

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

INFLUENCIA DE LA DIABETES EXPERIMENTAL SOBRE LA REACTIVIDAD DE LAS ARTERIAS BASILAR, CARÓTIDA Y RENAL DE CONEJO A LA ENDOTELINA-1

VANNINA GONZÁLEZ MARRACHELLI

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2006

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 12 de Setembre de 2006 davant un tribunal format per:

- D. Albino García Sacristán
- D. Ignacio Lizasoain Hernández
- D^a. M^a Carmen Terencio Silvestre
- D^a. Pilar d'Ocon Navaza
- D. José M^a Vila Salinas

Va ser dirigida per:

Enrique Alborch Domínguez

Francisco Javier Miranda Alonso

©Copyright: Servei de Publicacions
Vannina González Marrachelli

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6634-9

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Artes Gráficas, 13 bajo

46010 València

Spain

Telèfon: 963864115



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

**INFLUENCIA DE LA DIABETES EXPERIMENTAL
SOBRE LA REACTIVIDAD DE LAS ARTERIAS
BASILAR, CARÓTIDA Y RENAL DE CONEJO A LA
ENDOTELINA-1**

Memoria presentada por:

Dña. Vannina González Marrachelli

para optar al Grado de Doctor.

Burjassot, marzo de 2006.

D. **ENRIQUE ALBORCH DOMÍNGUEZ**, Catedrático de Fisiología de la Universitat de València, y D. **FRANCISCO JAVIER MIRANDA ALONSO**, Profesor Titular de Fisiología de la Universitat de València,

CERTIFICAN:

Que Dña. **VANNINA GONZÁLEZ MARRACHELLI**, Licenciada en Biología, ha realizado bajo nuestra dirección y la del Profesor JOSÉ ANTONIO ALABADÍ FERRER (fallecido el 1 de noviembre de 2005) el trabajo experimental para la realización de su Tesis Doctoral que lleva por título: **“INFLUENCIA DE LA DIABETES EXPERIMENTAL SOBRE LA REACTIVIDAD DE LAS ARTERIAS BASILAR, CARÓTIDA Y RENAL DE CONEJO A LA ENDOTELINA-1”** en el Departamento de Fisiología de la Universitat de València.

Y para que así conste, expedimos el presente en Valencia, a 28 de marzo de 2006

Dr. Enrique Alborch

Dr. Francisco J. Miranda

AGRADECIMIENTOS

Las palabras son muy limitadas a la hora de expresar todo mi reconocimiento hacia José Antonio Alabadí Ferrer y Francisco Javier Miranda Alonso: hacer la tesis bajo vuestra dirección ha sido para mí una gran dicha. Os doy las gracias por haber confiado en mí. También por vuestra infinita paciencia, por tener la puerta de vuestros despachos siempre abierta, por contestar a cualquier pregunta y sobre todo por vuestro apoyo incondicional, en temas científicos y no científicos, y por vuestro cariño. Toni, no has llegado a ver culminar el resultado de estos años de trabajo conjunto, pero lo importante ha sido y es el día a día, vuestra calidad como directores y vuestra valía como personas. Javier y Toni, sois vosotros los que escribisteis poco a poco con vuestras explicaciones y vuestro ejemplo los cimientos de esta Tesis; yo sólo he tratado de ponerlo, con más o menos gracia, por escrito.

Por supuesto, pertenecer a este grupo no habría sido posible sin la aceptación del Dr. Enrique Alborch Domínguez, codirector de esta tesis y director del grupo de investigación. Gracias por confiar en mí y darme esta oportunidad.

Gracias a Salvador Banacloche por enseñarme todo lo que sé sobre el manejo de los animales. Por su paciencia y buen humor (¡algún día nuestros nudos triunfarán!). Por tener respuesta a prácticamente cualquier pregunta. Por ser además un compañero y guía inestimable en nuestras pequeñas escapadas al monte (¿para cuándo la próxima?).

Gracias a Silvia y a Rosa: vuestras Tesis han estado siempre encima de mi mesa. Habéis allanado el camino y dado ejemplo.

Gracias al Departamento de Fisiología, especialmente a los profesores (os nombraré por orden alfabético): Antonio Alberola, Miguel Asensi, José Centeno, Andrés Irúrzun, Esperanza Martín de Aguilera y Arenales, Pascual Medina, Joan Salom, Juan Sastre, Gloria Segarra, Germán Torregrosa y José Vila, por tener siempre una palabra amable, por vuestro interés por el desarrollo de la Tesis. Gracias de todo corazón por haberme hecho un pequeño sitio en este Departamento y hacerme sentir “como en casa”. Gracias también a los profesores Francisco Dalmases y Carmina Romero, que fueron mis tutores en el programa de doctorado, y que me brindaron siempre su apoyo y cariño.

Gracias a Paula y a Sonia, por hacer del laboratorio un lugar de camaradería, alegre, distendido, a veces polémico y bullicioso de trabajo.

Gracias a Isabel Fariñas y Paco Pérez por abrirme otros horizontes que, aunque han quedado fuera de la Tesis, han contribuido enormemente a mi formación como investigadora. A Celia, Sacri, Elena, Marifé, Laura, Pili y sobretodo Miguel, por tener siempre un ratito para ayudarme, decirme dónde estaban las cosas, por vuestra simpatía y buen humor.

Gracias a Mónica, Ana M, Belén, Marta, Sandra, Ana, María Jesús por haberle dado color a mi vida fuera del laboratorio.

Gracias a Xelo, Fernando y María por acompañarme en el “trago” del congreso de Salamanca.

No quisiera olvidar a nadie, así que gracias a todos los que en algún momento se interesaron por “cómo iba la Tesis”, en especial a Marina y Clara.

Gracias Raúl, por todo tu amor, apoyo incondicional, ánimos, por tu optimismo, colaboración y comprensión en todo momento. Por estar siempre a mi lado.

Gracias a mi Babo y Mamo: lo que me enseñasteis no está en los libros. A pesar de la distancia, siempre estuvisteis, estáis, y estaréis a mi lado apoyándome en todo lo que hago. Ya sé “el No ya lo tengo, hay que ir a por el Sí”.

A mis padres, siempre preocupados por mi felicidad, alentadores y reconfortantes en los momentos bajos. Sin vosotros no lo habría conseguido. Gracias.

A Javier y a Toni

*“Si yo tuve la suerte de alcanzar algo,
esto se debe sólo a que me apoyé en hombros de gigantes”*

(Newton)

ABREVIATURAS

5-HT	5-hidroxitriptamina
AA	ácido araquidónico
AGEs	productos finales de glucosilación avanzada
CE ₅₀	concentración eficaz 50
cAMP	adenosin monofosfato cíclico
cGMP	guanosin monofosfato cíclico
DAG	diacilglicerol
EEM	error estándar de la media
E _{max}	efecto máximo
eNOS	óxido nítrico sintasa endotelial
ET-1	endotelina-1
IGF-I	insulin-like growth factor
iNOS	óxido nítrico sintasa inducible
IP ₃	inositol 1,4,5-trifosfato
IRT	Insuficiencia renal terminal
L-NOArg	N ^G -nitro-L-arginina
MAPK	proteinkinasa mitogénica activada
nNOS	óxido nítrico sintasa neuronal
NO	óxido nítrico
PGI ₂	prostaglandinas I ₂
Pgs	prostaglandinas
PIP ₂	fosfatidil inositol bifosfato
PKC	proteinkinasa C
PLA ₂	fosfolipasa A ₂
TxA ₂	tromboxano A ₂
UTP	uridin trifosfato

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. DIABETES MELLITUS: GENERALIDADES	3
1.1. Datos epidemiológicos	4
1.2. Tipos de diabetes mellitus	7
1.2.1. Diabetes tipo 1	7
1.2.2. Diabetes tipo 2	9
1.3. Complicaciones asociadas a la diabetes mellitus	10
1.3.1. Diabetes y afectación cerebrovascular	11
1.3.2. Diabetes y afectación renal	13
2. MODELOS EXPERIMENTALES DE DIABETES	15
2.1. Ventajas e inconvenientes	15
2.2. Tipos de metodología	17
2.2.1. Diabetes quirúrgica	17
2.2.2. Diabetes química	17
2.2.3. Diabetes viral	20
2.2.4. Diabetes espontánea	20
3. MECANISMOS REGULADORES DE LA REACTIVIDAD VASCULAR	21
3.1. Óxido nítrico	23
3.2. EDHF	26
3.3. Prostanoides	27
3.4. Endotelina-1	31
3.4.1. Síntesis y regulación de la ET-1	31
3.4.2. Receptores de la endotelina-1	34
3.4.3. Mecanismo de acción de la endotelina	36
3.4.3.1. Contracción del músculo liso vascular	36
3.4.3.2. Vasorrelajación dependiente de endotelio	38
4. IMPORTANCIA DE LAS ALTERACIONES VASCULARES EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES	40
4.1. Cambios estructurales en la pared vascular	40
4.2. Cambios funcionales en la pared vascular	42

4.2.1. Disfunción endotelial en diabetes	42
4.2.2. Cambios en el papel del NO	46
4.2.3. Cambios en EDHF	47
4.2.4. Cambios en el papel de prostanoïdes	48
4.2.5. Cambios a vasoconstrictores y vasodilatadores	49
5. ENDOTELINA-1 Y DIABETES	51
5.1. Afectación cerebrovascular	53
5.2. Afectación renal	54
OBJETIVOS	57
MATERIAL Y MÉTODOS	61
1. INDUCCIÓN DE LA DIABETES EXPERIMENTAL	63
2. REGISTRO DE LA TENSIÓN ISOMÉTRICA DESARROLLADA POR SEGMENTOS DE ARTERIA RENAL DE CONEJO	64
2.1. Obtención y montaje de los segmentos arteriales	65
2.2. Técnicas de registro y medición	67
2.3. Protocolo experimental	68
2.4. Análisis de los resultados	70
3. FÁRMACOS Y SOLUCIONES	72
RESULTADOS	73
1. INDUCCIÓN DE LA DIABETES	75
2. INFLUENCIA DE LA DIABETES SOBRE LA RESPUESTA DE LA ARTERIA BASILAR DE CONEJO A LA ENDOTELINA-1	76
2.1. Efecto de la ET-1	76
2.2. Efecto de la ET-1 tras la eliminación del endotelio	77
2.3. Efecto de la ET-1 tras la incubación con L-NOArg	78
2.4. Efecto de la ET-1 tras la incubación con indometacina	79
2.5. Efecto de la ET-1 tras la incubación con BQ-123	80
2.6. Efecto de la ET-1 tras la incubación con BQ-788	82
2.7. Efecto del nitroprusiato sódico	84

3.	INFLUENCIA DE LA DIABETES SOBRE LA RESPUESTA DE LA ARTERIA CARÓTIDA DE CONEJO A LA ENDOTELINA-1	85
3.1.	Efecto de la ET-1	85
3.2.	Efecto de la ET-1 tras la eliminación del endotelio	87
3.3.	Efecto de la ET-1 tras la incubación con L-NOArg	88
3.4.	Efecto de la ET-1 tras la incubación con indometacina	89
3.5.	Efecto de la ET-1 tras la incubación con furegrelate	92
3.6.	Efecto de la ET-1 tras la incubación con BQ-123	93
3.7.	Efecto de la ET-1 tras la incubación con BQ-788	95
4.	INFLUENCIA DE LA DIABETES SOBRE LA RESPUESTA DE LA ARTERIA RENAL DE CONEJO A LA ENDOTELINA-1	98
4.1.	Efecto de la ET-1	98
4.2.	Efecto de la ET-1 tras la eliminación del endotelio	99
4.3.	Efecto de la ET-1 tras la incubación con L-NOArg	101
4.4.	Efecto de la ET-1 tras la incubación con indometacina	102
4.5.	Efecto de la ET-1 tras la incubación con nimesulide	103
4.6.	Efecto de la ET-1 tras la incubación con furegrelate	105
4.7.	Efecto de la ET-1 tras la incubación con BQ-123	106
4.8.	Efecto de la ET-1 tras la incubación con BQ-788	107
	DISCUSIÓN	113
1.	INDUCCIÓN DE LA DIABETES	115
2.	EFFECTO DE LA ET-1 EN LA ARTERIA BASILAR	116
3.	EFFECTO DE LA ET-1 SOBRE LA ARTERIA CARÓTIDA	122
4.	EFFECTO DE LA ET-1 SOBRE LA ARTERIA RENAL	129
	CONCLUSIONES	139
	BIBLIOGRAFÍA	143

INTRODUCCIÓN

1. DIABETES MELLITUS: GENERALIDADES

Las referencias históricas más antiguas de las que se tiene noticia emanan de la cultura oriental. En el siglo V antes de Cristo, un médico llamado Susruta detectó esta enfermedad y la llamó 'de ricos', precisamente porque la población que podía acceder a productos alimenticios caros, tales como los dulces, eran los que la padecían. Los chinos también se acercaron mucho a los aspectos de la diabetes al hablar de la 'orina dulce' que atraía a moscas y demás insectos. Conocían los síntomas pero no llegaron a dar con un tratamiento. Debemos remontarnos a Luxor y sus ruinas para localizar el primer referente occidental acerca de la diabetes. El arqueólogo Ebers halló en 1873 un papiro del año 1553 a. C. en el que se relataban temas relacionados con la medicina que acontecieron en el país egipcio. Algunas de las historias recogidas coincidían en síntomas: adelgazamiento, hambre y sed continuos, incontinencia urinaria... todos los síntomas de la diabetes que se trataban con una dieta que incluía cerveza, sangre de hipopótamo, menta y, por supuesto, ofrendas a los dioses. Etimológicamente, la palabra diabetes guarda relación directa con el término griego que servía para referirse al sifón. A él se refirió Arateo de Capadocia para describir la enfermedad. Thomas Willis, un doctor inglés, probó, literalmente, la orina de varios enfermos y estableció la existencia de dos tipos de diabetes: una 'dulce' (mellitus) y otra insípida. Si bien se iba perfilando la tipología de los síntomas, los remedios tardaban en llegar. Hasta el año 1921, los diabéticos que hoy llamamos de tipo 1 morían de cetoacidosis a las pocas horas del diagnóstico, aunque unos pocos sobrevivían un poco más con desnutrición y debilidad progresivas, hasta morir 1-2 años después en

caquexia extrema. En esos años, la expectativa de vida al nacer de gran parte de la población mundial era de poco más de 40 años, de modo que muy pocas personas llegaban a tener lo que hoy llamamos diabetes tipo 2, enfermedad que comienza habitualmente después de esa edad. Era esta la situación cuando en 1921 se descubrió y purificó la insulina. La primera inyección de insulina la recibió un joven de 14 años llamado Leonard Thompson el 11 de enero de 1922 en el Hospital de Toronto, inaugurándose una nueva esperanza para los afectados de diabetes. Tan pronto como los primeros diabéticos comenzaron a ser tratados con inyecciones de insulina, una oleada de optimismo contagió a médicos, pacientes y familiares, y muchos pensaron que el problema de la diabetes estaba resuelto para siempre. No ocurrió así. A pesar de los grandes avances que se han realizado desde entonces, que han conseguido mejorar tanto la calidad como la expectativa de vida del paciente diabético, quedan todavía sin resolver muchas cuestiones relacionadas con la fisiopatología de la enfermedad y de sus complicaciones.

1.1. Datos epidemiológicos

La Organización Mundial de la Salud define la diabetes mellitus como un desorden metabólico, de múltiples etiologías caracterizado por una hiperglucemia crónica con alteración del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, causado por un defecto en la secreción de insulina, en su acción o de ambas cosas.

Los efectos de la diabetes incluyen daños a largo plazo, con alteración del funcionamiento de varios órganos. La diabetes mellitus puede presentarse con los síntomas característicos como sed, polifagia, poliuria, visión borrosa y pérdida de peso. En sus formas más severas, puede desarrollarse cetoacidosis o un estado hiperosmolar no cetoacidótico que pueden llevar al individuo a un estado de estupor, coma y, en ausencia de tratamiento, muerte. Pero a menudo, los síntomas no son tan severos o pueden no presentarse y, como consecuencia, la elevación de la glucosa en sangre que conlleva causa cambios funcionales y patológicos durante mucho tiempo antes de que se realice un diagnóstico. Los efectos a largo plazo de la diabetes mellitus incluyen el desarrollo progresivo de complicaciones específicas en muchos sistemas corporales, como retinopatías que frecuentemente acaban en ceguera, nefropatía que puede llevar a fallo renal, neuropatías con riesgo de úlceras en los pies y amputaciones, y alteraciones funcionales como la disfunción eréctil. Las personas diabéticas tienen un riesgo incrementado de padecer enfermedades cardiovasculares, vasculares periféricas y cerebrovasculares.

La diabetes mellitus es la cuarta o quinta causa de muerte en la mayoría de los países desarrollados y hay evidencias que sugieren que se trata de una epidemia en muchos países desarrollados, o recientemente desarrollados, debida al aumento de la edad de la población, dietas no saludables, obesidad y vida sedentaria. Según estimaciones de la International Diabetes Federation (<http://www.idf.org/home/>), alrededor del 5.1% de la población con edades comprendidas entre 20-79 años, unas 194 millones de

personas, sufren de diabetes mellitus en todo el mundo y se espera que esta estimación haya aumentado a 333 millones (6.8% de la población adulta) en el 2025. Todo ello hace de este proceso una de las enfermedades no contagiosas más frecuente. Detrás de Rusia, Italia y Turquía, España es el país europeo con mayor número de diabéticos en Europa (casi 3 millones) y se prevé que en 2025 afecte a un millón más de personas.

La diabetes mellitus es una enfermedad relativamente común cuya prevalencia, incidencia, mortalidad y morbilidad asociadas hacen de esta afección uno de los principales problemas de salud pública del siglo XXI. Es una enfermedad crónica que desarrolla a lo largo de su evolución gran número de complicaciones y que representa un número muy importante de consultas médicas, hospitalizaciones, pensiones de invalidez y muerte. Su impacto económico para el sistema de salud y la sociedad es muy elevado, generando un coste económico que multiplica por cuatro el ocasionado por la población no diabética. Según la International Diabetes Federation los costes sanitarios anuales derivados de la diabetes mellitus en todo el mundo, para un rango de edad de 20-79, años está estimado en al menos 153 billones de dólares, pudiendo ser de hasta 286 billones. Si las predicciones de la prevalencia de esta enfermedad se cumplen, los gastos sanitarios totales y directos de la diabetes en todo el mundo alcanzarán entre 213 y 396 billones de dólares en 2025, lo que supondría entre el 7% y 13% de los presupuestos sanitarios de los países con alta prevalencia.

El coste estimado de la diabetes en España en el 2002 osciló entre 2400 y 2675 millones de euros, es decir, el 6.3-7.4% del gasto total del Sistema

Nacional de Salud (Oliva *et al.*, 2004). Aproximadamente un 60% de los costes directos son debidos a hospitalización, siendo en su mayor parte debida a complicaciones de tipo cardiovascular (Hart *et al.*, 1997). Otro aspecto a considerar es el que hace referencia a la enfermedad vascular periférica y su complicación más grave, la amputación, que supone un impacto importante tanto en los costes sanitarios como en la salud del paciente. En España, sólo el gasto por amputación supuso un 7% del coste directo (Rubio *et al.*, 1998).

1.2. Tipos de diabetes mellitus

La diabetes mellitus es un grupo de desórdenes metabólicos con una manifestación en común: la hiperglucemia. Son muchos los procesos patológicos que están implicados en el desarrollo de la enfermedad. Se incluyen procesos que destruyen las células beta pancreáticas, con la consecuente deficiencia en insulina, y otros que se deben a una resistencia a la insulina. En 2002 un comité de expertos internacionales realizó un informe con las siguientes recomendaciones para la clasificación y el diagnóstico de la diabetes mellitus (Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2002):

1.2.1. Diabetes tipo 1

Anteriormente denominada de tipo I, diabetes mellitus insulino-dependiente o diabetes juvenil, se caracteriza por la destrucción de las células

beta pancreáticas por un proceso autoinmune y suele conllevar un déficit absoluto de insulina. Constituye el 10% de todos los casos de diabetes primaria. El inicio de la enfermedad suele ser agudo y se desarrolla en un periodo de tiempo de unos pocos días o semanas. Prácticamente el 95% de las personas con diabetes tipo 1 desarrollan la enfermedad antes de los 25 años, siendo habitual en la infancia o la adolescencia. Tiene la misma incidencia en ambos sexos y una mayor prevalencia en la población blanca. La causa es compleja y aún no está esclarecida; implica factores genéticos, virus, dieta, así como factores químicos y ambientales. Cursa con polifagia, polidipsia, poliuria, y pérdida de peso en poco tiempo. Los pacientes no responden a tratamientos con antidiabéticos orales y requieren la administración de insulina para su supervivencia, ya que sin ella desarrollan graves complicaciones metabólicas, como la cetoacidosis aguda y el coma diabético. La mayoría de los pacientes tienen una forma autoinmune de diabetes tipo 1, con anticuerpos en las células de los islotes pancreáticos y frecuentemente cursan con otros desórdenes como tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison, vitiligo o anemia perniciosa. Algunos pacientes, en general de origen africano o asiático, no tienen anticuerpos pero presentan manifestaciones clínicas similares, por lo que consecuentemente se incluyen en esta clasificación y su enfermedad se denomina “forma idiopática” de la diabetes mellitus tipo 1. Se están ensayando otros posibles tratamientos como el trasplante de páncreas o el trasplante de células beta.

1.2.2. Diabetes tipo 2

Anteriormente denominada diabetes tipo II o diabetes mellitus no insulina-dependiente. Es la forma más común de la diabetes (80-90% de los afectados) y se caracteriza por desórdenes en la acción de la insulina y en la secreción de la misma. Ambas características suelen estar presentes a la vez cuando este tipo de diabetes se manifiesta clínicamente. Está fuertemente asociada con un historial familiar de diabetes, edad avanzada, obesidad y falta de ejercicio. Es más común en mujeres, especialmente en aquellas con un historial de diabetes gestacional, en negros, hispanos y nativos americanos. La resistencia a la insulina e hiperinsulinemia eventualmente producen alteración de la tolerancia a la glucosa. Las células beta quedan exhaustas favoreciendo aún más el ciclo de la intolerancia a la glucosa y la hiperglucemia. La etiología de la diabetes tipo 2 es multifactorial, probablemente genética, pero también condicionada por factores relacionados con los hábitos de vida. Este tipo de diabetes responde al tratamiento con antidiabéticos orales y muchos pacientes pueden tratarse sólo con una dieta adecuada y ejercicio físico (Öztürk *et al.*, 1996; Robbins, 2000).

Existe un tercer grupo de diabetes muy heterogéneo de etiologías muy variadas. Este grupo incluye personas con defectos genéticos en la función de las células beta o con defectos en la acción de la insulina; personas con enfermedades del páncreas exocrino, como pancreatitis o fibrosis quística; personas con disfunción pancreática causada por fármacos, sustancias químicas o infecciones. El cuarto grupo lo constituye la diabetes gestacional.

1.3. Complicaciones asociadas a la diabetes mellitus

Antes de 1921 la causa principal de muerte en pacientes diabéticos era la cetoacidosis diabética, con coma, debido a la falta de insulina (King *et al.*, 1996). Sin embargo, con el descubrimiento de la insulina la mayor causa de mortalidad y morbilidad recae, hoy en día, sobre el fallo renal y las complicaciones cardiovasculares, que afectan tanto al corazón como a los vasos periféricos (Morrish *et al.*, 2001).

