results from the MONICA/KORA Augsburg Study. *Thromb Haemost* 2006; 95: 134-44.
41. Pontiroli AE, Pizzocri P, Koprivec D, Vedani P, Marchi M, Arcelloni C, et al. Body weight and glucose metabolism have a different effect on circulating levels of ICAM-1, E-selectin, and endothelin-1 in humans. *Eur J Endocrinol* 2004; 150: 195-200.

Aceptado para su publicación el 27 de julio de 2007