Existe una clara relación entre las complicaciones crónicas y la duración de la hiperglucemia. Las complicaciones vasculares van a aparecer como consecuencia de la afectación de los vasos. Las macroangiopatías afectan fundamentalmente a los grandes vasos (coronarias, carótida, arterias de los miembros inferiores) que muestran grandes cambios parecidos a los de la arteriosclerosis con depósito de grandes placas de lípidos en las arterias y calcificación de la túnica media. Son la principal causa, en pacientes diabéticos, de infarto de miocardio, isquemia e infarto cerebral y gangrena isquémica de los miembros inferiores. Sin embargo, la mayoría de las complicaciones circulatorias de la diabetes ocurren en la microcirculación, son las microangiopatías. El cambio morfológico más característico en los vasos afectados es el engrosamiento de la membrana basal. Esto provoca una disminución del aporte de nutrientes a los tejidos y de la eliminación de los productos de desecho, lo que conduce a lesiones tisulares irreparables. Este hecho constituye una de las causas más frecuentes de amputaciones no traumáticas de los miembros inferiores. La retinopatía diabética y nefropatía son las principales manifestaciones de la microangiopatía, con ceguera y fallo

renal como últimas consecuencias. La microangiopatía de los vasa nervorum es importante en la neuropatía diabética, afectando principalmente los nervios sensitivos y el sistema autónomo (Yuan *et al.*, 1999). Ciertas complicaciones diabéticas no son fatales para la vida del enfermo pero pueden alterar de forma significativa su calidad de vida. En los hombres puede producirse impotencia y en ambos sexos es frecuente la disfunción de la vejiga y del intestino grueso (Stehouwer, 1997; Robbins, 2000).

1.3.1. Diabetes y afectación cerebrovascular

Hace más de 2400 años el padre de la medicina, Hipócrates, reconoció y describió el accidente cerebrovascular como el "inicio repentino de parálisis". Hasta hace unos años, el término general que los médicos aplicaban a cualquier persona afectada repentinamente por parálisis se conocía como *apoplejía*. La primera persona en investigar los signos patológicos de la apoplejía fue Johann Jacob Wepfer, a mediados del siglo XVII. De los estudios de autopsias dedujo la importancia de las arterias carótidas y vertebrales en el suministro de sangre al cerebro. Wepfer fue también la primera persona en indicar que la apoplejía, además de ser ocasionada por la hemorragia en el cerebro, podría también ser causada por un bloqueo de una de las arterias principales que suministran sangre al cerebro. Así pues, la apoplejía vino a conocerse como enfermedad cerebrovascular. Hay dos formas de accidente cerebrovascular: el accidente cerebrovascular isquémico, cuando hay un bloqueo de un vaso sanguíneo que suministra sangre al cerebro, y el accidente

cerebrovascular hemorrágico, cuando ocurre un sangrado en el cerebro y alrededor del mismo.

La enfermedad cerebrovascular es una complicación importante de la diabetes mellitus. Los pacientes diabéticos tienen de dos a cuatro veces más riesgo de padecer accidentes cerebrovasculares, así como una mayor mortalidad y menor recuperación tras el accidente cerebrovascular que los pacientes no diabéticos (Caplan, 1996). Además, los pacientes diabéticos tienen doce veces más posibilidades de ser hospitalizados por problemas cerebrovasculares y el 15% de los costes de la enfermedad cerebrovascular se atribuyen a la diabetes (Lukovits *et al.*, 1999). El riesgo relativo de accidente cerebrovascular de la diabetes alcanza el punto más elevado entre los cincuenta y los sesenta años de edad y disminuye después de esta edad, presentándose en los hombres a edades más tempranas que en las mujeres.

Datos epidemiológicos en varios países de occidente, muestran que el 85% de los accidentes cerebrovasculares son isquémicos. De estos, aproximadamente el 80 a 90% son causados por aterotrombosis y embolias que afectan a vasos mayores (Mohr *et al.*, 1997). Entre los vasos de mayor calibre, la enfermedad de la bifurcación carotídea causa el 25 a 30% de todos los casos, y el resto ocurren por afectación de las arterias vertebrales extracraneales y de los vasos mayores intracraneales (arterias vertebrales, basilar, cerebral media, etc.). Para evaluar la gravedad del problema de salud que representa la enfermedad cerebrovascular debe considerarse la evolución natural de los eventos cerebrovasculares: la mortalidad de un ataque agudo es de 25 a 30% y durante el primer año de 15 a 25%, y hasta de 60% a los cinco

años, por lo que la enfermedad cerebrovascular disminuye en forma notable la esperanza de vida. La recurrencia de enfermedad cerebrovascular es de 5 a 15% durante el primer año y hasta de 40% a los cinco años; entre 25 y 40% de los sobrevivientes padecen secuelas que llevan a la incapacidad total o parcial.

El impacto económico de la enfermedad cerebrovascular relacionado con la diabetes es considerable; el coste total del accidente cerebrovascular en los Estados Unidos se estima en unos 43 billones de dólares por año; el coste directo de la atención médica y la terapia en unos 28 billones por año y los costes indirectos de la pérdida de productividad y otros factores en unos 15 millones anuales.

1.3.2. Diabetes y afectación renal

La nefropatía diabética es una de las principales causas de fallo renal en los países desarrollados (Breyer, 1992). Viene definida tanto por la macroalbuminuria (excreción urinaria de albúmina superior a 300 mg/24 horas), como por una función renal anormal, puesta de manifiesto por valores anormales de la concentración sérica de creatinina, del cálculo del aclaramiento de creatinina o de la tasa de filtración glomerular.

Clínicamente, la nefropatía diabética se caracteriza por un riñón hipertrófico, un incremento progresivo de la proteinuria y una disminución de la tasa de filtración glomerular. Estas modificaciones precoces pueden ser producidas por una vasodilatación renal, especialmente de la arteriola aferente, lo que conduce al aumento del flujo y de la presión intraglomerular; también

son consecuencia de los cambios estructurales y de superficie que se producen por la hipertrofia renal concomitante. Es importante resaltar las alteraciones de las sustancias vasoactivas y el consecuente desequilibrio entre los sistemas dilatador y vasoconstrictor que resulta en un predominio de los primeros, dando lugar a un riñón hiperfiltrante y un aumento de la presión intraglomerular. La nefropatía asociada con otras complicaciones de la diabetes tiene como consecuencia un elevado riesgo de morbilidad y una tasa de mortalidad treinta veces superior a la población general (Mogyorosi y Ziyadeh, 1996).

El desarrollo de la enfermedad es paulatino. El 10-30% de diabéticos desarrollan microalbuminuria y, sin intervención terapéutica, el 80% de los diabéticos tipo 1 que desarrollan microalbuminuria aumentan su excreción en 10 a 15 años llegando a la fase de nefropatía clínica. De ellos, en otros 10 años, el 50% llegan a padecer insuficiencia renal terminal (IRT) y, en 20 años, más del 75%. De los diabéticos tipo 2 que desarrollan microalbuminuria, entre el 20 y 40% progresan a la fase de nefropatía clínica. De ellos, sólo un 20% llegan a la IRT pero esto es debido fundamentalmente a que fallecen por causas cardiovasculares antes de comenzar un tratamiento sustitutivo (diálisis o trasplante renal) (Breyer, 1992).

Según la American Diabetes Association, en USA la nefropatía diabética representa el 40% de nuevos casos de IRT; en el año 2000, más de cuarenta mil diabéticos iniciaron el tratamiento para la IRT mientras que unos ciento treinta mil estaban con diálisis o esperando un trasplante de riñón (<http://www.diabetes.org/diabetes-statistics/kidney-disease.jsp>). Esta situación supone una enorme carga económica para los sistemas de salud, sobre todo

cuando se llega a necesitar diálisis o trasplante renal. Otro aspecto, no menos importante, es el deterioro de la calidad de vida, para el enfermo y su familia, como consecuencia del sufrimiento, limitaciones, pérdida de ingresos y gastos derivados de la enfermedad.

De acuerdo con el Estudio Diamante, realizado en pacientes con diabetes tipo 1, la prevalencia e incidencia de la nefropatía diabética en España es comparable a los datos obtenidos en otros países; varía mucho, desde <5% al 30% según el área geográfica, la población estudiada y los enfoques terapéuticos (Esmatjes y De Alvaro, 2002). En España, según datos de la Sociedad Española de Nefrología (<http://www.senefro.org>) la diabetes mellitus supuso el 23% de las inclusiones en diálisis del año 2000, siendo la causa más frecuente de todas. En la Comunidad Valenciana la nefropatía diabética supuso en el año 2003 el 8.86% de las enfermedades renales, el 4.69% de los trasplantes renales y el 70% de los fallecimientos por enfermedad renal (Registro de los enfermos renales de la Comunidad Valenciana, 2003).

2. MODELOS EXPERIMENTALES DE DIABETES

2.1. Ventajas e inconvenientes

La investigación de la diabetes en humanos está muy limitada por consideraciones éticas obvias. Es por ello que los modelos animales de experimentación se han ido utilizando ampliamente en los estudios biomédicos. Además, la diabetes es una enfermedad crónica, con secuelas remotas distintas de los síntomas tempranos, de manera que entender la patología

diabética requeriría toda una vida de estudios seriados. El uso de animales de experimentación evita estos problemas: no sólo son de generación rápida, propiciando realizar estudios genéticos en relativamente poco tiempo, sino que permiten realizar estudios de la implicación de factores ambientales en la enfermedad como son la dieta, ejercicio, drogas, toxinas y agentes infecciosos. Además, los modelos animales son necesarios para entender la patogénesis de las complicaciones y comprobar nuevas estrategias diagnósticas, terapéuticas, de prevención o de diagnóstico temprano.

Los modelos experimentales de diabetes mellitus exhiben muchas características de la diabetes clínica, siendo la más común la hiperglucemia. Esta es la razón por la que no sólo se han usado para entender la etiología de la enfermedad sino también para investigar los mecanismos implicados en las complicaciones diabéticas. Estos modelos utilizan animales que, o bien sufren espontáneamente un síndrome similar a la diabetes, o bien se les induce experimentalmente con productos químicos, virus o extirpando el páncreas. De todas formas, ninguno de los modelos experimentales utilizado es totalmente igual a la enfermedad humana. Pero los organismos intactos tienen una gran complejidad que imposibilita un estudio detallado de mecanismos moleculares o la interacción agonistas/antagonistas con sus receptores. Estas limitaciones pueden superarse gracias a modelos *in vitro* donde la contribución de los componentes de la sangre se eliminan y donde la temperatura del tejido, el medio extracelular e incluso la biodisponibilidad de nutrientes e iones, pueden estar estandarizados.

2.2. Tipos de metodología

La investigación biomédica emplea con frecuencia modelos animales como sustitutos del ser humano. En ellos, los mecanismos patológicos guardan similitud con la enfermedad humana para la cual el animal sirve de modelo. La investigación en animales ha sido crucial para el entendimiento de la compleja patogénesis de la diabetes: en 1859, Claude Bernard demostró en el perro que el glucógeno hepático es la fuente de la glucosa circulante. Trabajando sobre la misma especie, Oscar Minkowski describió en 1899 la vinculación del páncreas con la diabetes. Finalmente, en 1921, Banting y Best aislaron la insulina en el perro y la emplearon en el tratamiento de la diabetes humana.

2.2.1. Diabetes quirúrgica

Consiste en realizar una pancreatectomía parcial o total. Tiene sobretodo una importancia histórica ya que hoy en día casi no se usa.

2.2.2. Diabetes química

Entre las distintas drogas y sustancias químicas, los diabetógenos más usados y eficaces son el aloxano y la estreptozotocina. Otros compuestos tienen una actividad diabetógena débil y su efecto no es específico de las células beta pancreáticas. La administración de aloxano o estreptozotocina ha sido ampliamente aceptada por causar en el animal de experimentación un estado similar al visto en pacientes con diabetes tipo 1: hiperglucemia,

polidipsia, polifagia, poliuria, así como la mayoría de las complicaciones asociadas a la diabetes como son las cardiomiopatías, neuropatías, disfunciones coronarias, alteraciones hepáticas, traqueales, del tejido conectivo, etc.

El aloxano (2,4,5,6-tetraoxohexahidropirimidina) es una sustancia química inestable y reactiva que existe en varias formas tautoméricas. Causa diabetes en animales gracias a su habilidad de destruir las células beta productoras de insulina del páncreas (Webb, 1966; Cooperstein y Watkins, 1981; Lenzen y Panten 1988; Oberley, 1988). Se trata de un compuesto hidrofílico que a pH neutro se reduce rápidamente a ácido dialúrico, que es la forma tóxica del compuesto (Lenzen y Munday, 1991; Munday *et al.*, 1993). Inhibe enzimas dependientes de grupos tiol como la glucoquinasa y la hexoquinasa (Lenzen y Panten, 1988) y sufre ciclaciones redox en presencia de agentes reductores fisiológicos, generando especies reactivas del oxígeno (Winterbourn y Munday, 1989). Se piensa que son estas últimas las implicadas en el comienzo de los cambios tóxicos que llevan a la muerte de las células beta pancreáticas (Oberley, 1988).

Los efectos del aloxano son dependientes del tiempo: tras 5 min de incubación con una concentración de 5 mM no se observan signos de degeneración de los islotes pancreáticos; tras 1 hora, casi el 40% de las células beta pancreáticas sufren necrosis y tras 4 h de incubación, la proporción es del 60-100% de células con necrosis, con una cromatina muy condensada y con un aumento del espacio entre las membranas nucleares. Aunque prácticamente

todas las células beta sufren necrosis pasado este tiempo, las células alfa y delta permanecen intactas (Jörns *et al.*, 1997).

Tras la inyección vía intravenosa de aloxano, los animales muestran una hiperglucemia transitoria seguida en unas pocas horas de hipoglucemia que revierte a hiperglucemia al cabo de 24-48 horas. Teóricamente se esperaba que los animales inyectados con aloxano o estreptozotocina mostraran una falta total de insulina proveniente de sus células beta pancreáticas y necesitaran obligatoriamente la administración exógena de insulina para vivir. Sin embargo, a pesar de presentar niveles insignificantes de insulina endógena, pueden sobrevivir durante meses sin tratamiento. Sólo las ratas Bio Breed (BB) son espontáneamente diabéticas tipo 1 y necesitan insulina para vivir (para una revisión del tema ver Öztürk *et al.*, 1996).

Los animales tratados con aloxano desarrollan varias alteraciones en la respuesta vascular (Teshamariam *et al.*, 1989; Kamata *et al.*, 1992; Feletou *et al.*, 1994). En conejos, las disfunciones endoteliales observadas *ex vivo* en aorta de animales diabéticos pueden mimetizarse, *in vitro*, exponiendo segmentos aórticos de conejos sanos en concentraciones elevadas de glucosa durante 6 horas (Teshamariam *et al.*, 1990). Estas anomalías se han asociado a la producción de prostaglandina endoperóxido-tromboxano A₂ por las células endoteliales.

2.2.3. Diabetes viral

Hasta la fecha se han identificado 13 virus distintos capaces de desarrollar diabetes tipo 1 en humanos y en varios modelos animales (Jun y Yoon, 2001).

2.2.4. Diabetes espontánea

Aunque la mayoría de las especies pueden presentar diabetes espontánea, durante mucho tiempo no se dispuso de modelos animales adecuados. El empleo en el laboratorio de perros, monos y cerdos, animales de gran tamaño y con períodos vitales relativamente prolongados, es costoso y poco eficiente. La aplicación de la genética molecular en el diseño de modelos animales de enfermedades humanas ha permitido un importante avance en el conocimiento de la patogenia de condiciones patológicas generadas por un gen defectuoso. Los modelos animales constituyen una interesante alternativa de estudio, ya que pueden permitir comprender cómo un defecto genético molecular específico llega a traducirse en un fenotipo particular en un sistema vivo integrado y complejo. Además de la existencia de diferentes especies que presentan mutaciones espontáneas que sirven como modelos naturales de enfermedades con base genética, la preparación de cepas de animales genéticamente manipulados, particularmente ratones transgénicos (que sobreexpresan) y knockout (que no expresan) para un gen de interés, han contribuido enormemente a la identificación, el análisis de la secuencia temporal y de la interrelación de los diferentes fenómenos patogénicos

derivados de la función anormal de dicho gen que llevan al desarrollo de un fenotipo equivalente a la enfermedad humana.

En las últimas décadas del siglo XX se progresó notablemente en la comprensión de la diabetes tipo 1 como enfermedad autoinmune a través de los resultados obtenidos en las ratas BioBred (BB) y en el ratón NOD. Los célebres ratones ob y db también son modelos de diabetes espontánea debido a una mutación recesiva; los animales homocigotos para el gen defectuoso son diabéticos, obesos y estériles. Otros animales mutantes usados para la investigación con varias características de la diabetes humana son las ratas Cohen y Zucker, los ratones C57Bl/KsJdb, los hámsteres chinos y las ratas OLETF (como modelo de diabetes tipo 2). Los ratones db/db están bien caracterizados y se utilizan como modelos de diabetes tipo 2.

3. MECANISMOS REGULADORES DE LA REACTIVIDAD VASCULAR

Los vasos sanguíneos están formados por una capa externa o adventicia y una capa media formada por células musculares lisas de potencia variable. Además, en la parte más interna se localiza la capa íntima, formada por el endotelio y una membrana basal. El endotelio presenta una estructura variable según el tipo de vaso (arterial o venoso, grandes vasos, medianos o microvasos) y el territorio (cerrado, continuo, discontinuo o fenestrado). Las células endoteliales forman una monocapa continua que tapiza la cara luminal interna de las arterias, las venas, los capilares y los vasos linfáticos de los

mamíferos, con una estructura muy organizada que asegura el acoplamiento funcional entre ellas.

Inicialmente se pensaba que el endotelio era una simple barrera inerte entre la sangre y la pared vascular. Sin embargo, a partir de la década de los 80, el endotelio ha dejado de ser considerado una barrera selectiva que contiene al plasma y elementos formes de la sangre, y permite el intercambio de nutrientes y desechos. Este verdadero órgano dentro de otros órganos pesa casi 3.5 kg (5% del peso corporal total en un adulto de 70 kg), y sus células consumen gran cantidad de energía, fruto de su activo metabolismo. En condiciones fisiológicas, el endotelio actúa como un regulador inhibitor de la contracción vascular, adhesión leucocitaria, crecimiento de las células del músculo liso vascular y agregación plaquetaria a través de la producción de una serie de moléculas activas biológicamente (Palmer *et al.*, 1987); el endotelio también desempeña otro tipo de acciones fisiológicas como son la recaptación y metabolización de la 5-HT y de la noradrenalina circulante, la conversión de la angiotensina I en angiotensina II, el metabolismo de la bradiquinina, así como la liberación de noradrenalina por las terminaciones nerviosas adrenérgicas (Cohen y Weisbros, 1988).

La membrana de las células endoteliales tiene una gran variedad de receptores frente a numerosas sustancias vasoactivas, lo que hace que un sinnúmero de actividades fisiológicas tengan al endotelio como escenario, y que la disfunción endotelial esté involucrada en numerosas patologías.

Las células endoteliales producen tres sustancias principales con acción vasodilatadora: óxido nítrico, factor hiperpolarizante (EDHF) y

prostanoides como la prostaciclina (prostaglandina I₂). Pero el tono y la estructura del sistema vascular están regulados también por sustancias vasoconstrictoras sintetizadas por el mismo endotelio, manteniendo un delicado equilibrio con las sustancias vasodilatadoras. Los representantes más interesantes, si bien no los únicos, son la endotelina, la angiotensina II y los prostanoides vasoconstrictores (tromboxano A₂, prostaglandina F_{2α}, etc.).

3.1. Óxido nítrico

En 1980, Furchgott y Zawadzki descubrieron que la relajación de los segmentos arteriales de aorta en respuesta a los agonistas se producía solamente si la capa de células endoteliales permanecía intacta. Concluyeron que las células endoteliales liberaban un agente capaz de relajar el músculo liso subyacente que denominaron factor de relajación derivado del endotelio o EDRF. Siete años después, Palmer y colaboradores identificaron este agente como el óxido nítrico (NO).

El NO es una molécula pequeña, en estado gaseoso, compuesta por un átomo de nitrógeno y uno de oxígeno y que contiene un electrón desapareado. Estas características hacen que el NO sea un mensajero ideal: por ser una molécula no cargada puede difundir libremente a través de las membranas. Además, el hecho de poseer un electrón desapareado hace que sea un radical y, por tanto, que sea muy reactivo (Lowenstein *et al.*, 1994). Por último, su tiempo de vida es muy corto, apenas 3 a 5 segundos, transformándose en formas inactivas como el nitrito y el nitrato. La

oxihemoglobina y los radicales libres del O₂ son las principales moléculas que catalizan esta reacción. Esta es la razón por la que el NO no puede actuar a distancia y sólo lo hace a nivel local (acción paracrina). A su vez actúa sobre la propia célula endotelial generadora, limitando su formación (acción autocrina) en un mecanismo autorregulador de retroalimentación negativa.

El NO se forma en una reacción catalizada por el enzima óxido nítrico sintasa (NOS) que convierte la L-arginina y el oxígeno en citrulina y NO. Se han aislado varias isoformas de NOS homólogas que se han dividido en dos categorías con distinta regulación y actividad (Moncada *et al.*, 1997): las isoformas constitutivas endotelial (eNOS) o neuronal (nNOS) se sitúan en el endotelio vascular, son Ca²⁺ y calmodulina dependientes (Veelken *et al.*, 2000). Son inactivas hasta que los niveles de calcio intracelulares aumentan, la proteína de unión al calcio, calmodulina, se une al calcio y el complejo activa la óxido nítrico sintasa. Las isoformas constitutivas sintetizan entonces pequeñas cantidades de NO hasta que los niveles de calcio disminuyen. La isoforma NOS inducible (iNOS), calcio independiente, se expresa tras varios estímulos inflamatorios en las células endoteliales, células musculares lisas de la pared vascular y macrófagos. La cantidad de NO generada por la NOS inducible es siempre mayor que la generada por la NOS constitutiva (Etienne *et al.*, 1996).

El NO se produce normalmente en muchos tipos de células, entre ellas las endoteliales, y es capaz de regular una gran cantidad de procesos biológicos. Al revés de lo que sucede con la mayoría de las moléculas que transmiten señales entre células (hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento), el NO difunde fuera de la célula que lo ha generado y penetra en

las células efectoras, donde interacciona con sus dianas moleculares a través de receptores específicos asociados a la membrana plasmática. El NO tiene funciones que varían desde la neurotransmisión hasta la vasodilatación. En muchos casos lleva a cabo sus efectos biológicos bien activando la guanilato ciclasa e incrementando la síntesis de GMP cíclico a partir de GTP, bien a través de mecanismos independientes de GMP cíclico: interacción con metales de transición, radicales libres, ácidos grasos insaturados y otras moléculas. Algunas de estas reacciones dan como resultado la oxidación del óxido nítrico a nitritos o nitratos para finalizar su acción mientras que otras pueden alterar la estructura de proteínas, su función y/o capacidad catalítica.

En humanos el papel del NO en el mantenimiento del tono vascular está bien establecido gracias al uso de análogos de L-Arginina (Cardillo *et al.*, 2000). Los vasos sanguíneos se encuentran en un estado constante de dilatación activa mediada por NO. Las células endoteliales liberan continuamente pequeñas cantidades de NO que producen un nivel basal de relajación del músculo liso vascular. El NO es un autorregulador del flujo sanguíneo; regula el flujo sanguíneo en el cerebro (Toda *et al.*, 1990; Tanaka *et al.*, 1991), corazón (Amezcuca *et al.*, 1989; Jones *et al.*, 1992), pulmón (Fineman *et al.*, 1991), tracto gastrointestinal (Iwata *et al.*, 1992) y riñones (Yukimura *et al.*, 1992). Ajusta de forma automática el flujo sanguíneo en respuesta a cambios locales en algunas regiones del sistema vascular. Algunos de estos factores físicos a los que las células endoteliales responden con un aumento de la producción de NO son: la isquemia, estrés por fricción o cizallamiento, e incremento del flujo sanguíneo a través del vaso. Factores localmente liberados

por el tejido adyacente, como bradiquinina o acetilcolina, también pueden inducir la liberación de NO en algunos vasos pero no en otros. La liberación de NO en el sistema vascular también está controlada por el sistema nervioso autónomo. Los nervios parasimpáticos, que expresan óxido nítrico sintasa, terminan en la adventicia de algunos grandes vasos, como las arterias cerebrales y retinianas (Nozaki *et al.*, 1993). Los nervios liberan NO y difunde en la túnica media muscular del vaso, causando vasorrelajación (Lowenstein *et al.*, 1994).

Son muchas las enfermedades debidas a una deficiencia cuantitativa o funcional de NO. Una insuficiencia de NO se caracteriza por un déficit neto de producción de NO tisular, inactivación de NO aumentada, biodisponibilidad de NO reducida o catálisis de NOS alterada. En todos estos casos, una deficiencia de NO limitaría la señal de transducción dependiente de NO en detrimento de la función celular normal (Napoli y Ignarro, 2003).

3.2. EDHF

El factor hiperpolarizante de las células del músculo liso dependiente de endotelio (EDHF) se describió por primera vez hace 22 años (Bolton *et al.*, 1984). Sucesivos estudios revelaron que el EDHF era responsable de la respuesta vasodilatadora mantenida cuando se bloqueaba simultáneamente la acción de la NO sintasa y la ciclooxigenasa (Chen *et al.*, 1988; Taylor y Weston, 1988). La característica que define la respuesta atribuida al EDHF es que la relajación del músculo liso vascular siempre va acompañada de una

hiperpolarización de gran amplitud que produce vasorrelajación a través de la apertura de los canales de potasio.

A pesar de los numerosos estudios realizados para identificar el factor específico responsable de la hiperpolarización dependiente de endotelio se desconoce su estructura química. Se ha propuesto una amplia variedad de factores para desempeñar este papel: iones potasio (K^+) (Edwards *et al.*, 1998), el ácido epoxieicosatrienoico (EETs) (Gautier *et al.*, 2005), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Matoba y Shimokawa, 2003) y el péptido natriurético tipo C (Chauhan *et al.*, 2003).

La contribución del EDHF a la relajación depende notablemente del tamaño del vaso; en las grandes arterias tanto el NO como el EDHF contribuyen de la misma forma mientras que en microvasos la mayor parte de la relajación se debe al EDHF (Urakami-Harasawa *et al.*, 1997).

3.3. Prostanoides

En 1930 Kurzrok y Lieb notificaron que el semen humano producía cierto estado de relajación en algunos segmentos del útero de la mujer si ésta ya había estado embarazada, pero ejercía el efecto contrario en mujeres estériles. Posteriormente, en 1934, Von Euler demostró que ciertas sustancias lipídicas extraídas de las glándulas prostáticas del carnero eran capaces de estimular ciertos músculos lisos no vasculares y las denominó prostaglandinas.

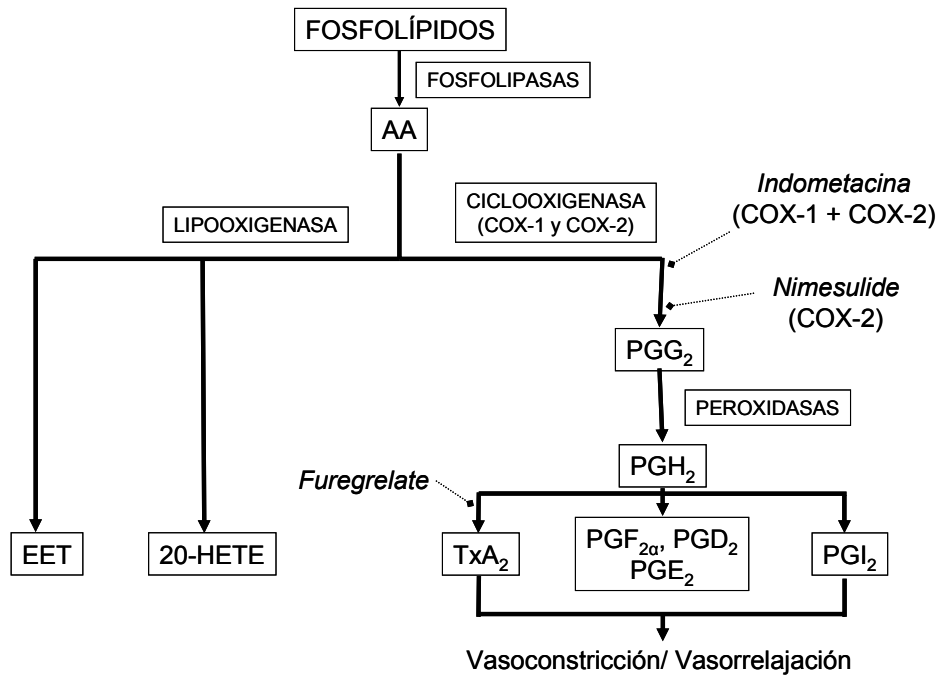


Figura 1. Metabolismo del ácido araquidónico

Se han denominado eicosanoides a las familias de prostaglandinas, leucotrienos y compuestos similares que derivan de ácidos grasos esenciales poliinsaturados de 20 carbonos que contienen 3, 4 ó 5 enlaces dobles. En los seres humanos, el ácido araquidónico (AA) es el precursor más abundante y está presente en la dieta o se puede sintetizar a partir del ácido linoleico de los alimentos. El AA se esterifica hasta generar fosfolípidos en las membranas celulares u otros lípidos complejos. En la célula su concentración libre es muy pequeña y, por ello, la biosíntesis de eicosanoides depende de su disponibilidad para que sobre ellos actúen los enzimas que los sintetizan; esto es consecuencia de su liberación desde los depósitos celulares de lípidos por acción de la fosfolipasa A₂. El AA, liberado por los fosfolípidos de la membrana celular, es el precursor de un conjunto de sustancias fisiológicamente activas obtenidas a través de dos vías metabólicas: la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa. La vía de la ciclooxigenasa es inhibida por la aspirina y la

indometacina y produce una serie de prostaglandinas entre las que se encuentran la prostaciclina, el tromboxano A₂ y la prostaglandina F_{2α}. La vía de la lipooxigenasa lleva a la formación de diversos endoperóxidos y leucotrienos entre los que se encuentran el ácido epoxieicosatrienoico (EET) y el ácido graso 20-hidroxi-eicosatetraenoico (20-HETE) (Figura 1). Estas sustancias tienen, con frecuencia, acciones antagónicas entre las que cabe destacar vasodilatación y vasoconstricción, broncodilatación y broncoconstricción, estimulación e inhibición de la agregación plaquetaria, etc.

Se ha descrito la existencia de dos isoformas de ciclooxigenasa, con diferencias notables entre ellas, tanto en distribución en los diferentes tejidos como en su papel fisiológico: COX-1 y COX-2.

COX-1 realiza funciones homeostáticas, contribuyendo al funcionamiento normal del riñón, la integridad de la mucosa gástrica y la hemostasia. Se localiza en altas concentraciones en las plaquetas, células del endotelio vascular, mucosa gástrica y en el túbulo colector de las nefronas. Dichas concentraciones permanecen constantes, aunque también pueden incrementarse levemente por el estímulo de factores de crecimiento y ciertas hormonas.

COX-2 se localiza en numerosos tejidos (cerebro, órganos reproductores, hígado, hueso, aparato digestivo, riñón) a unas concentraciones bajas y constantes, pero determinados estímulos (interleucina-1, factor de necrosis tumoral, liposacáridos, mitógenos, cAMP) son capaces de inducir una elevación importante de su concentración en los tejidos. Por ello, COX-2 se considera un enzima inducible, capaz de incrementar sus niveles frente a

estímulos inflamatorios o fisiológicos. A nivel renal, COX-2 adquiere mayor relevancia por su papel en el mantenimiento del tono vasodilatador aferente y eferente. Recientemente se ha visto que ambas isoformas (COX-1 y COX-2) se expresan de forma constitutiva en todas las regiones del riñón humano adulto, pero con una localización distinta. COX-1 se asocia con los túbulos colectores mientras que COX-2 se asocia con la túnica media del músculo liso y los pericitos de todos los segmentos vasculares pre y postglomerulares (Therland *et al.*, 2004). Tras el nacimiento, se ha demostrado que la baja expresión renal de COX-2 se incrementa rápidamente en las dos primeras semanas postnatales y disminuye progresivamente hasta niveles más bajos en los conejos adultos normales (Schumacher *et al.*, 2002).

Además de desempeñar funciones fisiológicas en los tejidos, COX-2 es responsable de la producción de las prostaglandinas que median en la inflamación, el dolor, el edema y la fiebre.

La diversidad de los efectos de los prostanoides se explica por la existencia de receptores característicos que median sus acciones. Las prostaglandinas E₂ e I₂ generadas localmente modulan el tono vascular. La de tipo I₂ (prostaciclina), producida por el endotelio vascular, es liberada por fuerzas de fricción y también por autacoides vasoconstrictores y vasodilatadores.

El tromboxano A₂ es un vasoconstrictor potente y participa en la agregación plaquetar y contracción vascular. La prostaciclina es soluble en lípidos y muy inestable en el organismo. Tras su producción en las células endoteliales actúa como vasodilatador y anticoagulante local. Produce

vasorrelajación predominantemente por la vía de la adenilato ciclasa y el sistema de transducción del AMP cíclico (Kukovetz *et al.*, 1979; Ignarro *et al.*, 1985).

Como se ha comentado anteriormente, el endotelio libera también sustancias con acción vasoconstrictora (endotelina, angiotensina II, tromboxano A₂, etc.), que mantienen un delicado equilibrio con las sustancias vasodilatadoras. Vamos a centrar nuestra atención en la endotelina-1 (ET-1), por ser el tema de la presente Tesis.

3.4. Endotelina-1

3.4.1. Síntesis y regulación de la ET-1

La ET-1 es uno de los vasoconstrictores naturales más potentes que se conocen. Aislada por primera vez a partir de un cultivo de células endoteliales de aorta porcina, se trata de un péptido de 21 aminoácidos, con un peso molecular de 2492 Da, que posee un grupo amino y carboxilo libres y dos puentes disulfuro intramoleculares (Yanagisawa *et al.*, 1988). En mamíferos, la familia de la endotelina comprende tres isoformas endógenas: ET-1, ET-2 y ET-3 (Yanagisawa *et al.*, 1988; Inoue *et al.*, 1989). De estas tres isoformas la ET-1 es el único péptido producido por el endotelio vascular.

La ET-1 es un péptido capaz de secretarse mediante dos vías (Russell *et al.*, 1998a). El péptido se libera a través de la vía constitutiva, de forma continua por las células del endotelio vascular, para producir una intensa

vasoconstricción del músculo liso subyacente, contribuyendo al mantenimiento del tono vascular endógeno (Haynes y Webb, 1994). El péptido también se libera, de forma regulada, a partir de los gránulos de almacenamiento específicos de las células endoteliales (los cuerpos de Weibel-Palade) en respuesta a estímulos fisiológicos o fisiopatológicos produciendo más vasoconstricción (Tasaka y Kitazumi, 1994; Russell *et al.*, 1998b). Por tanto, la ET-1 actúa como una hormona local (vaso sanguíneo) más que circulante, siendo sus concentraciones comparativamente más bajas en plasma y en otros tejidos. La ET-1 es rápidamente internalizada por las células del músculo liso a través de endocitosis mediada por clatrina (Resink *et al.*, 1990) y aclarada de la circulación por mecanismos accionados por receptor en pulmón y riñón (Shiba *et al.*, 1989; Fukuroda *et al.*, 1994). Aunque las células endoteliales son la principal fuente de endotelina, los genes que codifican los tres isopéptidos se expresan en una amplia variedad de tipos celulares como miocitos cardíacos, epitelio tubular renal, mesangio glomerular, glía, pituitaria, macrófagos, células cebadas, etc., lo que sugiere que los péptidos pueden participar en complejos mecanismos reguladores en varios órganos. Las células del músculo liso vascular producen ET-1, al menos *in vitro*, aunque con una proporción cien veces menor que las células endoteliales (Resink *et al.*, 1990).

La expresión de la ET-1 a nivel de transcripción génica está modulada por diversos factores como la tensión de fricción mediada por el flujo intravascular, el estiramiento pulsátil, la hipoxia, la insulina, las lipoproteínas de baja densidad, la inmunoglobulina-1, el cortisol, la trombina, citoquinas como los factores de necrosis tumoral alfa y beta, factores de crecimiento, sustancias

vasoactivas como la angiotensina II, noradrenalina, vasopresina, bradiquinina, adrenalina y la propia ET-1 entre otros (Chow *et al.*, 2002). Por el contrario, NO, prostaciclina y péptido atrial natriurético inhiben su expresión, probablemente debido a la inhibición de cGMP mediada por el metabolismo del fosfatidilinositol. La heparina también disminuye la expresión del mRNA de la endotelina pero a través de la inhibición de la proteinquinasa C (PKC).

Además de producir vasoconstricción, la ET-1 tiene otras numerosas funciones: incremento de la potencia contráctil de otros vasoconstrictores como la noradrenalina, serotonina y angiotensina en los vasos sanguíneos; regulación del barorreflejo e influencia en el sistema nervioso central y autónomo; modulación de la excreción de sodio por el riñón; contribuye a la aterogénesis mediante la estimulación de la adhesión de neutrófilos, agregación plaquetar y proliferación del músculo liso, actuando como un antagonista natural del NO; causa la contracción del músculo liso no vascular (músculo liso intestinal, traqueal, bronquial, mesangial, uterino y de la vejiga); estimula la liberación de neuropéptidos y de péptido natriurético, y la biosíntesis de aldosterona; modula la liberación de neurotransmisores y aumenta la resorción ósea. Además, la endotelina estimula la proliferación de un gran número de tipos celulares, incluyendo las células del músculo liso, miocitos cardíacos, fibroblastos, astrocitos, etc. (Miyauchi *et al.*, 1999). Se cree que en muchas de estas células la ET-1 puede actuar potenciando la acción de otros factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (Davenport, 2002). También puede producir vasodilatación a través de la

liberación de NO y prostaciclina. La ET-1 además induce la expresión de varios proto-oncogenes (c-fos, c-jun, c-myc, etc).

3.4.2. Receptores de la endotelina-1

Los efectos de las endotelinas están mediados por la activación de al menos dos tipos de receptores, acoplados a proteínas G, denominados receptores de endotelina ET_A y ET_B (Chow *et al.*, 2002; Davenport, 2002). Estos receptores se encuentran ampliamente expresados en el territorio vascular y en estructuras no vasculares como las células epiteliales, y en el sistema nervioso en la glía y las neuronas.

Los receptores ET_A tienen mayor afinidad de unión por ET-1 y ET-2. Los ET_B tienen igual afinidad por todas las isoformas de ET. Ambos tipos de receptores pueden estimular múltiples y complejos mecanismos de señalización intracelular, incluyendo la activación de la hidrólisis de fosfatidilinositol y de la proteinquinasa activada por mitógeno (mitogen-activated protein kinase, MAPK) y la modulación de la adenilato ciclasa, entre otros (Koepp *et al.*, 2002).

En humanos, los receptores ET_A predominan en el músculo liso de los vasos sanguíneos; la baja densidad de receptores ET_B (<15%) en el músculo liso explicaría su poca contribución a la vasoconstricción tanto en tejido normal como en tejido alterado (Maguire y Davenport, 1995). Con una vida media menor de 1 minuto, la ET-1 se elimina rápidamente del plasma, una acción en la que pueden jugar un papel decisivo los receptores ET_B,

considerados por ello como receptores de aclarado (“clearing receptor”) (Fukuroda *et al.*, 1994; Davenport, 2002). Los receptores ET_B localizados en las células endoteliales también juegan un papel en la liberación de factores relajantes derivados del endotelio, como NO y prostanoïdes (Tirapelli *et al.*, 2005). La acción resultante de la liberación endotelial de ET-1 consiste, por lo tanto, en una vasodilatación inicial y transitoria por activación de receptores ET_B endoteliales seguida de una contracción persistente y de inicio lento por activación de receptores ET_A y ET_B musculares. La situación en animales es más compleja debido a que la contribución relativa de la constricción mediada por los receptores ET_B puede variar, dependiendo de las especies, lecho vascular y tamaño del vaso. En algunos vasos sanguíneos, como la vena safena de conejo, la vena yugular de conejo, el lecho vascular renal de rata, los receptores ET_B median la vasoconstricción. En otros vasos, se piensa que la ET-1 media vasoconstricción mediante la activación de ambos receptores (Davenport, 2002).

En muchos tejidos y órganos los efectos mediados a través de los receptores de endotelina ET_A y/o ET_B dependen o están modulados por eicosanoides de la vía de la ciclooxigenasa (Hyslop y De Nucci, 1992; Rae *et al.*, 1995). Además, en algunas células, la ET-1 puede regular al alza la expresión de la fosfolipasa A₂ y de COX-1 pero no de COX-2 (Schramek *et al.*, 1994; Gallois *et al.*, 1998). Por ello, la alteración de los receptores de ET puede ser de gran importancia en la patogénesis de varias complicaciones crónicas de la diabetes.

3.4.3. Mecanismo de acción de la endotelina

A pesar de haberse realizado numerosos estudios de la función de la endotelina, su significado fisiológico en el sistema cardiovascular aún no está completamente aclarado, pero parece ser de gran relevancia como lo demuestran los experimentos realizados por Kurihara *et al.* (1994) con ratones deficientes para la ET-1. En este estudio se mostraba que en ratones heterocigotos se producía un pequeño incremento de la presión arterial; sin embargo, los ratones homocigotos morían poco después de nacer por razones desconocidas.

3.4.3.1. Contracción del músculo liso vascular

La ET-1 induce una contracción dosis dependiente de los segmentos vasculares aislados, procedentes tanto de humanos como de animales de experimentación, mediante su acción directa sobre el músculo liso (Yanagisawa *et al.*, 1988). La unión de la ET-1 a los receptores ET_A o ET_B de las células de músculo liso vascular produce (Figura 2) la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje y, a través del acoplamiento con una proteína G, la activación de la fosfolipasa C (PLC). Este enzima inicia la hidrólisis de lípidos complejos de la membrana celular, como el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) que genera inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y 1,2 diacilglicerol (DAG), un activador del la PKC y estimula la entrada de Ca²⁺. El aumento de calcio intracelular activa la quinasa de la cadena ligera de la miosina dependiente de calmodulina, fosforilándose esta cadena ligera y permitiendo la

interacción actina-miosina que desencadena el inicio de la contracción del músculo liso. Esta PKC, además, es capaz de fosforilar una serie de proteínas mediando así efectos celulares que incluyen secreción, modulación de conductancias iónicas, contracción del músculo liso, proliferación celular y activación del intercambio $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ (Nishizuka, 1988).

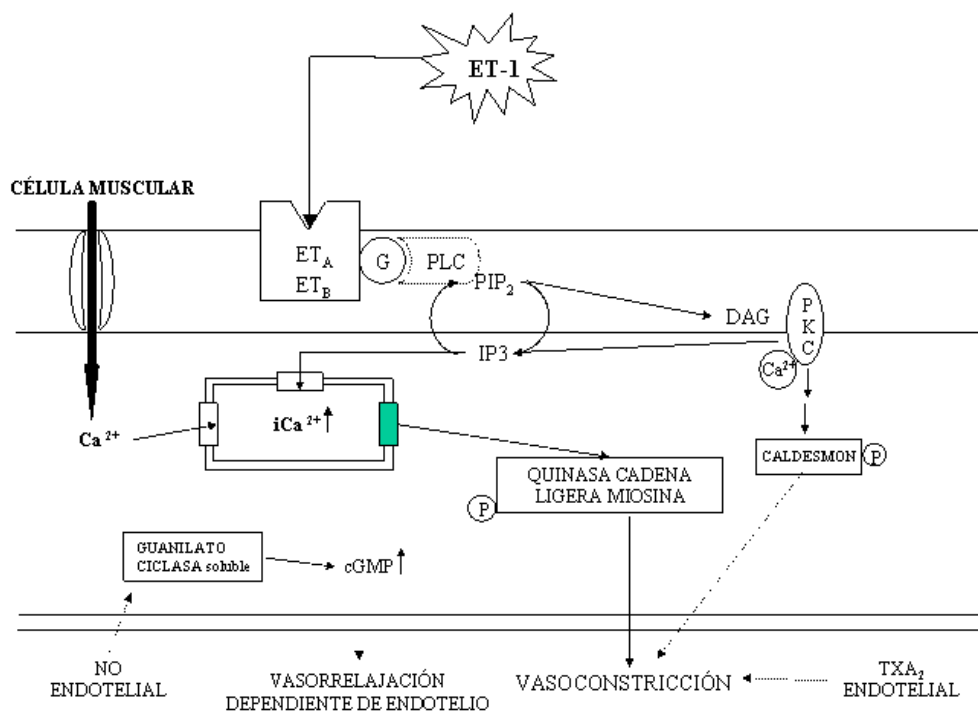


Figura 2. Mecanismo de acción de la ET-1 sobre el músculo liso de la pared arterial.

El DAG también sirve de sustrato a la fosfolipasa A₂ para liberar ácido araquidónico, precursor de las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, que juegan un importante papel en la regulación de distintas funciones celulares (Takuwa, 1993; Horowitz *et al.*, 1996).

3.4.3. 2. Vasorrelajación dependiente de endotelio

La endotelina estimula la liberación de prostanoídes vasodilatadores y NO por parte del endotelio que pueden mediar su efecto vasodilatador y antiplaquetario (Figura 3). La ET-1 actúa a través de receptores ET_B que producen la activación de la fosfolipasa C (PLC) y abre los canales de calcio, favoreciendo el aumento del calcio intracelular y la activación de la PKC. Hay al menos tres tipos distintos de canales responsables de la entrada de calcio; la ET-1 activa un canal de calcio dependiente de voltaje, uno que responde a bajas concentraciones de ET-1 y otro que responde a concentraciones relativamente más altas (Chow *et al.*, 2002). La PKC, a su vez, activa la cascada de serintreoninquininas, causando la activación de una MAPK, la cual fosforila una fosfolipasa A₂ citosólica (PLA₂) y se libera ácido araquidónico (AA), que es metabolizado por la vía de la ciclooxigenasa a prostaciclina y otros prostanoídes vasodilatadores que actúan en la musculatura lisa vascular produciendo un incremento de los niveles de cAMP y relajación (Takuwa, 1993; Miyauchi y Masaka, 1999).

El aumento del calcio intracelular activa una isoforma (eNOS) de la NO sintasa dependiente de calmodulina que sintetiza NO. El NO actúa en la capa subyacente del músculo liso y activa una guanilato ciclasa soluble que genera GMP cíclico (cGMP). El incremento intracelular de los niveles de cGMP produce la relajación del músculo liso vascular al inhibir tanto la activación de la fosfolipasa C producida por agonistas como la apertura de los canales de calcio, además de activar la salida de Ca²⁺ a través de la membrana plasmática (Murad, 1986).

Estudios *in vitro* y en otros modelos experimentales han indicado la existencia de interacciones complejas entre el NO y la ET-1. Así, el NO liberado por las células endoteliales inhibe permanentemente la síntesis y los efectos vasoconstrictores de la ET-1, la cual a su vez puede estimular la producción de NO por medio de interacciones autocrinas con los receptores ET_B (Kourembanas, 1993; Cardillo *et al.*, 2000).

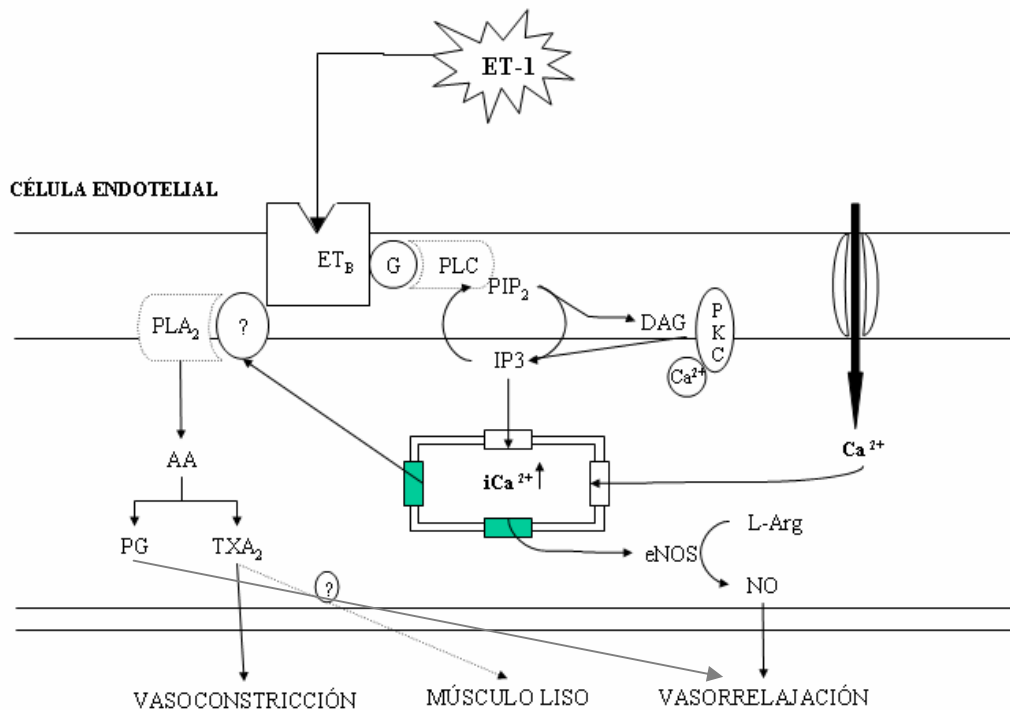


Figura 3. Papel del endotelio en la regulación de la acción contráctil de la ET-1

Diversos factores como el stress de estiramiento parietal o fricción mediado por el flujo intravascular, las catecolaminas, la vasopresina y oxitocina, la histamina y la bradiquinina, la sustancia P y los neuropéptidos, la trombina y productos plaquetarios vasoactivos regulan el tono vascular e

inducen la liberación endotelial de sustancias vasodilatadoras, que modulan la acción de dichos factores. Además de todos los factores anteriormente citados, el tono vascular también viene determinado por otros factores como las presiones parciales de CO₂ y O₂ en sangre o el pH.

4. IMPORTANCIA DE LAS ALTERACIONES VASCULARES EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES

La integridad y la función de la capa de células endoteliales se encuentran profundamente alteradas tanto en humanos como en animales diabéticos (Ruderman *et al.*, 1984; Chan *et al.*, 2000).

4.1. Cambios estructurales en la pared vascular

La diabetes mellitus provoca cambios estructurales, tanto macroscópicos como microscópicos, en la pared vascular que afectan principalmente al endotelio, subendotelio y músculo liso. La arteriopatía diabética se caracteriza por estrechamiento de las arterias a nivel de la túnica media e íntima debido a calcificaciones y a rugosidad endotelial, con formación de placas de ateroma (Neubauer y Gundersen, 1983). El crecimiento inicial de las placas ateromatosas es por la acumulación de lípidos en el espacio subendotelial, seguido de una proliferación del músculo liso y erosión del endotelio. Como consecuencia, el flujo sanguíneo pasa a ser no laminar y se generan turbulencias y zonas de estancamiento que perpetúan el daño arterial

y la formación de coágulos. Este proceso comienza en las primeras décadas de la vida.

En la diabetes, además de los cambios debidos al flujo, la hiperglucemia puede, por sí misma, producir cambios estructurales y funcionales vasculares. Altas concentraciones de D-glucosa estimulan la proliferación y el crecimiento de las células del músculo liso (Graier *et al.*, 1995). Además, la formación de los productos de glucosilación terminal avanzada, consecuencia de la hiperglucemia crónica, puede tener influencia sobre los vasos. Estos productos se acumulan en las proteínas tisulares con reducidas tasas de degradación y se han implicado en muchas de las complicaciones asociadas a la diabetes. El aumento de los productos finales de glucosilación avanzada provoca una reducción de la elasticidad vascular y un aumento de la permeabilidad de la pared vascular en la diabetes (Huijberts *et al.*, 1993). Además, se ha comprobado que el colágeno glucosilado suprime el efecto inhibitor del colágeno sobre la proliferación celular del músculo liso y puede, por tanto, inducir un aumento del espesor de la pared vascular (Iino *et al.*, 1996).

También se ha descrito un aumento de la proliferación de las células endoteliales, y un incremento en el número de células endoteliales multinucleadas (Chan *et al.*, 2000). Estudios de microscopía de transmisión electrónica han mostrado que las células endoteliales de cordón umbilical de mujeres embarazadas de tipo 1 presentan un incremento en la fluidez de la membrana endotelial, un incremento del área mitocondrial y una fase de

endocitosis más fluida en comparación con las obtenidas en cordón de mujeres no diabéticas (Chan *et al.*, 2000).

Estudios llevados a cabo por The Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications EDIC (1999) demuestran que los pacientes con diabetes mellitus tipo1 presentan un espesor incrementado de la túnica media e íntima de las arterias carotídeas común e internas.

4.2. Cambios funcionales en la pared vascular

La diabetes proporciona un claro modelo de enfermedad vascular crónica en la cual la homeostasis alterada de la glucosa se traduce en una disfunción multiorgánica. Se ha descrito una alteración de la función endotelial con cambios en los mecanismos reguladores de la reactividad vascular.

4.2.1. Disfunción endotelial en diabetes

El endotelio como consecuencia de su localización, está expuesto a las fuerzas mecánicas sanguíneas. Esto es particularmente importante en las grandes arterias y especialmente, en las zonas de bifurcación donde el flujo laminar se vuelve turbulento. Así la influencia mecánica de la presión arterial, responsable de un incremento de las fuerzas de fricción sobre las células endoteliales vasculares, es uno de los mecanismos inductores de la disfunción endotelial. Ello puede dar lugar a modificaciones estructurales y/o funcionales

que afecten a la producción o a la liberación de los distintos factores vasoactivos.

De forma general, se puede definir la disfunción endotelial como la serie de alteraciones que afectan la síntesis, liberación, difusión o degradación de los factores que se generan en el endotelio. Los mecanismos responsables de dichas alteraciones pueden originarse tanto por cambios en los receptores como en las señales intracelulares de transducción, o incluso, por modificaciones en la respuesta de las células diana de dichos factores. La disfunción endotelial no es homogénea en sus características y su distribución; varía en función de la patología asociada, así como con el lecho vascular que se considere. Cuando el endotelio se somete a la agresión de diferentes factores de riesgo, como ocurre en la diabetes, pasa a ser considerado como un endotelio disfuncional (Schalkwijk y Stehouwer, 2005); entonces, las funciones que antes fueron normales se alteran totalmente, dando (1) una mayor tendencia a la vasoconstricción, (2) una mayor adhesividad de las plaquetas y de los leucocitos, (3) un crecimiento descontrolado de las células, especialmente las del músculo liso en la pared del vaso, (4) un aumento del paso de lípidos al subendotelio, y (5) una mayor tendencia a la trombosis vascular.

La figura 4 muestra de forma esquemática algunos de los mecanismos de disfunción endotelial descritos en la diabetes.

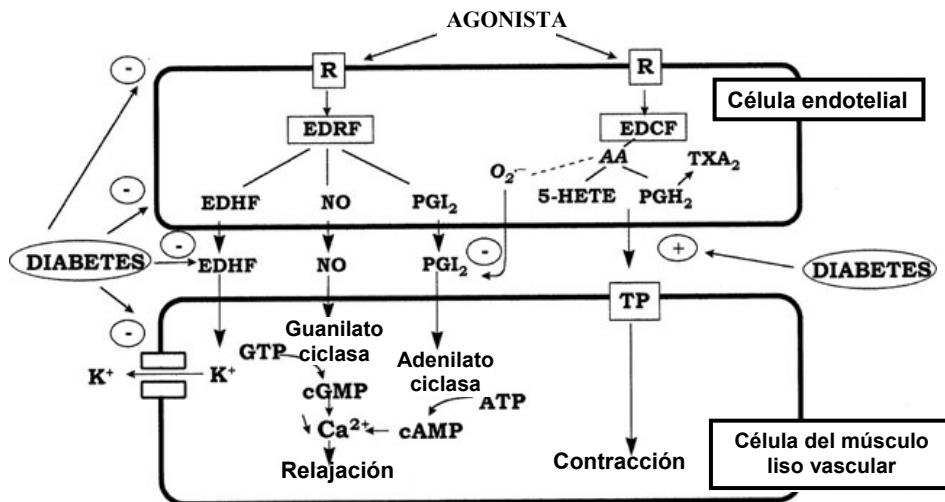


Figura 4. Mecanismos de disfunción endotelial en la diabetes. R, receptor; EDRF, factores relajantes derivados del endotelio; EDHF, factor hiperpolarizante dependiente de endotelio; PGI₂, prostaciclina; EDCF, factores vasoconstrictores derivados del endotelio; TXA₂, tromboxano A₂; PGH₂, prostaglandina H₂; 5-HETE, ácido 5-hidroxieicosatetraenoico; TP, receptor de prostanoides; O₂⁻, anión superóxido (modificado de De Vriese et al., 2000).

El deterioro vascular es una de las complicaciones características de la diabetes humana y experimental. Algunos de los cambios vasculares en la diabetes pueden estar relacionados con alteraciones en la función endotelial y en el tono vascular como consecuencia del desequilibrio entre vasoconstrictores y vasodilatadores.

La disfunción endotelial es un hecho temprano en la enfermedad vascular diabética. Los factores que contribuyen a la disfunción endotelial en los pacientes diabéticos aún se desconocen, pero datos derivados de los modelos experimentales han sugerido varias posibilidades (Pieper *et al.*, 1998; De Vriese *et al.*, 2000): (a) liberación concurrente de un factor vasoconstrictor derivado del endotelio mediado por la ciclooxigenasa; (b) incremento de la PKC; (c) utilización inapropiada de arginina para la síntesis de NO; (d) síntesis

anormal de NOS debido al cofactor inadecuado; (e) reducción de NO por productos de glucosilación avanzada y productos del estrés oxidativo; y (f) aumento de la actividad de la vía de los polioles.

Es probable que la glucosa y sus metabolitos medien sus efectos adversos a través de la alteración de varias vías de señal de transducción usadas por la célula vascular para llevar a cabo sus funciones y mantener la integridad celular. Se ha visto que la hiperglucemia o la diabetes inducida aumentan la producción del segundo mensajero lipídico, diacilglicerol (Inoguchi, 1994), lo cual produce la translocación de la membrana y activación de PKC en una gran variedad de cultivos de células vasculares al igual que en tejidos vasculares de pacientes y animales diabéticos. También se altera la expresión del caldesmón, activador del plasminógeno 1, fibronectina y otras proteínas de la membrana basal, todos ellos regulados por la activación de PKC (King *et al.*, 1996). La inhibición de PKC restaura la menor relajación dependiente de endotelio observada en la aorta de conejos expuestos a elevados niveles de glucosa (Creager *et al.*, 2003).

El grado de disfunción endotelial se correlaciona con la duración de la diabetes y el control metabólico. La alteración de la vasodilatación que caracteriza la diabetes puede revertirse con el tratamiento con insulina (Savage *et al.*, 1995).

4.2.2. Cambios en el papel del NO

La deficiencia cuantitativa o funcional de NO está relacionada con muchas enfermedades. Una insuficiencia de NO se caracteriza por un déficit neto de NO tisular, inactivación de NO aumentada, biodisponibilidad de NO reducida o catálisis de NOS alterada. En todos estos casos, una deficiencia de NO limitaría la señal de transducción dependiente de NO en detrimento de la función celular normal. No se conocen con exactitud los mecanismos por los cuales la diabetes afecta el balance entre la producción y la inactivación de NO. Se ha descrito una reducción en la producción y/o en la respuesta de las células del músculo liso (Sikorski *et al.*, 1993; Taylor *et al.*, 1995).

Parece probable que la exposición prolongada a la hiperglucemia pueda modular la actividad de la vía de la NOS en la diabetes. Se ha sugerido que la actividad NOS del músculo está alterada durante la progresión de la diabetes tipo 1. La hiperglucemia acelera la formación de productos finales de la glucosilación avanzada, incluyendo la hemoglobina glucosilada, la albúmina y otras proteínas plasmáticas. La biodisponibilidad del NO producido por el endotelio vascular depende de su inactivación por la hemoglobina y otras proteínas glucosiladas, así como por las especies reactivas del oxígeno. Algunos autores apuntan un destino anormal del NO en la diabetes tipo 1 debido a la formación de hemoglobina nitrosilada que reduce la biodisponibilidad de NO, alterando la regulación microvascular y la perfusión tisular (Milsom *et al.*, 2002).

La sensibilidad del músculo liso vascular puede estar disminuida incluso con un aporte adecuado de NO. En estudios vasculares en humanos se

han utilizado frecuentemente donantes de óxido nítrico o nitrovasodilatadores (ej. nitroprusiato sódico) como control para el estudio de la vasodilatación dependiente de endotelio mediada por distintas sustancias. Estos agentes actúan directamente sobre el músculo liso vascular y la vasodilatación resultante es independiente de endotelio. Hay evidencias que sugieren que la sensibilidad del músculo liso vascular al NO se encuentra reducida en la diabetes y que la hiperglucemia interfiere *in vitro* con la activación de la guanilato ciclasa inducida por NO. Apoyando este hecho, se ha observado una respuesta alterada a los donantes de NO *in vivo* en pacientes con diabetes tipo 1 (Vallance y Chan, 2001).

Por el contrario, otros estudios han sugerido una producción aumentada de NO (Choi *et al.*, 1999) o un aumento de la sensibilidad de las células del músculo liso vascular al NO en la diabetes (Yamada *et al.*, 1995).

4.2.3. Cambios en EDHF

Aunque en general se considera que el NO es el principal mediador de la relajación dependiente de endotelio, cada vez hay más evidencias de la existencia de otros factores relajantes endoteliales que también juegan un papel importante en el control vasomotor local. El EDHF es uno de los principales determinantes del tono vascular en los pequeños vasos de resistencia en condiciones fisiológicas y cada vez son más los estudios que sugieren que la alteración de su actividad puede contribuir de forma importante a las complicaciones microvasculares características de la diabetes (De Vriese

et al., 2000). La naturaleza exacta de esta alteración resulta controvertida, ya que se ha observado tanto un aumento como una disminución de la actividad del EDHF en la diabetes. La especie es un factor importante a tener en cuenta: en humanos (Angulo *et al.*, 2003) y en los modelos de rata diabética (Fukao *et al.* 1997; De Vriese *et al.*, 2000) la actividad del EDHF se encuentra reducida en los pequeños vasos de resistencia; sin embargo, los estudios realizados en ratón sugieren que la actividad del EDHF se encuentra aumentada en la diabetes (Fitzgerald *et al.*, 2005).

4.2.4. Cambios en el papel de prostanoïdes

La menor relajación dependiente de endotelio en la diabetes no siempre se debe a una reducción de la actividad o de la síntesis de NO o del EDHF, sino que puede estar relacionada también con cambios en la actividad de los prostanoïdes. La diabetes ocasiona una disminución de la producción de prostaciclina (Pieper, 1990). Otros estudios han mostrado un aumento de la liberación de prostanoïdes vasodilatadores para compensar una menor producción de NO (Gebremedhin *et al.*, 1988; Koltai *et al.*, 1997). El antagonismo de los receptores del tromboxano restaura la relajación de las arterias piales procedentes de ratas diabéticas (Mayhan *et al.*, 1991). Tratamientos previos con indometacina *in vitro* normalizan la menor relajación dependiente de endotelio en arterias cutáneas de mujeres con diabetes gestacional (Knock *et al.*, 1997).

La glucosa aumenta de forma selectiva la expresión de COX-2 sin afectar los niveles de COX-1, provocando un aumento de la liberación de tromboxano A₂ y una reducción de la liberación de prostaciclina. Esta sobreexpresión de COX-2 es dependiente de PKC y se traduce en una menor biodisponibilidad de NO y en un cambio en el equilibrio entre prostanoides vasodilatadores y vasoconstrictores en favor de estos últimos (Cosentino *et al.*, 2003). Altas concentraciones de glucosa no sólo modifican el perfil de prostanoides, dando lugar a la alteración del tono vasomotor, sino que también aumentan la liberación de ácido araquidónico en las células vasculares (Teschfariam *et al.*, 1990; Dai *et al.*, 1993; Cipolla, 1997). En los estadios tempranos de la nefropatía, las prostaglandinas vasodilatadoras como la prostaglandina E₂ y la prostaciclina están implicadas en las alteraciones hemodinámicas en humanos con diabetes tipo 1 (Esmatjes *et al.*, 1985; Gambardella *et al.*, 1988) así como en diabetes experimental (Moel *et al.*, 1987; Craven *et al.*, 1987). Además la inhibición de las acciones del tromboxano A₂ se ha asociado con una mejoría en la hemodinámica renal, en los cambios estructurales y en la albuminuria (Esmatjes *et al.*, 1990; Craven *et al.*, 1992; Uriu *et al.*, 1994).

4.2.5. Cambios a vasoconstrictores y a vasodilatadores

Las complicaciones cardiovasculares asociadas a la diabetes pueden estar relacionadas con una disminución de la relajación vascular o con una reactividad vascular aumentada a agentes vasoconstrictores.

La diabetes altera la relajación dependiente de endotelio en diferentes lechos vasculares de distintas especies (Sobrevia y Mann, 1997; Chan *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos son contradictorios. Así, por ejemplo, se ha observado una disminución de la respuesta relajante a la acetilcolina en la diabetes, tanto en humanos (McNally *et al.*, 1994) como en animales de experimentación (Fukao *et al.*, 1997; Miranda *et al.*, 2000a); sin embargo, otros estudios describen un aumento de la relajación producida por la acetilcolina (Karasu y Altan, 1993; Alabadí *et al.*, 2001) o respuestas inalteradas (Wakabayashi *et al.*, 1987; Mulhern y Docherty, 1989). Estas discrepancias en cuanto al efecto de la diabetes en la respuesta vascular frente a sustancias vasoactivas también se observa en sustancias vasoconstrictoras. Así, las respuestas vasoconstrictoras inducidas por noradrenalina están aumentadas de forma significativa en el lecho mesentérico (Yousif *et al.*, 2004), y arteria de la cola (Tam *et al.*, 1997) de ratas diabéticas y arteria femoral de perros diabéticos (Koltai *et al.*, 1990). Sin embargo, algunos autores citan una respuesta contráctil máxima reducida a la noradrenalina en pacientes diabéticos (McNally *et al.*, 1994) o un aumento del efecto máximo pero no de la sensibilidad de la aorta a la noradrenalina (Karasu y Altan, 1993).

Las razones de la heterogeneidad en la reactividad vascular a los agentes vasoactivos podrían ser, entre otras: (1) la utilización de distintas especies y modelos animales en los estudios realizados; (2) diferencias regionales existentes en los distintos lechos vasculares y la posibilidad de que la diabetes no afecte por igual a todos ellos; (3) diferencias en las

características clínicas de la población estudiada; y (4) tiempo de duración de la diabetes.

5. ENDOTELINA-1 Y DIABETES

Muchos de las sustancias que sufren cambios en la diabetes mellitus, como la insulina plasmática, la glucosa o los lípidos, regulan directamente la liberación de ET-1 por parte de las células endoteliales al igual que la expresión y la respuesta al péptido. Además, la exposición prolongada y excesiva de las células endoteliales, así como de las células del músculo liso vascular, a las alteraciones metabólicas de la diabetes, podría promover aterosclerosis y otros cambios morfológicos que indirectamente afectan la liberación y acción de la ET-1 (Hopfner y Gopalakrishnan, 1999).

La importancia de la ET-1 en la hipertrofia vascular asociada a la diabetes se describió inicialmente en estudios realizados en vasos mesentéricos de ratas tratadas con estreptozotocina donde se observó un aumento en la liberación del péptido (Takeda *et al.*, 1991). Otros estudios han demostrado un aumento de la expresión de ET-1 en la capa endotelial y adventicia así como expresión *de novo* de ET-1 en la túnica media de los vasos mesentéricos diabéticos. Estos cambios en la expresión de endotelina se asocian con hipertrofia, aumento de la matriz extracelular y de la expresión génica del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y TGF- β 1 (Gilbert *et al.*, 2000).

Las concentraciones plasmáticas de ET-1 se encuentran en un rango comprendido entre 0.3-5 pg/ml (Cardell *et al.*, 1994). La mayor parte de la ET-1 endógena se libera desde las células endoteliales hacia las células del músculo liso vascular. Incrementos o disminuciones de las concentraciones plasmáticas de ET-1 podrían ser el reflejo de una sobreproducción o infraproducción de ET-1 por parte de las células endoteliales. Alteraciones de los niveles plasmáticos de ET-1 también pueden ser consecuencia de cambios en el receptor o en el enzima encargado del aclaramiento del péptido (Hopfner y Gopalakrishnan, 1999).

La insulina estimula la secreción de ET-1 por parte de las células endoteliales y también aumenta su unión a los receptores (Sarman *et al.*, 1998). In vivo, los niveles basales de endotelina son mayores en obesos y/o en pacientes insulino-resistentes que en sujetos normales, indicando que la ET-1 puede estar implicada en complicaciones relacionadas con la diabetes como la microangiopatía (Kawamura *et al.*, 1992; Schneider *et al.*, 2002). La insulina puede afectar simultáneamente los niveles de endotelina de dos formas: bien directamente, haciendo que se incremente la producción de endotelina por parte de las células endoteliales; bien indirectamente, elevando la producción de óxido nítrico, siendo este uno de los principales reguladores de la endotelina (Kourembanas *et al.*, 1993). Como ya se ha comentado anteriormente, la ET-1 y el NO ejercen una retroalimentación negativa el uno sobre el otro. Por tanto, es posible que la ET-1 contribuya a la disfunción endotelial tanto directamente, a través de sus efectos vasoconstrictores, como indirectamente a través de su efecto inhibitor de la producción de NO (Mather *et al.*, 2004).

Diversos estudios *in vitro* han puesto de manifiesto una alteración de la reactividad vascular frente a la ET-1 en la diabetes, que podría estar en relación con cambios en la sensibilidad y densidad de los receptores ET_A y ET_B en los diferentes lechos vasculares estudiados (Masaki, 1995). De hecho, se ha sugerido una posible utilidad como adyuvante terapéutico de los diversos antagonistas de los receptores endotelinérgicos o inhibidores del enzima convertidor de la endotelina en la prevención y tratamiento de las complicaciones vasculares crónicas de la diabetes (Miyachi y Masaki, 1999; Chakrabarti *et al.*, 2000; Mather *et al.* 2002).

5.1. Afectación cerebrovascular

En la circulación cerebral, las grandes arterias, como la arteria basilar, realizan una contribución importante a la resistencia vascular cerebral total y son los principales determinantes de la presión microvascular total (Faraci y Heistad, 1990).

El vasoespasmo cerebral es la principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes con hemorragia subaracnoidea. Se caracteriza por una intensa y prolongada contracción del músculo liso de las principales arterias cerebrales acompañado de cambios estructurales y funcionales en las células endoteliales y del músculo liso. El vasoespasmo puede producirse por la acción de sustancias vasoactivas presentes en el espacio subaracnoideo, procedentes de la disolución del coágulo de sangre resultante o liberadas por la pared vascular. Hay evidencias de que la ET-1 está implicada en la patogénesis del

vasoespasmo que aparece tras hemorragia subaracnoidea (Miao *et al.*, 2002) por las siguientes razones: (a) los niveles de ET-1 en plasma y/o en el líquido cefalorraquídeo se encuentran elevados en pacientes con espasmo arterial cerebral (Kraus *et al.*, 1991; Miyauchi y Masaki, 1999); (b) se han detectado niveles incrementados de ET-1 en plasma, líquido cefalorraquídeo y arterias cerebrales; (c) la respuesta vasoconstrictora a la ET-1 está incrementada en arterias cerebrales; (d) antagonistas de los receptores ET-1, inhibidores del enzima convertidor de la endotelina y anticuerpos monoclonales contra ET-1 previenen o revierten el vasoespasmo cerebral (Barone *et al.*, 1995); y (e) la ET-1 es un potente vasoconstrictor de los vasos cerebrales y coronarios capaz de inducir hipoxia e isquemia. La hipoxia, por sí misma, propicia la síntesis de ET-1 *in vivo* en humanos (Blauw *et al.*, 1995) y aumenta la acción contráctil de la ET-1 (Douglas *et al.*, 1991). Recientemente se ha observado que se produce un cambio en la expresión de los receptores de ET-1 durante el proceso isquémico cerebral; hay un cambio del fenotipo relajante al contráctil de los receptores ET_B. Además, se produce una sobrerregulación de los receptores ET_B tras una isquemia cerebral focal experimental (Henriksson *et al.*, 2003).

5.2. Afectación renal

La ET-1 induce una contracción del lecho vascular renal con una potencia cinco veces mayor que la de la angiotensina II y diez veces mayor que la noradrenalina (Ruschitzka *et al.*, 1999). Por tanto, la ET-1 puede reducir el flujo sanguíneo renal y la tasa de filtración glomerular (Oyekan y McGiff, 1998) actuando como un potente vasoconstrictor renal: contrae los vasos renales y

las células mesangiales, inhibe la reabsorción de sales y agua, y aumenta la proliferación glomerular.

Aunque la ET-1 sólo participa de forma modesta en el mantenimiento del tono basal, concentraciones fisiopatológicas del péptido causan una vasoconstricción renal profunda (Sorensen *et al.*, 1994). Cada vez hay más evidencias de que la ET-1 juega un papel en la patogénesis de diversas enfermedades del riñón, como el daño renal que se produce tras una isquemia renal (Espinosa *et al.*, 1996), el secundario a la administración de agentes nefrotóxicos (Kon *et al.*, 1990; Heyman *et al.*, 1992), glomerulonefritis (Simonson *et al.*, 1992) y síndrome hepatorenal (Moore *et al.*, 1992) ya que los niveles plasmáticos de ET-1 se encuentran incrementados en pacientes con fallo renal agudo y los niveles de ET-1 renales se encuentran elevados tras lesión isquémica (Miyachi y Masaki, 1999).

La ET-1 también parece estar implicada en el daño renal que se produce en la diabetes. Se han observado alteraciones de la concentración de péptido en orina, y del mRNA y del nivel de receptores endotelinérgicos en modelos animales de diabetes (Hopfner y Gopalakrishnan, 1999). Además, en las fases iniciales de la diabetes en humanos se ha observado una disminución de la excreción urinaria de ET-1, lo cual sugiere la posible participación de la ET-1 en la fase precoz de la neuropatía diabética (Lam *et al.*, 1995). Una acción excesiva de la ET-1 sobre el glomérulo puede causar acumulación de la matriz, proteinuria, y reducción de la tasa de filtración glomerular, existiendo numerosas evidencias *in vivo* de que antagonistas de los receptores de la

endotelina mejoran el daño glomerular en modelos animales de neuropatía diabética (Sorokin y Kohan, 2003).

OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es analizar la influencia de la diabetes mellitus en la reactividad de las arterias basilar, carótida y renal de conejo a un potente vasoconstrictor, la ET-1, que participa en la regulación de la circulación en condiciones fisiológicas y que podría jugar un papel importante en diversas situaciones fisiopatológicas, como la vasculopatía diabética.

A continuación se detallan los objetivos concretos que se pretenden alcanzar con el presente trabajo:

1. Estudiar la respuesta de las arterias basilar, carótida y renal de conejo a la ET-1, y analizar los posibles cambios inducidos por la diabetes experimental en dichas respuestas.
2. Estudiar los receptores endotelinérgicos específicos que median la respuesta de las arterias basilar, carótida y renal de conejo a la endotelina-1, y analizar los posibles cambios inducidos por la diabetes experimental en la participación de dichos receptores.
3. Estudiar el papel modulador del endotelio, concretamente del NO, y de los prostanoides derivados de COX-1 y COX-2 en la respuesta de las arterias basilar, carótida y renal de conejo a la ET-1, y analizar los posibles cambios inducidos por la diabetes experimental en dichos mecanismos moduladores.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización del presente estudio se utilizaron 68 conejos blancos de Nueva Zelanda, machos, aleatoriamente divididos en dos grupos experimentales: 38 formaron parte del grupo control y no se les sometió a ninguna manipulación experimental y a los 30 restantes se les indujo una diabetes experimental de tipo químico con aloxano. Las condiciones de estabulación y los procedimientos experimentales utilizados son los estipulados en la directiva de la Unión Europea para el uso de animales con propósitos científicos (86/EEC, artículo 5, Apéndice II), recogida por la Legislación Española en el Real Decreto 223/ 1998.

1. INDUCCIÓN DE LA DIABETES EXPERIMENTAL

Para la inducción experimental de la diabetes los conejos (2.9-3.6 Kg) se sedan mediante una inyección intramuscular de 40 mg de Ketamina (Ketolar®). A continuación, se induce la diabetes mediante la administración i.v. (vena marginal de la oreja) de una dosis única de 100 mg/kg de aloxano, un tóxico selectivo de las células beta pancreáticas. Debido a la destrucción de las células beta pancreáticas provocada por el aloxano, en las primeras horas tras la inyección se produce una liberación masiva de insulina y un estado de hipoglucemia. Con el fin de evitar los graves problemas consecuentes a la hipoglucemia, tras el aloxano se les administran 10 ml de solución glucosada al 5% por vía subcutánea, y se añade durante las primeras 18-24 horas glucosa al 10% en el agua de bebida. Posteriormente, la solución glucosada se sustituye por agua de bebida normal, permaneciendo los animales estabulados

durante seis semanas. El segundo grupo de conejos (2.5-3.7 Kg) se mantiene en las mismas condiciones durante el mismo periodo de tiempo para servir como conejos control.

Durante su estabulación, tanto los conejos control como los diabéticos, se sometieron a controles de peso y de glucemia semanales. La medida de la glucemia se realiza mediante un medidor de glucosa en sangre (Glucometer elite®), basado en una tecnología de sensor por electrodo. La acción capilar en el extremo de la tira reactiva aspira una pequeña cantidad de sangre a la cámara de reacción, visualizándose los resultados en 60 segundos.

2. REGISTRO DE LA TENSIÓN ISOMÉTRICA DESARROLLADA POR LOS SEGMENTOS ARTERIALES

Seis semanas después de la inducción de la diabetes los conejos control y diabéticos se anestesian con una inyección intravenosa de pentotal sódico al 2% (tiopental) y se sacrifican mediante una inyección, en la vena marginal de la oreja, de una solución de 10 mEq de KCl (0.5 mL/Kg). La muerte se produce por parada cardíaca como consecuencia de la despolarización miocárdica.

2.1. Obtención y montaje de los segmentos arteriales

Para aislar la arteria basilar, el cráneo se expone mediante una incisión circular a nivel de la base de los conductos auditivos, realizándose a continuación una craneotomía siguiendo esa incisión. Descubierta el encéfalo, se retira la duramadre y el cerebro se separa del resto del eje nervioso seccionando las vías aferentes y eferentes, nerviosas y hemáticas. Para aislar la arteria carótida común, se sitúa el animal en posición de decúbito supino y se practica una incisión longitudinal en la región anterior del cuello. Se extirpan ambas arterias, de unos 3 cm de longitud, mediante una disección roma. En la misma posición, para aislar la arteria renal se le practica una incisión longitudinal amplia en el abdomen, se apartan las vísceras abdominales y se diseccionan y extraen las arterias renales.

Rápidamente las arterias obtenidas se introducen en una solución salina fisiológica fría (4° C). A continuación, con la ayuda de una lupa binocular (Wild M3B Heerbrugg) y una fuente de luz fría (Euromex EK-1) para evitar deteriorar los tejidos, se eliminan los restos de sangre del interior de la arteria y se cortan en segmentos de aproximadamente 4 mm de longitud en el caso de arterias renales y carótidas y de 3 mm en el caso de las arterias basilares.

Para el registro de la tensión isométrica desarrollada por los segmentos arteriales, se introducen dos alambres rígidos de acero inoxidable (207 μm en el caso de arteria renal y carótida y 89 μm para arteria basilar) con forma de "L" a través de la luz arterial. Uno de los alambres

queda unido a un soporte fijo, de tal forma que la arteria queda en posición horizontal. El otro se conecta a un transductor de tensión isométrica, de forma que puede traccionar verticalmente, en sentido perpendicular al eje mayor del segmento arterial, en respuesta a los cambios de tensión que se producen en la pared del vaso. A su vez, el transductor está acoplado a un amplificador de señal y a un sistema de registro.

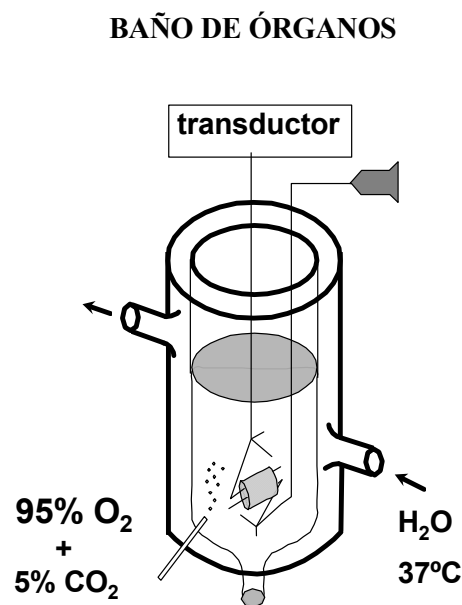


Figura 5. Disposición de un segmento cilíndrico de arteria en el baño de órganos.

Una vez montado, cada segmento vascular se aloja en un baño de órganos que contiene 5 ml de una solución nutritiva de Ringer-Locke que se encuentra en continuo burbujeo con gas carbógeno (95% de O₂ y 5% de CO₂), lo que le confiere un pH de 7.3-7.4. Un circuito de agua caliente que rodea las copas de los baños, permite mantener las soluciones con los tejidos vasculares

a una temperatura constante de 37 ± 0.5 ° C. Se dispone de una reserva de la solución nutritiva, igualmente atemperada, que se utiliza para renovar el medio en que se hallan inmersos los segmentos arteriales.

Una vez situados los segmentos arteriales en el baño de órganos, previa calibración del aparato, se les aplica una tensión basal (0.5 g en el caso de arteria basilar y 2 g en el caso de arteria carótida y de renal) mediante la rotación del tornillo micrométrico. La tendencia inmediata de los segmentos es la de relajación, por lo que esta tensión debe reajustarse periódicamente hasta que se alcance la tensión basal (60-90 minutos). Durante este periodo, la solución nutritiva se renueva cada 20 minutos. Alcanzada la tensión basal, se analiza la reactividad de los segmentos sometiéndolos a un estímulo despolarizante como es una solución de KCl 50 mM.

2.2. Técnicas de registro y medición

El sistema de medida y registro consta, para cada uno de los segmentos arteriales, de un transductor de tensión isométrica (Panlab Mod. UF-1 / Letica TRI 201), un tornillo micrométrico adaptado al transductor y capaz de desplazar el conjunto transductor-alambre, un amplificador de tensión (Amplifier Panlab 40154/ Letica ISO 506) y finalmente de un sistema de recogida de datos que puede ser o bien un polígrafo (Letica Poligraf 4006), o bien un sistema informatizado (Powerlab / 8SP, programa Chart v 4.1.2).

Los cambios de tensión isométrica producidos por los diferentes estímulos aplicados sobre los segmentos arteriales se cuantifican midiendo, a partir del trazado basal o del tono activo, el desplazamiento producido hasta el efecto máximo desarrollado para cada dosis. Estos cambios de tensión isométrica se multiplican por un factor de calibración determinado de antemano. Ello permite la conversión de unidades de longitud (mm) en unidades de tensión (mg). Los valores obtenidos pueden expresarse en términos absolutos (mg), o bien relativos, refiriéndolos porcentualmente respecto del efecto máximo producido por un estímulo aplicado con anterioridad (KCl 50 mM), o respecto del tono activo (UTP 10^{-4} M).

2.3. Protocolo experimental

Se analizó la respuesta de las arterias basílicas, carótidas y renales de conejos, tanto del grupo control como el de diabéticos, a un potente vasoconstrictor, la ET-1. Para ello, se obtuvieron curvas concentración-respuesta de ET-1 (10^{-12} - 3×10^{-8} M), mediante adición al baño de órganos de dosis acumulativas. Cada dosis se añadió cuando la inmediatamente anterior había desarrollado su efecto máximo, siendo su concentración en el baño la suma de dicha dosis y las administradas con antelación a ella. Estas curvas concentración-respuesta se realizaron en situación control y en cada una de las siguientes situaciones experimentales:

1. Para analizar el efecto del endotelio en dicha respuesta, se obtuvieron curvas concentración-respuesta de ET-1 en segmentos desprovistos de

endotelio. La eliminación del endotelio se realizó de forma mecánica, siguiendo el método de Furchgott y Zawadzki (1980). La ausencia de endotelio se comprobó funcionalmente verificando la ausencia de respuesta relajante a la acetilcolina.

2. Con el fin de comprobar la posible participación del NO en la respuesta de los tres lechos vasculares a ET-1, se obtuvieron curvas concentración-respuesta de ET-1 tras incubar 20 min los segmentos arteriales con un inhibidor de la NO sintasa (NOS), N^G-nitro- L-arginina (L-NOArg, 10⁻⁴ M).
3. Para detectar cambios en la sensibilidad del músculo liso al NO se realizaron curvas de nitroprusiato sódico (10⁻⁹-10⁻⁴ M), un donante de NO, en arterias basílicas precontraídas con UTP (10⁻⁴ M).
4. Para valorar la participación de metabolitos derivados del ácido araquidónico en la modulación de la respuesta arterial a ET-1, se realizaron curvas concentración-respuesta de ET-1 tras incubar 20 minutos los segmentos arteriales con indometacina (10⁻⁵ M), un inhibidor de ambas isoformas de la ciclooxigenasa. En el caso de arterias renales también se utilizó un inhibidor de la isoforma COX-2, nimesulide (10⁻⁵ M).
5. Además, en arteria carótida y renal también se obtuvo la curva concentración-respuesta de ET-1 en presencia de ambos inhibidores (L-NOArg 10⁻⁴ M e indometacina 10⁻⁵ M) y en presencia de furegrelate (10⁻⁵ M), un inhibidor de la síntesis de tromboxano A₂.
6. Para comprobar el origen endotelial de los derivados del ácido araquidónico, se realizaron curvas concentración-respuesta de ET-1,

previa incubación con indometacina (10^{-5} M), en arterias carótidas y renales legradas.

7. Con el fin de determinar la participación de receptores específicos ET_A , se realizaron curvas concentración-respuesta de ET-1 en presencia de un antagonista selectivo de estos receptores, el BQ-123 (10^{-6} M). En arterias renales se obtuvieron además curvas concentración-respuesta de ET-1 en presencia de BQ-123 (10^{-6} M) y de indometacina (10^{-5} M) simultáneamente.
8. Para establecer la participación de receptores específicos ET_B , se realizaron curvas concentración-respuesta de ET-1 en presencia de un antagonista selectivo de estos receptores, el BQ-778 (10^{-6} M).
9. En arterias carótidas y renales legradas se obtuvieron curvas concentración-respuesta de ET-1 en presencia de BQ-778 (10^{-6} M); además, en el caso de las arterias renales legradas se obtuvieron también curvas concentración-respuesta de ET-1 en presencia de BQ-778 (10^{-6} M) y de indometacina (10^{-5} M) simultáneamente.

Todas las concentraciones se expresan como la concentración molar final en el baño de órganos.

2.4. Análisis de resultados

Las comparaciones de peso corporal y glucemia entre los animales control y los diabéticos se realizan mediante el test de la t de Student.

La respuesta contráctil de los segmentos arteriales a la ET-1 se expresa porcentualmente respecto a la contracción máxima producida por el KCl 50 mM. Los valores de relajación se expresan como porcentaje del tono activo inducido por UTP (10^{-4} M).

Cada curva concentración-respuesta se repite en segmentos arteriales procedentes de animales diferentes. Los resultados se agrupan posteriormente según el tipo de experimento y, a partir de los valores obtenidos para cada una de las concentraciones, se calcula la media aritmética, desviación típica y error estándar de la media (EEM). Con ello se obtienen las curvas concentración-respuesta medias para cada uno de los lechos arteriales y de las situaciones experimentales. Para cada curva concentración-respuesta media se calcula el efecto máximo (E_{max}) y la concentración eficaz 50 (CE_{50}), esto es, aquella concentración de ET-1 que produce la mitad del efecto máximo (E_{max}). Para obtener este dato se calcula la mitad del E_{max} y las concentraciones que lo acotan. A continuación, se halla la concentración que corresponde a la mitad del efecto máximo mediante una proporción entre el efecto y el logaritmo de la concentración. Para calcular el valor medio de la CE_{50} y su intervalo de confianza al 95% se calcula la media y el intervalo de confianza de los valores pD_2 ($-\log CE_{50}$), ya que dichos valores se ajustan a una distribución normal. La posterior conversión, aplicando antilogaritmos, proporciona la media geométrica y los intervalos de confianza al 95% de la CE_{50} . Las comparaciones estadísticas de los valores obtenidos de E_{max} y pD_2 entre las arterias control y diabéticas que recibieron el mismo tratamiento experimental se realizaron mediante el test de la t de Student.

El análisis estadístico para determinar las posibles diferencias entre los valores de E_{\max} y pD_2 obtenidos para las distintas situaciones experimentales planteadas dentro de cada grupo de animales se realiza mediante un análisis de la varianza (ANOVA), seguido del test de Student-Newman-Keuls. Las diferencias se consideran significativas cuando $P < 0.05$.

3. FÁRMACOS Y SOLUCIONES

El Aloxano, ET-1, indometacina, BQ-123, BQ-788, nimesulide, furegrelate y UTP se compraron a Sigma; L-NOArg a Peptide Institute; nitroprusiato sódico a RBI. El aloxano se disuelve en solución salina. La ET-1 se disuelve en ácido acético acuoso y se diluye en una mezcla de solución salina-tampón fosfato (NaCl 150 mM + NaH_2PO_4 10 mM) y seroalbúmina bovina al 0.05%. Furegrelate, BQ-123, BQ-788, UTP y L-NOArg se disuelven en agua bidestilada; la solución de L-NOArg requirió ultrasonidos para disolverse por completo. La indometacina y el nimesulide se disuelven en etanol y diluyen en solución salina. El nitroprusiato sódico se disuelve y diluye en solución salina y debido a su fotosensibilidad se mantiene protegido en todo momento de la luz. La composición de la solución nutritiva de Ringer-Locke es (en mM): NaCl, 120; KCl, 5.4; CaCl_2 , 2.2; MgCl_2 , 1.0, NaHCO_3 , 25 y glucosa, 5.6. La solución de KCl despolarizante se prepara del mismo modo que la solución de Ringer-Locke, reemplazando el NaCl por una cantidad equimolar de KCl.

RESULTADOS

1. INDUCCIÓN DE LA DIABETES

Tras la administración de aloxano los conejos diabéticos mostraron un marcado incremento de la glucosa plasmática y una menor ganancia en el peso corporal en comparación a los conejos control. En la Tabla 1 se muestran los valores medios de peso y glucemia para el grupo de conejos control y el grupo de conejos diabéticos.

TABLA 1. Valores de peso y glucemia de los dos grupos de animales

	Peso corporal (Kg)	Glucemia (mM)	n
Conejos control			
Valor inicial	2.50 ± 0.09	5.8 ± 0.2	38
6 semanas después	3.58 ± 0.08	5.9 ± 0.2	38
Conejos diabéticos			
Valor inicial	2.70 ± 0.07	5.9 ± 0.2	30
6 semanas después	3.10 ± 0.06 *	21.1 ± 0.9 *	30

El valor inicial se obtuvo inmediatamente antes de la inducción de la diabetes en el grupo de conejos diabéticos. El valor final se obtuvo en los dos grupos justo antes de sacrificar el animal. Los valores representan la media ± EEM para "n" conejos.

* Significativamente diferente respecto del grupo control

2. INFLUENCIA DE LA DIABETES SOBRE LA RESPUESTA DE LA ARTERIA BASILAR DE CONEJO A LA ENDOTELINA-1

2.1. Efecto de la ET-1

La adición al baño de órganos de dosis acumulativas de ET-1 (10^{-12} - 3×10^{-8} M) produjo una contracción, de magnitud dependiente de la concentración, de los segmentos de la arteria basilar procedentes tanto de conejo control como de diabético (Figura 6). En arterias de animal diabético, el E_{\max} de las curvas concentración-respuesta a la ET-1 fue significativamente más elevado que el obtenido en los segmentos arteriales procedentes de animal control, pero no se observaron diferencias significativas entre los valores de CE_{50} (Figura 6, Tabla 2).

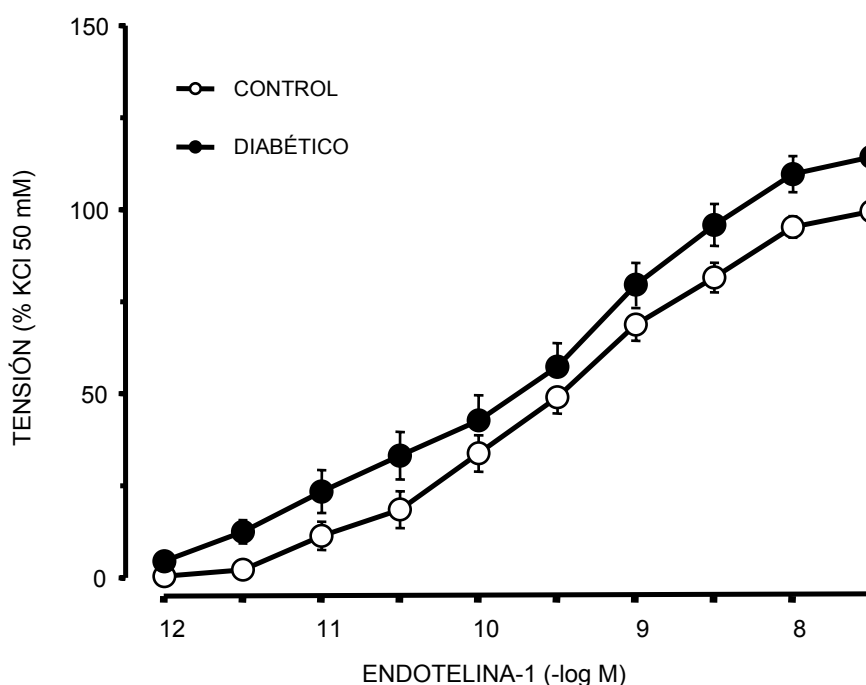


Figura 6. Curva concentración-respuesta de ET-1 en segmentos de arteria basilar procedente de conejo control y de conejo diabético. Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima desarrollada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media \pm EEM.

2.2. Efecto de la ET-1 tras la eliminación del endotelio

La eliminación del endotelio desplazó hacia la izquierda (CE_{50} significativamente menor) la curva concentración-respuesta a la ET-1, tanto en arterias procedentes de conejos control como en las procedentes de animales diabéticos, y también produjo un incremento significativo del E_{max} de las curvas concentración-respuesta a la ET-1 obtenidas en arterias procedentes de animal control (Figura 7, Tabla 2). Asimismo, en arterias sin endotelio procedentes de animal diabético, los valores de CE_{50} de la curva concentración repuesta a la ET-1 fueron significativamente inferiores a los obtenidos en segmentos arteriales sin endotelio procedentes de animal control (Tabla 2).

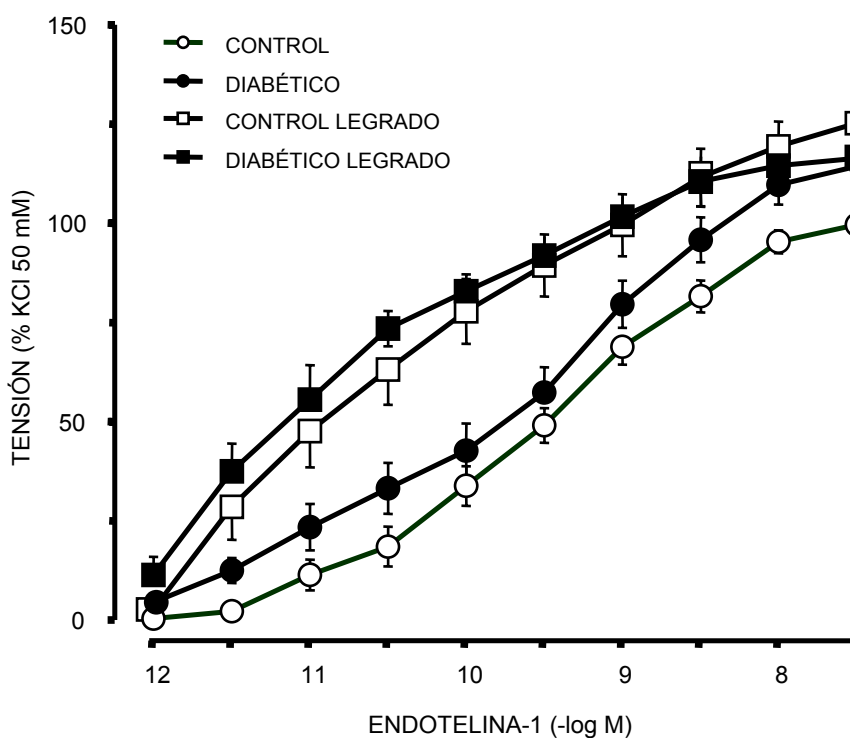


Figura 7. Curva concentración-respuesta de ET-1 en segmentos de arteria basilar procedente de conejo control y de conejo diabético, en situación control y en segmentos sin endotelio (legrado). Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima desarrollada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media \pm EEM.

2.3. Efecto de la ET-1 tras la incubación con L-NOArg

En arterias basilares procedentes de animal control, la incubación con L-NOArg (10^{-4} M) produjo un aumento significativo de la contracción máxima producida por la ET-1, sin modificar significativamente los valores de CE_{50} (Figura 8, Tabla 2). Sin embargo, la incubación de los segmentos arteriales procedentes de animales diabéticos con el inhibidor del enzima NO sintasa, no modificó de forma significativa el E_{max} pero sí produjo una disminución significativa del valor de CE_{50} de las curvas concentración-respuesta a la ET-1 (Figura 8, Tabla 2).

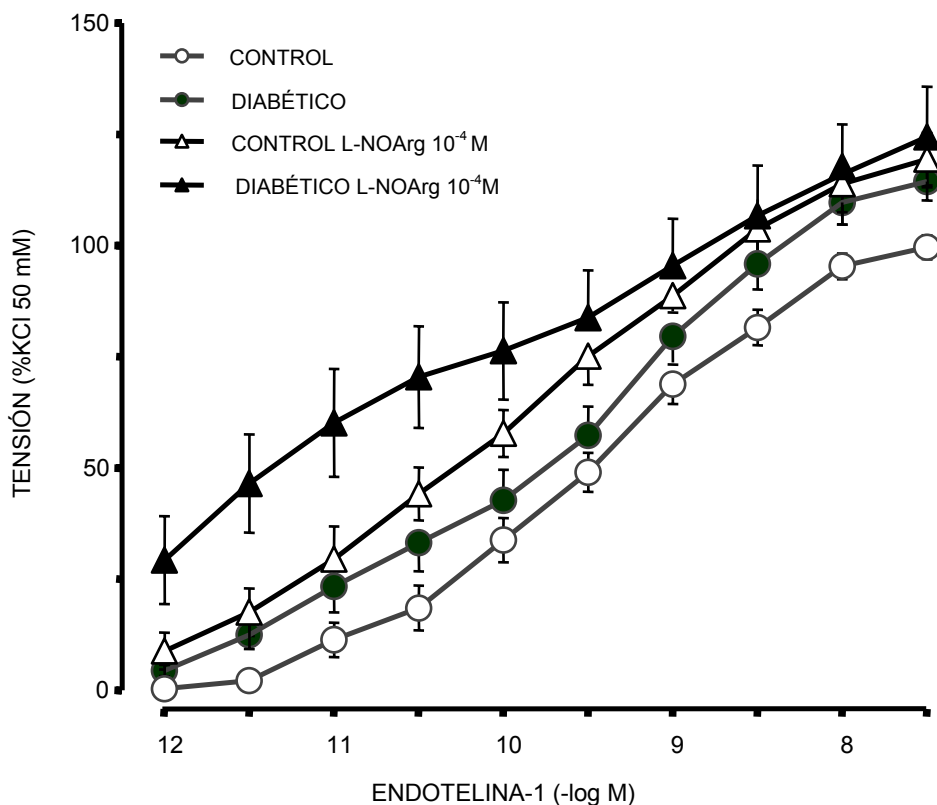


Figura 8. Curva concentración-respuesta de ET-1 en segmentos de arteria basilar procedente de conejo control y de conejo diabético, en situación control y tras la incubación con NG-nitro-L-arginina (L-NOArg 10^{-4} M). Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima desarrollada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media \pm EEM.

Además, en presencia de L-NOArg, la CE_{50} de la curva concentración-respuesta a la ET-1 fue significativamente menor en los segmentos arteriales procedentes de conejos diabéticos en comparación con los valores obtenidos en arterias procedentes de conejo control (Tabla 2).

2.4. Efecto de la ET-1 tras la incubación con indometacina

La incubación de las arterias basilares procedentes tanto de animales control como de animales diabéticos con indometacina (10^{-5} M) no modificó de forma significativa la respuesta contráctil a la ET-1 (Figura 9, Tabla 2).

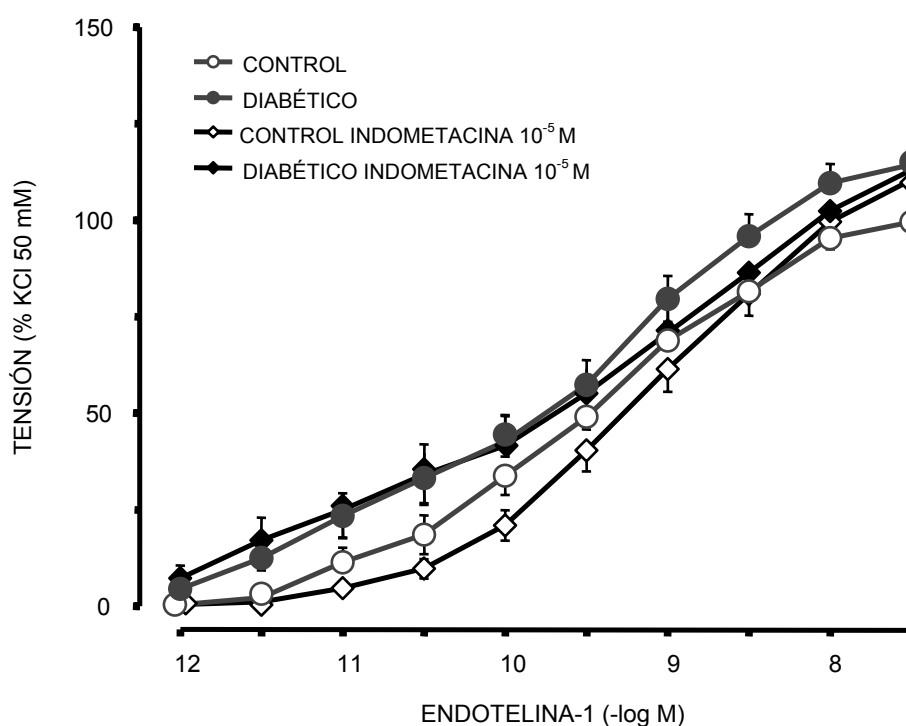


Figura 9. Curva concentración-respuesta de ET-1 en segmentos de arteria basilar procedente de conejo control y de conejo diabético, tras la incubación con indometacina 10^{-5} M. Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima desarrollada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media \pm EEM.

2.5. Efecto de la ET-1 tras la incubación con BQ-123

La incubación de las arterias basilares procedentes tanto de conejos control como de diabéticos con un antagonista de los receptores ET_A, el BQ-123 (10⁻⁶ M), produjo un aumento significativo (desplazamiento hacia la derecha) del valor de CE₅₀ de la curva concentración-respuesta a la ET-1, sin modificar el valor de E_{max} (Figura 10, Tabla 2).

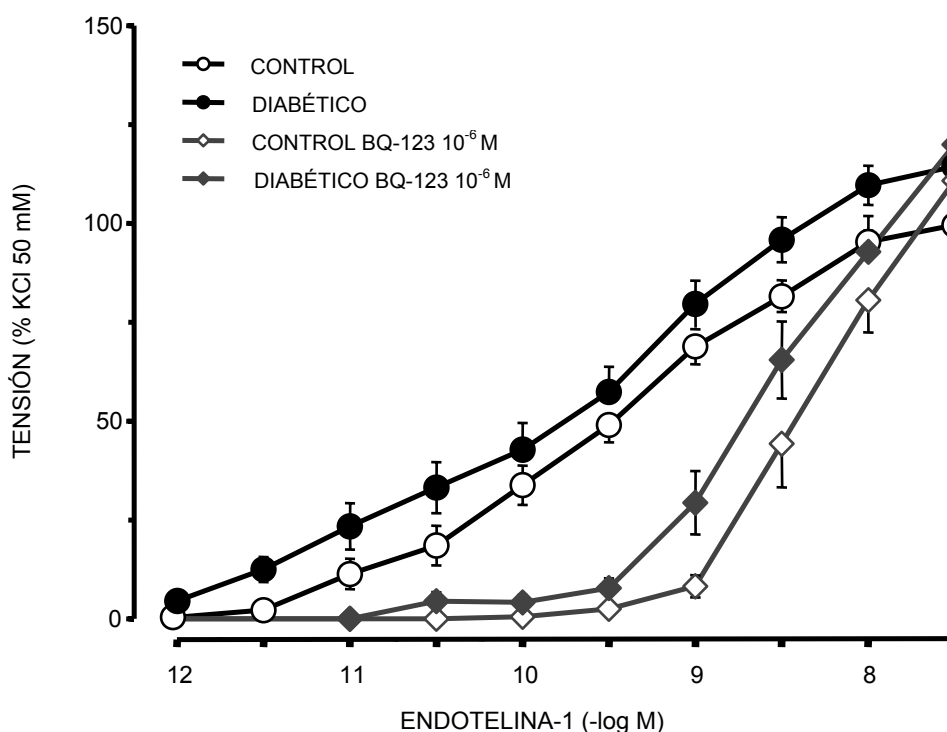


Figura 10. Curva concentración-respuesta de ET-1 en segmentos de arteria basilar procedente de conejo control y de conejo diabético, tras la incubación con un antagonista de los receptores ET_A, el BQ-123 (10⁻⁶ M). Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima desarrollada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media ± EEM.

TABLA 2

Efecto máximo (E_{max}) y CE_{50} de las curvas concentración-respuesta de ET-1 en arteria basilar de conejo.

	E_{max}	CE_{50} (M)	n
Conejo Control			
Control	100 ± 3	2.3(1.5-3.5) x 10 ⁻¹⁰	17
Legrado	125 ± 5 ^b	2.6 (1.7-4.2) x 10 ^{-11^b}	11
L-NOArg 10 ⁻⁴ M	119 ± 6 ^b	1.1 (0.8-1.7) x 10 ⁻¹⁰	12
Indometacina 10 ⁻⁵ M	110 ± 6	6.8 (5.6-8.1) x 10 ⁻¹⁰	12
BQ-123 10 ⁻⁶ M	111 ± 5	4.0 (3.1-5.1) x 10 ^{-9^b}	11
BQ-788 10 ⁻⁶ M	126 ± 6 ^b	2.3 (1.4-3.8) x 10 ⁻¹⁰	11
Legrado BQ-788 10 ⁻⁶ M	125 ± 10 ^b	1.4 (1.1-1.7) x 10 ^{-10^c}	9
Conejo Diabético			
Control	114 ± 4 ^a	1.4 (0.9-2.2) x 10 ⁻¹⁰	18
Legrado	116 ± 7	8.1 (6.2-10.7) x 10 ^{-12^{a,b}}	10
L-NOArg 10 ⁻⁴ M	124 ± 11	1.5 (0.8-2.9) x 10 ^{-11^{a, b}}	10
Indometacina 10 ⁻⁵ M	113 ± 5	2.0 (1.3-3.3) x 10 ^{-10^a}	13
BQ-123 10 ⁻⁶ M	120 ± 6	3.2 (2.4-4.1) x 10 ^{-9^b}	11
BQ-788 10 ⁻⁶ M	123 ± 7	1.1 (0.8-1.7) x 10 ^{-9^{a, b}}	10
Legrado BQ-788 10 ⁻⁶ M	125 ± 5	4.1 (3.4-4.9) x 10 ^{-10^{a, c}}	9

Los valores E_{max} se expresan como porcentaje de la despolarización previa con KCl 50 mM y representan media ± EEM y los valores de CE_{50} representan la media y los intervalos de confianza; n: número de segmentos arteriales.

^aSignificativamente diferente respecto de su correspondiente valor en conejo control, $P < 0.05$

^bSignificativamente diferente respecto de su correspondiente control, $P < 0.05$

^cSignificativamente diferente respecto de su correspondiente legrado, $P < 0.05$

2.6. Efecto de la ET-1 tras la incubación con BQ-788

La incubación de los segmentos arteriales de conejo control con BQ-788 (10^{-6} M) produjo un aumento significativo del valor de E_{max} de la curva concentración-respuesta a la ET-1, sin modificar el valor de CE_{50} (Figura 11, Tabla 2). Sin embargo, en arterias basilares procedentes de conejos diabéticos la incubación con BQ-788 no modificó de forma significativa el valor de E_{max} , pero produjo un incremento significativo (desplazó hacia la derecha) del valor de CE_{50} de la curva concentración-respuesta a la ET-1 (Figura 11, Tabla 2).

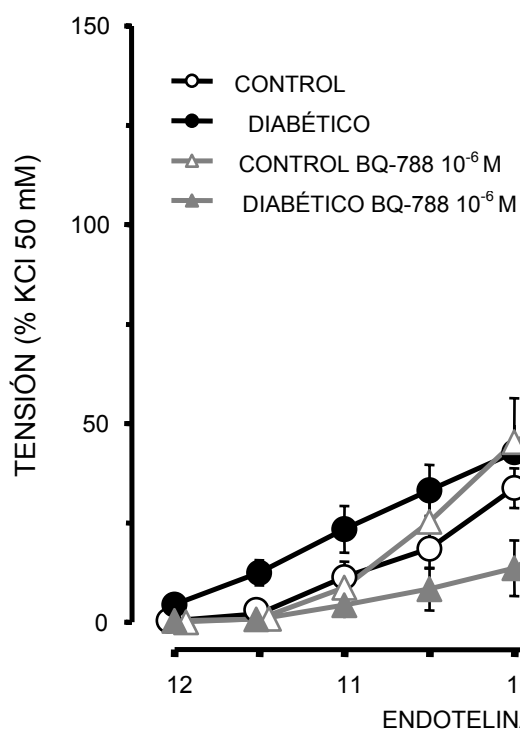


Figura 11. Curva concentración-respuesta de ET-1 en segmentos de arteria basilar procedente de conejo control y de conejo diabético, en situación control y tras la incubación con un antagonista de los receptores ET_B , el BQ-788 (10^{-6} M). Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima desarrollada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media \pm EEM.

Al comparar la contracción inducida por la ET-1 en los segmentos arteriales incubados con BQ-788, el valor de CE_{50} de la curva concentración-respuesta a la ET-1 fue significativamente mayor en arterias procedentes de conejos diabéticos respecto al obtenido en arterias procedentes de conejos control (Tabla 2).

La incubación de arterias basilares sin endotelio con BQ-788 (10^{-6} M) produjo un incremento significativo (desplazó hacia la derecha) del valor de CE_{50} de la curva concentración-respuesta a la ET-1 respecto a la correspondiente curva obtenida en arterias legradas en ausencia de BQ-788 en ambos grupos de animales (Figura 12, Tabla 2).

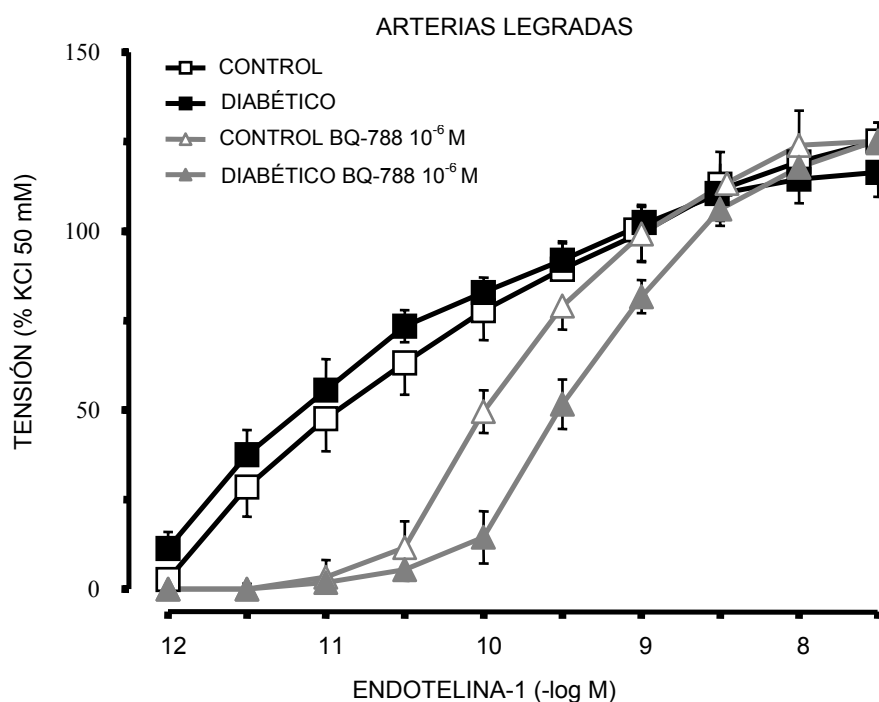


Figura 12. Curva concentración-respuesta de ET-1 en segmentos sin endotelio de arteria basilar procedente de conejo control y de conejo diabético, en situación control y tras la incubación con un antagonista de los receptores ET_B , el BQ-788 (10^{-6} M). Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima desarrollada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media \pm EEM.

El valor de CE_{50} de la curva concentración-respuesta obtenido en arterias legradas incubadas con BQ-788 (10^{-6} M) procedentes de conejos diabéticos fue significativamente más elevado que el obtenido en las correspondientes arterias procedentes de conejos control (Tabla 2).

2.7. Efecto del nitroprusiato sódico

La adición al baño de órganos de concentraciones crecientes de nitroprusiato sódico (10^{-9} - 10^{-4} M) produjo una relajación, de magnitud dependiente de la concentración, de los segmentos de arteria basilar, procedentes tanto de conejo control como de diabético, previamente contraídos con UTP (10^{-4} M) (Figura 13).

En los segmentos arteriales procedentes del grupo control, el valor de CE_{50} fue de $1.6 (1.4-1.9) \times 10^{-7}$ M y la relajación alcanzó un E_{max} de $99 \pm 1\%$ del tono activo ($n=11$). En arterias procedentes de conejos diabéticos, el valor de CE_{50} de las curvas de nitroprusiato sódico fue de $5.0 (4.2-6.0) \times 10^{-7}$ M y el valor de E_{max} fue de $86 \pm 3\%$ del tono activo ($n=8$). Comparando la relajación inducida por el nitroprusiato sódico en arterias basilares se observó que en conejos diabéticos el valor de CE_{50} fue significativamente más elevado y el valor de E_{max} fue significativamente menor a los obtenidos en arterias procedentes de conejos control.

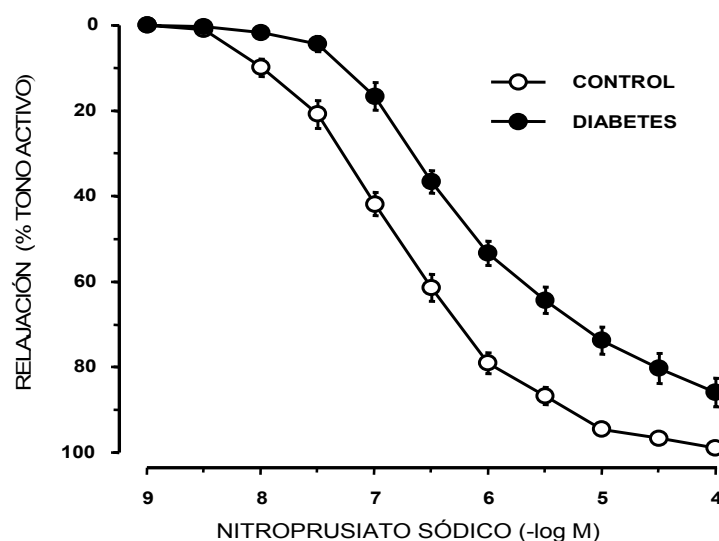


Figura 13. Curva concentración-respuesta de nitroprusiato sódico en segmentos de arteria basilar procedente de conejo control y de conejo diabético. Los datos se expresan como porcentaje del tono activo inducido por UTP 10^{-4} M y representan la media \pm EEM.

El tono activo inducido por UTP (10^{-4} M) en arteria basilar de conejo control no fue significativamente diferente del obtenido en arteria basilar de conejo diabético.

3. INFLUENCIA DE LA DIABETES SOBRE LA RESPUESTA DE LA ARTERIA CARÓTIDA DE CONEJO A LA ET-1

3.1. Efecto de la ET-1

La adición al baño de órganos de concentraciones crecientes de ET-1 (10^{-12} - 3×10^{-8} M) produjo una contracción, de magnitud dependiente de concentración, de los segmentos de arteria carótida de conejo, tanto en los animales control como en los diabéticos (Figura 14).

En los segmentos arteriales procedentes del grupo control, la contracción alcanzó un E_{max} de 3635 ± 188 mg (108 ± 4 % respecto a la despolarización previa con KCl 50 mM), siendo el valor de la CE_{50} de 6.5 ($5.4 - 7.8$) $\times 10^{-10}$ M. En las arterias procedentes de conejo diabético el E_{max} de la curva concentración-respuesta fue significativamente mayor que en las de conejo control, no encontrándose diferencias significativas entre los valores de CE_{50} (Tabla 3).

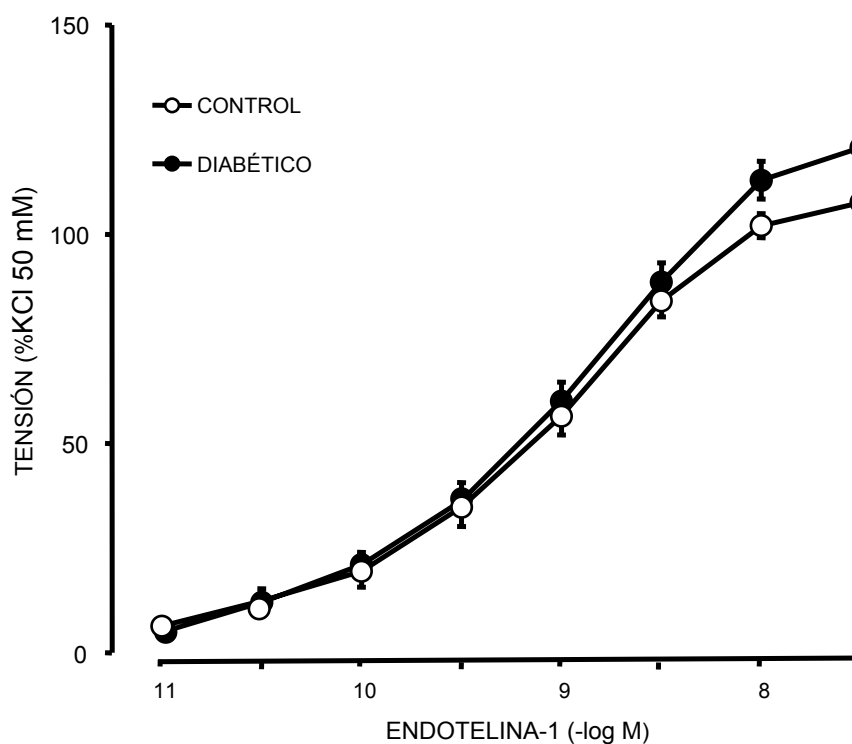


Figura 14. Curva concentración-respuesta de ET-1 en segmentos de arteria carótida procedente de conejo control y de conejo diabético. Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima desarrollada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media \pm EEM

3.2. Efecto de la ET-1 tras la eliminación del endotelio

En los segmentos arteriales sin endotelio, procedentes de los dos grupos experimentales de animales, la ET-1 (10^{-12} - 3×10^{-8} M) produjo una respuesta contráctil de magnitud dependiente de la concentración (Figura 15). En arterias procedentes de conejo control, la eliminación mecánica del endotelio incrementó de forma significativa la contracción máxima inducida por la ET-1, sin producir cambios significativos en los valores de CE_{50} (Tabla 3). En arterias procedentes de conejo diabético la eliminación del endotelio no modificó de forma significativa la respuesta contráctil inducida por la ET-1, referida tanto a los valores de E_{max} como de CE_{50} (Tabla 3).

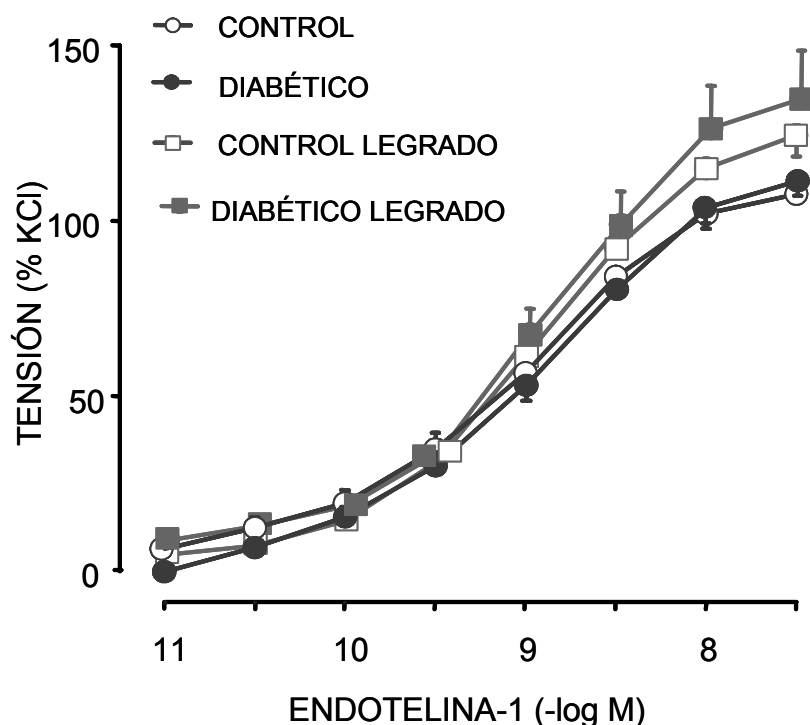


Figura 15. Curva concentración-respuesta de ET-1 en segmentos de arteria carótida procedente de conejo control y de conejo diabético, en situación control y en segmentos sin endotelio. Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima desarrollada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media \pm EEM

La curva concentración-respuesta para la ET-1 obtenida en arterias legradas de conejos diabéticos no mostró cambios significativos en los valores de CE_{50} y E_{max} con respecto a los valores obtenidos en arterias legradas de los conejos control (Tabla 3).

3.3. Efecto de la ET-1 tras la incubación con L-NOArg

La incubación con el inhibidor de la síntesis de NO, L-NOArg (10^{-4} M), indujo un aumento significativo de la contracción máxima producida por la ET-1 en los segmentos arteriales procedentes de conejos control, sin modificar significativamente los valores de CE_{50} (Figura 16).

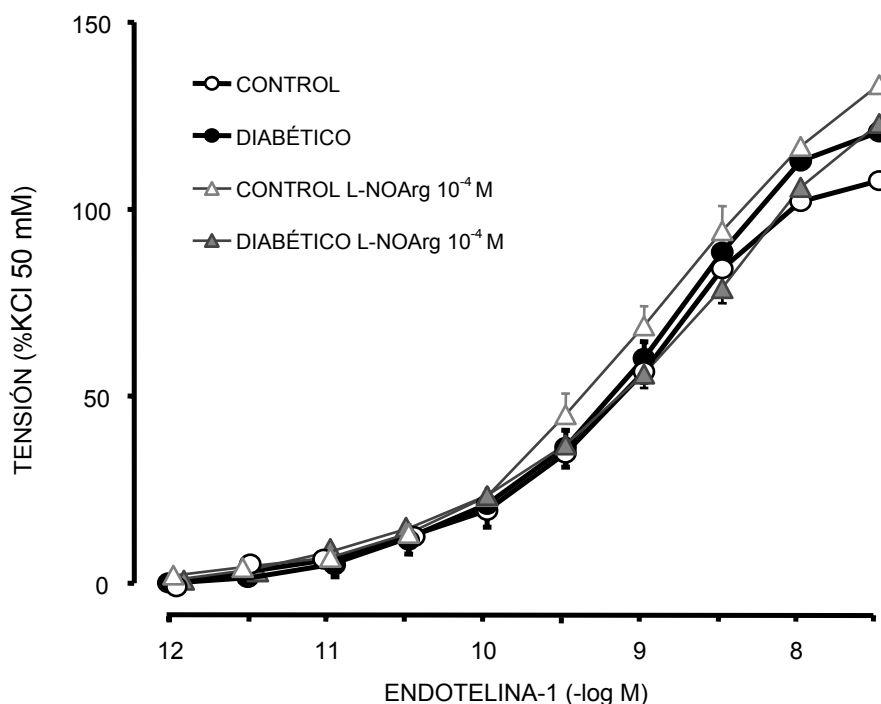


Figura 16. Curva concentración-respuesta de ET-1 en segmentos de arteria carótida procedente de conejo control y de conejo diabético, en situación control y tras la incubación con N^G -nitro-L-arginina (L-NOArg 10^{-4} M). Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima desarrollada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media \pm EEM.

En segmentos arteriales procedentes de conejos diabéticos, el tratamiento con L-NOArg no modificó de forma significativa la respuesta contráctil producida por la ET-1 (Figura 16, Tabla 3). Al comparar las curvas obtenidas en presencia de L-NOArg en ambos grupos experimentales de animales, tampoco se observaron diferencias significativas entre ellas (Figura 16, Tabla 3).

3.4. Efecto de la ET-1 tras la incubación con indometacina

La incubación de las arterias carótidas de conejo control y de conejo diabético con indometacina (10^{-5} M) produjo un aumento significativo de la CE_{50} (desplazamiento hacia la derecha) de la curva concentración-respuesta a ET-1 y una disminución de los valores de E_{max} (Figura 17, Tabla 3). Los valores de CE_{50} y de E_{max} de la curva concentración-respuesta de ET-1 en arterias preincubadas con indometacina fueron significativamente diferentes (mayor CE_{50} y menor E_{max}), que los obtenidos en arterias legradas y en arterias preincubadas con L-NOArg (Tabla 3). Comparando las curvas concentración-respuesta a la ET-1 obtenidas en presencia de indometacina, en segmentos arteriales de conejo control y en segmentos arteriales de conejo diabético, se observó un aumento significativo de la CE_{50} en arterias procedentes de animales diabéticos, sin diferencias significativas en los valores de E_{max} (Tabla 3).

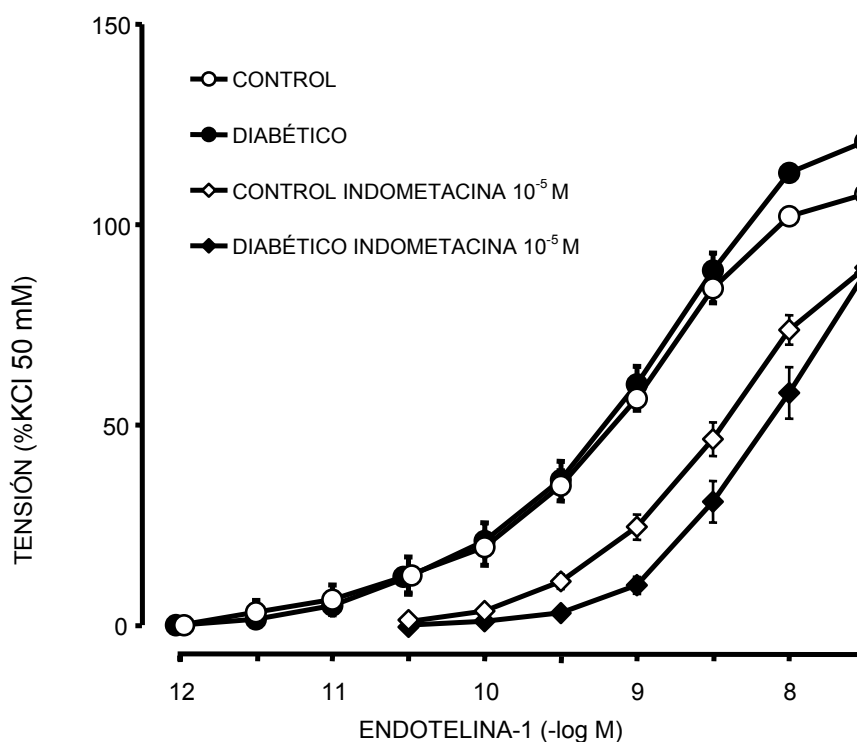


Figura 17. Curva concentración-respuesta de ET-1 en segmentos de arteria carótida procedente de conejo control y de conejo diabético, en situación control y tras la incubación con indometacina 10^{-5} M. Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima desarrollada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media \pm EEM.

La incubación de la arteria carótida legrada, procedente tanto de animales control (Figura 18) como de animales diabéticos (Figura 19), con indometacina (10^{-5} M) no produjo modificaciones significativas en la curva concentración-respuesta a ET-1 comparándola con la curva correspondiente obtenida en arterias legradas no tratadas con indometacina (Tabla 3).

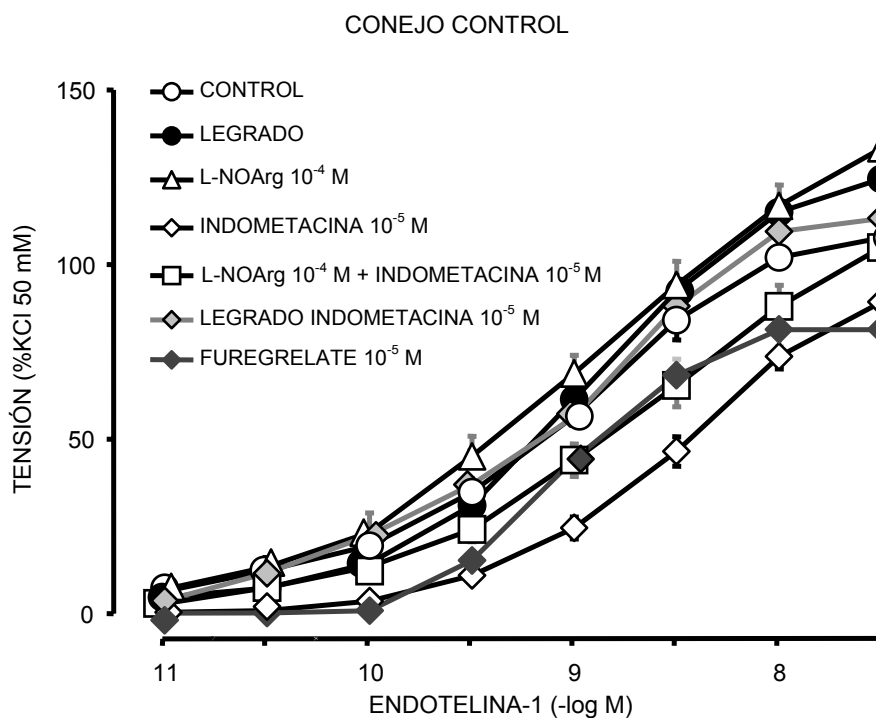


Figura 18. Curvas concentración-respuesta a la ET-1 en arterias carótidas aisladas procedentes de conejos control, en situación control, sin endotelio, incubadas con L-NOArg (10^{-4} M), incubadas con indometacina (10^{-5} M), incubadas con L-NOArg (10^{-4} M) más indometacina (10^{-5} M) e incubadas con furegrelate (10^{-5} M). Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima alcanzada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media \pm EEM.

La adición conjunta de L-NOArg (10^{-4} M) e indometacina (10^{-5} M) a los segmentos arteriales, procedentes tanto de conejos control (Figura 18) como de conejos diabéticos (Figura 19), produjo un incremento significativo de la CE_{50} (desplazamiento hacia la derecha) de la curva concentración-respuesta a la ET-1, sin modificar el valor de E_{max} (Tabla 3).

3.5. Efecto de la ET-1 tras la incubación con furegrelate

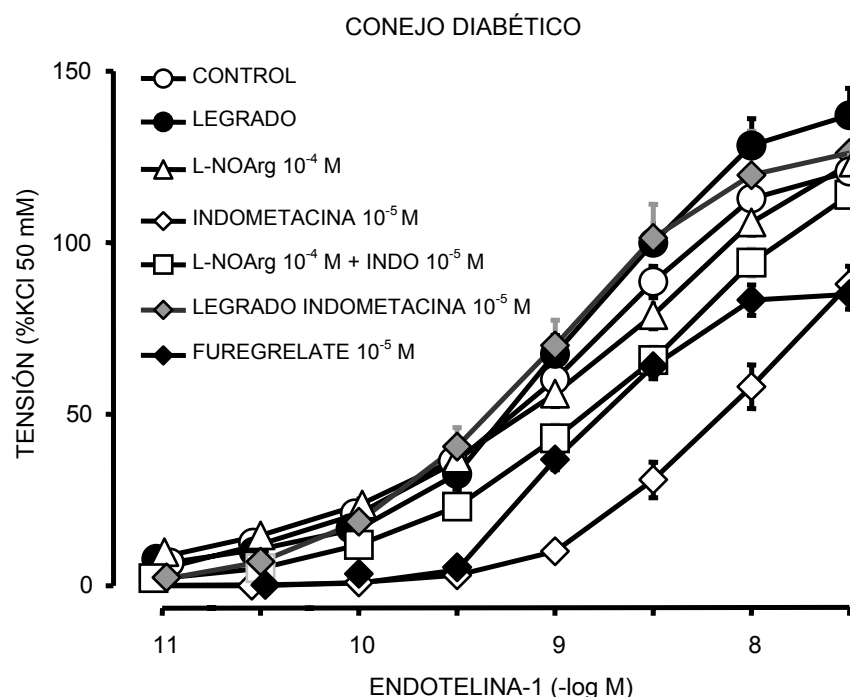


Figura 19. Curvas concentración-respuesta a la ET-1 en arterias carótidas aisladas procedentes de conejos diabéticos, en situación control, sin endotelio, incubadas con L-NOArg (10^{-4} M), incubadas con indometacina (10^{-5} M), incubadas con L-NOArg (10^{-4} M) más indometacina (10^{-5} M) e incubadas con furegrelate (10^{-5} M). Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima alcanzada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media \pm EEM.

La incubación de las arterias carótidas, procedentes tanto de conejo control (Figura 18) como de conejo diabético (Figura 19), con furegrelate (10^{-5} M) inhibió de forma significativa el E_{max} de la curva concentración-respuesta a la ET-1, sin modificar de forma significativa el valor de CE_{50} (Tabla 3). Además, el CE_{50} de la curva concentración-respuesta a la ET-1 de los segmentos arteriales procedentes de animales diabéticos fue significativamente más elevado que el obtenido en arterias tratadas con furegrelate procedentes de conejos control (Tabla 3).

3.6. Efecto de la ET-1 tras la incubación con BQ-123

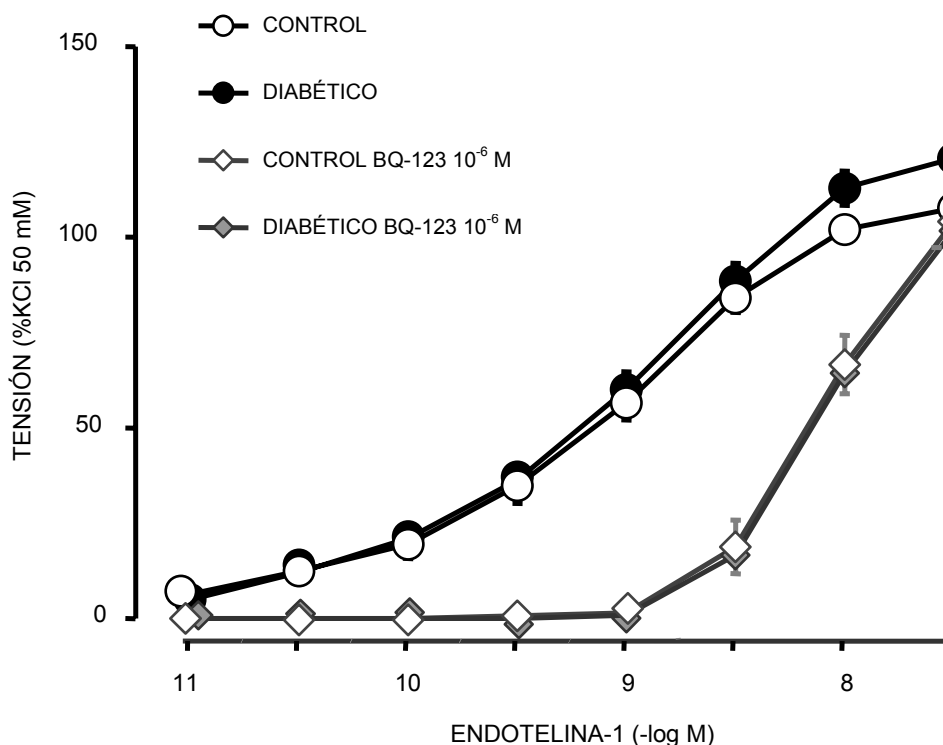


Figura 20. Curvas concentración-respuesta a la ET-1 en segmentos de arteria carótida aislada procedente de conejo control y de conejo diabético en situación control y tras la incubación con BQ-123 (10^{-6} M). Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima alcanzada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media \pm EEM.

La incubación de la arteria carótida procedente de conejos control con BQ-123 (10^{-6} M) produjo un incremento significativo de la CE_{50} (desplazamiento hacia la derecha) de la curva concentración-respuesta a la ET-1, sin producir modificaciones en el valor de E_{max} (Figura 20, Tabla 3). Sin embargo, en las curvas concentración-respuesta a ET-1 realizadas con arterias procedentes de conejos diabéticos, se observó una inhibición de la respuesta contráctil a la ET-1, tanto en términos de E_{max} como de CE_{50} (Figura 20, Tabla 3).

TABLA 3

Efecto máximo (E_{max}) y CE_{50} de las curvas concentración-respuesta de ET-1 en arteria carótida de conejo.

	E_{max}	CE_{50} (M)	n
Conejo Control			
Control	108 ± 4	6.5(5.4-7.8) x 10 ⁻¹⁰	32
Legrado	124 ± 6 ^b	9.3(7.9-11.0) x 10 ⁻¹⁰	21
L-NOArg 10 ⁻⁴ M	133 ± 5 ^b	9.5(7.9-11.5) x 10 ⁻¹⁰	18
Indometacina 10 ⁻⁵ M	89 ± 4 ^{b, c}	2.9(2.4-3.4) x 10 ^{-9 b,c}	13
L-NOArg 10 ⁻⁴ M + Indometacina 10 ⁻⁵ M	105 ± 5	1.7(1.4-2.1) x 10 ^{-9 b}	14
Legrado Indometacina 10 ⁻⁵ M	113 ± 6	8.3(6.0-11.5) x 10 ⁻¹⁰	15
Furegrelate 10 ⁻⁵ M	81 ± 5 ^{b, c}	8.7 (7.8-8.9) x 10 ⁻¹⁰	12
BQ-123 10 ⁻⁶ M	104 ± 7	7.2(6.6-7.9) x 10 ^{-9 b}	15
BQ-788 10 ⁻⁶ M	133 ± 7 ^b	8.5(6.8-10.7) x 10 ⁻¹⁰	15
Legrado BQ-788 10 ⁻⁶ M	128 ± 4 ^b	2.7(2.3-3.1) x 10 ^{-9 b,c}	14
Conejo Diabético			
Control	121 ± 4 ^a	8.7(7.2-10.5) x 10 ⁻¹⁰	34
Legrado	137 ± 8	8.3(6.8-12.6) x 10 ⁻¹⁰	30
L-NOArg 10 ⁻⁴ M	123 ± 4	1.2(1.0-1.4) x 10 ⁻⁹	23
Indometacina 10 ⁻⁵ M	88 ± 5 ^{b,c}	5.7(5.0-6.8) x 10 ^{-9 a,b,c}	18
L-NOArg 10 ⁻⁴ M + Indometacina 10 ⁻⁵ M	114 ± 3	1.9(1.7-2.2) x 10 ^{-9 b,c}	16
Legrado Indometacina 10 ⁻⁵ M	126 ± 14	6.8(5.7-7.9) x 10 ⁻¹⁰	14
Furegrelate 10 ⁻⁵ M	85 ± 4 ^{b, c}	1.3(1.2-1.4) x 10 ^{-9 a}	16
BQ-123 10 ⁻⁶ M	97 ± 3 ^b	6.8(6.3-7.2) x 10 ^{-9 b}	12
BQ-788 10 ⁻⁶ M	129 ± 5	1.8(1.4-2.2) x 10 ^{-9 a,b}	10
Legrado BQ-788 10 ⁻⁶ M	143 ± 6 ^a	2.9(2.7-3.1) x 10 ^{-9 b,c}	14

Los valores E_{max} se expresan como porcentaje de la despolarización previa con KCl 50 mM y representan media ± EEM y los valores de CE_{50} representan la media y los intervalos de confianza; n: número de segmentos arteriales.

^aSignificativamente diferente respecto de su correspondiente valor en conejo control, $P < 0.05$

^bSignificativamente diferente respecto de su correspondiente control, $P < 0.05$

3.7. Efecto de la ET-1 tras la incubación con BQ-788

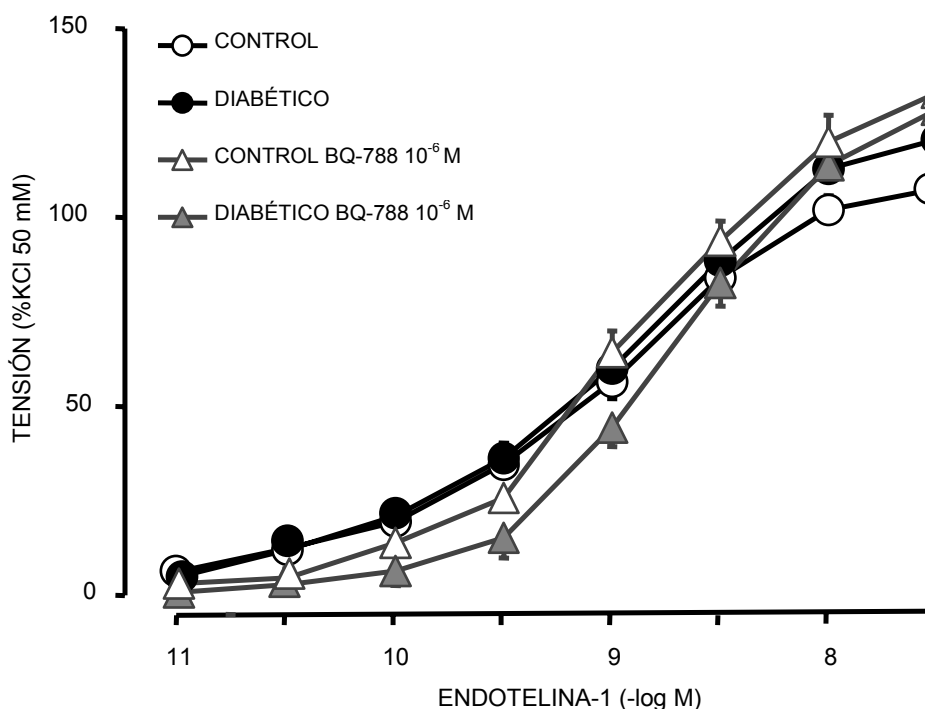


Figura 21. Curvas concentración-respuesta a la ET-1 en segmentos de arteria carótida aislada procedente de conejo control y de conejo diabético en situación control y tras la incubación con BQ-788 (10^{-6} M). Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima alcanzada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media \pm EEM.

La preincubación de los segmentos arteriales de carótida de conejos control con un antagonista de los receptores ET_B, el BQ-788 (10^{-6} M), aumentó de forma significativa el valor de E_{max} de la curva concentración-respuesta a ET-1, sin modificar el valor de CE_{50} (Figura 21, Tabla 3). En arterias procedentes de conejos diabéticos, incubadas también con BQ-788, se vio incrementada de forma significativa la CE_{50} (desplazamiento hacia la derecha) de la curva concentración-respuesta a ET-1, sin producir ningún cambio significativo en el valor de E_{max} (Figura 21, Tabla 3). La CE_{50} de la curva concentración-respuesta a ET-1 obtenida en arterias tratadas con BQ-788

procedentes de conejos diabéticos fue significativamente mayor que la obtenida en arterias tratadas con BQ-788 procedentes de conejo control (Tabla 3).

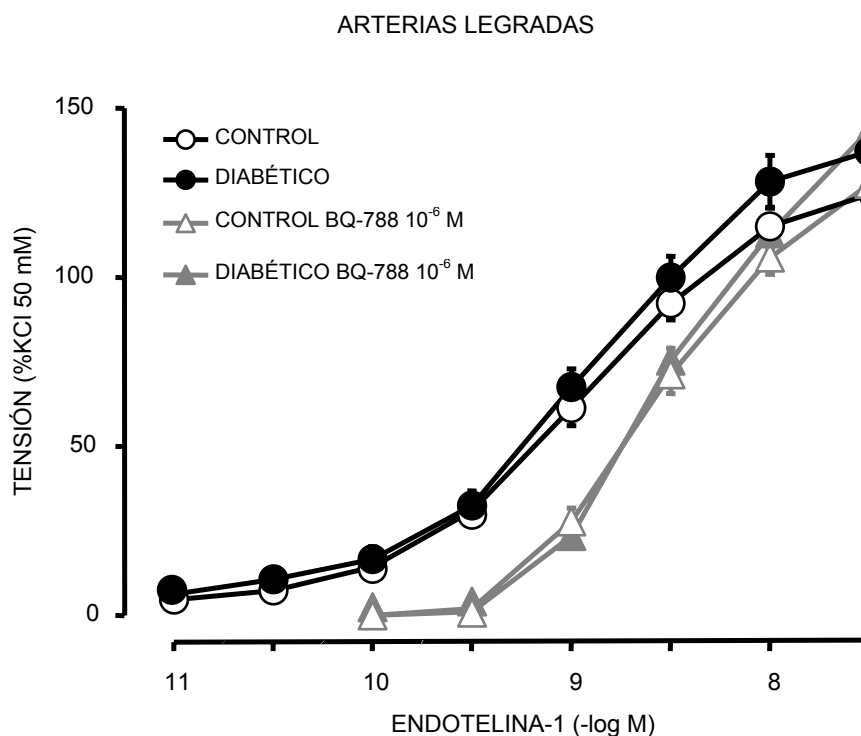


Figura 22.- Curvas concentración-respuesta de ET-1 en segmentos de arteria carótida sin endotelio (legrados), procedentes de conejo control y de conejo diabético, en situación control y tras la incubación con BQ-788 (10^{-6} M). Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima alcanzada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media \pm EEM.

La incubación de arterias carótidas legradas, procedentes tanto de conejos control como de conejos diabéticos, con BQ-788 (10^{-6} M) indujo un incremento significativo de la CE_{50} (desplazamiento hacia la derecha) de la curva concentración-respuesta a ET-1 con respecto a la obtenida en arterias legradas en ausencia de BQ-788 (Figura 22, Tabla 3). El E_{max} de la curva concentración-respuesta a ET-1 obtenido en arterias legradas tratadas con BQ-

788 procedentes de conejos diabéticos resultó significativamente mayor que el obtenido en arterias legradas tratadas con BQ-788 procedentes de conejos control (Tabla 3).

Las Figuras 23 (conejo control) y 24 (conejo diabético) muestran, de forma conjunta, las curvas concentración-respuesta de ET-1 en presencia de los antagonistas ET_A y ET_B en las diferentes situaciones estudiadas dentro de cada grupo de animales, lo que permite entender mejor el papel de ambos tipos de receptores en la respuesta de la arteria carótida de conejo a la ET-1 en situación control y los cambios inducidos por la diabetes experimental.

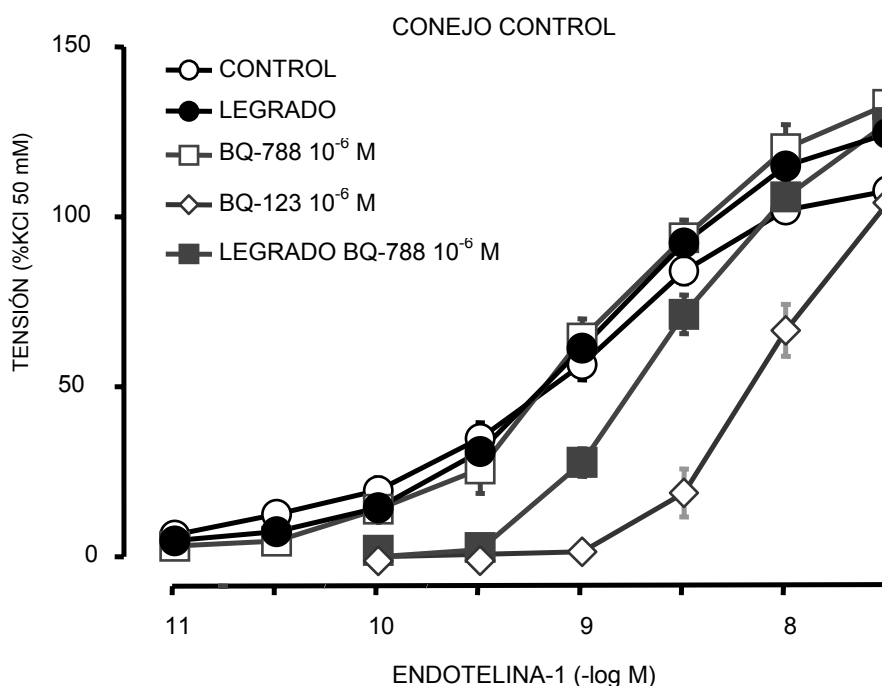


Figura 23.- Curvas concentración-respuesta de ET-1 en segmentos de arteria carótida procedente de conejo control, en situación control y en segmentos sin endotelio, tras la incubación con BQ-123 (10^{-6} M), tras la incubación con BQ-788 (10^{-6} M), y en segmentos sin endotelio preincubados con BQ-788 (10^{-6} M). Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima alcanzada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media \pm EEM.

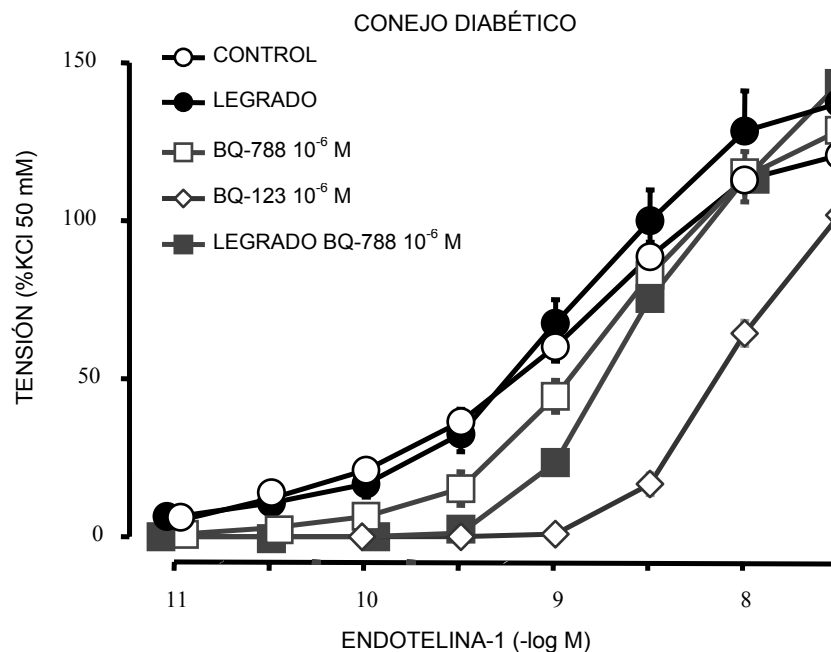


Figura 24.- Curvas concentración-respuesta de ET-1 en segmentos de arteria carótida común procedente de conejo diabético, en situación control y en segmentos sin endotelio, tras la incubación con BQ-123 (10^{-6} M), tras la incubación con BQ-788 (10^{-6} M), y en segmentos sin endotelio preincubados con BQ-788 (10^{-6} M). Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima alcanzada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media \pm EEM.

4. INFLUENCIA DE LA DIABETES SOBRE LA RESPUESTA DE LA ARTERIA RENAL DE CONEJO A LA ET-1

4.1. Efecto de la ET-1

La adición al baño de órganos de concentraciones crecientes de ET-1 (10^{-12} - 3×10^{-8} M) produjo una contracción, de magnitud dependiente de la concentración, de los segmentos de arteria renal de conejo, tanto en animales control como en los diabéticos (Figura 25). En las arterias procedentes de animal diabético la CE_{50} fue significativamente mayor (menor potencia) que en las arterias control, sin presentar diferencias significativas en los valores de E_{max} (Tabla 4).

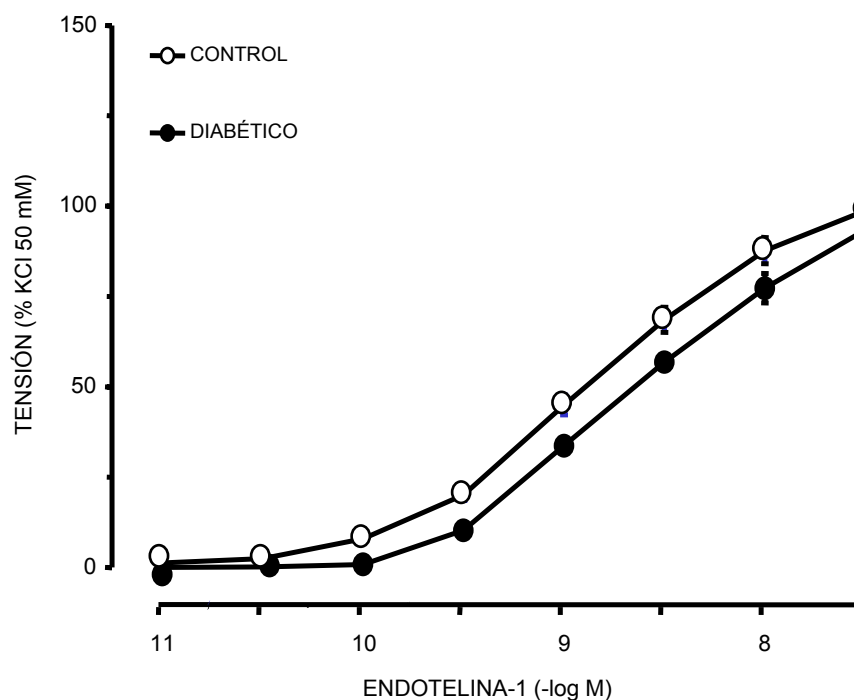


Figura 25. Curva concentración-respuesta de ET-1 en segmentos de arteria renal procedente de conejo control y de conejo diabético. Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima desarrollada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media \pm EEM.

4.2. Efecto de la ET-1 tras la eliminación del endotelio

En los segmentos arteriales procedentes de animales control la eliminación mecánica del endotelio aumentó de forma significativa los valores de E_{max} y disminuyó la CE_{50} de la curva concentración-respuesta a la ET-1 (Figura 26, Tabla 4). En arterias procedentes de animal diabético la eliminación del endotelio produjo una disminución significativa de CE_{50} inducida por la ET-1 sin afectar de forma significativa el valor de E_{max} (Figura 26, Tabla 4).

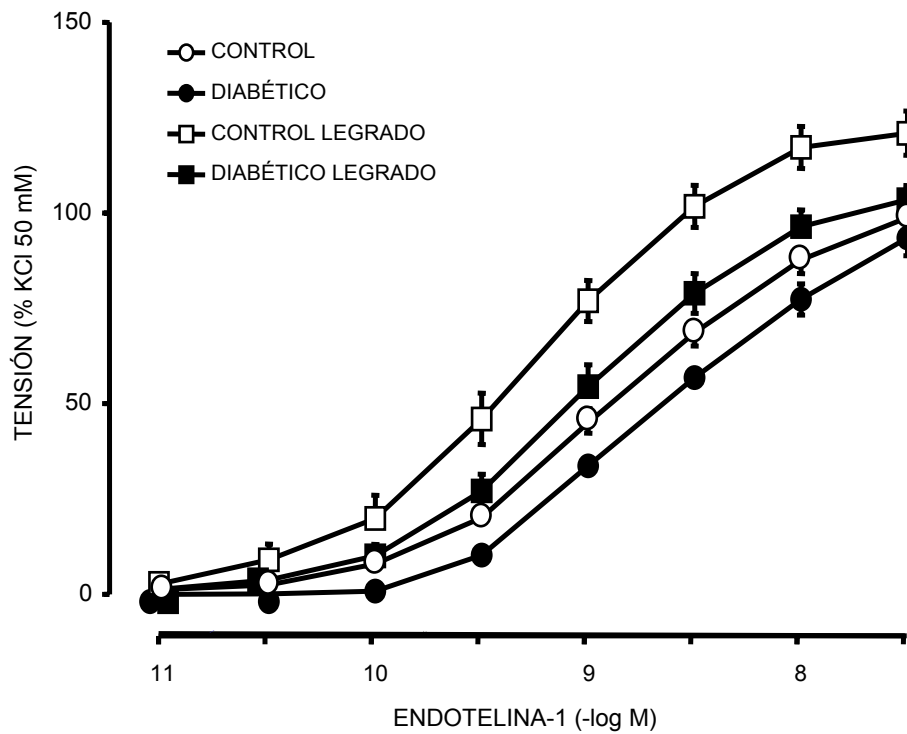


Figura 26. Curva concentración-respuesta de ET-1 en segmentos de arteria renal procedente de conejo control y de conejo diabético, en situación control y en segmentos sin endotelio. Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima desarrollada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media \pm EEM

En la curva concentración-respuesta de la arteria renal a la ET-1 en las arterias legradas procedentes de animal diabético se observó un menor E_{max} y una mayor CE_{50} con respecto a los valores obtenidos en las arterias legradas de los conejos control (Tabla 4).

4.3. Efecto de la ET-1 tras la incubación con L-NOArg

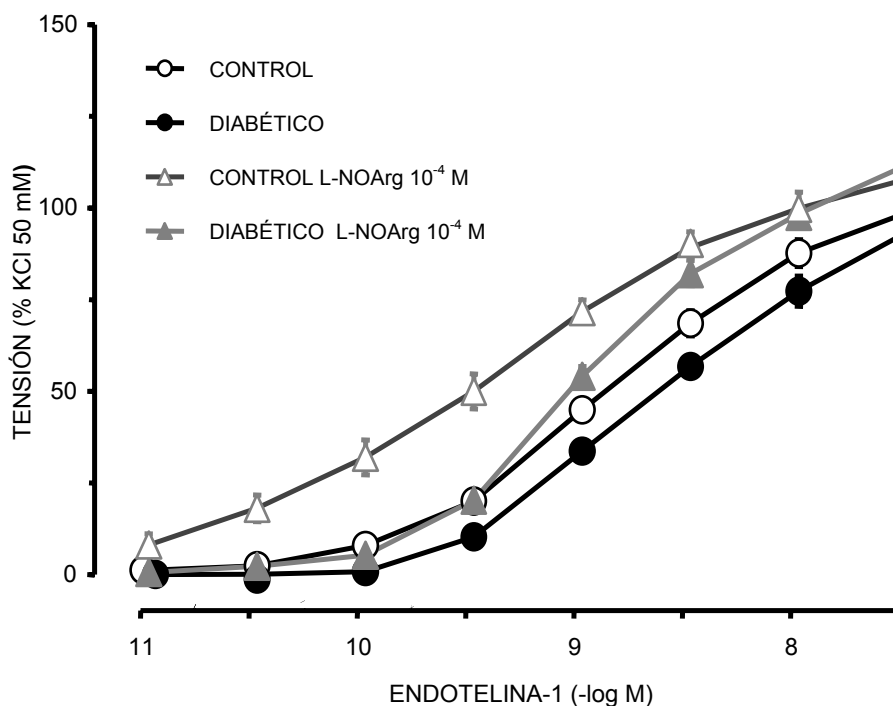


Figura 27. Curva concentración-respuesta de ET-1 en segmentos de arteria renal procedente de conejo control y de conejo diabético, en situación control y tras la incubación con N^G-nitro-L-arginina (L-NOArg 10⁻⁴ M). Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima desarrollada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media \pm EEM.

La incubación con L-NOArg (10⁻⁴ M) redujo de forma significativa el valor de CE₅₀ de la curva concentración-respuesta a la ET-1 en segmentos arteriales procedentes de animal control, sin modificar de forma significativa la contracción máxima (Figura 27, Tabla 4). En animal diabético, el tratamiento con L-NOArg aumentó de forma significativa la contracción máxima inducida por la ET-1 y redujo el valor de CE₅₀ (Figura 27, Tabla 4). Las curvas concentración-respuesta a la ET-1 obtenidas en arterias procedentes de animal diabético preincubadas con L-NOArg mostraron un valor de CE₅₀

significativamente superior al valor observado en arterias procedentes de conejo control, sin mostrar cambios significativos en el valor de E_{max} (Tabla 4).

4.4. Efecto de la ET-1 tras la incubación con indometacina

La incubación con indometacina (10^{-5} M), un inhibidor de COX-1 y COX-2, de arterias procedentes de conejo control produjo un aumento significativo (desplazamiento hacia la derecha) de la CE_{50} de la curva concentración-respuesta a la ET-1, sin modificar de forma significativa el valor de E_{max} (Figura 28, Tabla 4). Sin embargo, en segmentos arteriales procedentes de conejos diabéticos la indometacina produjo un aumento de E_{max} y un desplazamiento de la curva concentración-respuesta hacia la izquierda (disminución de CE_{50}) (Figura 28, Tabla 4). Comparando las curvas concentración-respuesta a la ET-1 en presencia de indometacina, obtenidas a partir de segmentos arteriales de conejo control con las obtenidas en segmentos arteriales de conejo diabético, observamos un aumento significativo del E_{max} y disminución del valor de CE_{50} en las arterias de conejo diabético (Tabla 4).

En ambos grupos de animales, la incubación de los segmentos renales sin endotelio con indometacina (10^{-5} M) provocó un aumento significativo del valor de CE_{50} de la curva concentración-respuesta a la ET-1, sin afectar de forma significativa el valor de E_{max} , en relación a los valores obtenidos en arterias legradas en ausencia de indometacina (Tabla 4). Al comparar las curvas concentración-respuesta a la ET-1 obtenidas a partir de

segmentos arteriales legrados de conejo control y de conejo diabético, preincubados con indometacina, se observó una disminución significativa del E_{max} y un aumento significativo de CE_{50} de la curva concentración-respuesta a la ET-1 de los segmentos arteriales procedentes de conejos diabéticos (Tabla 4).

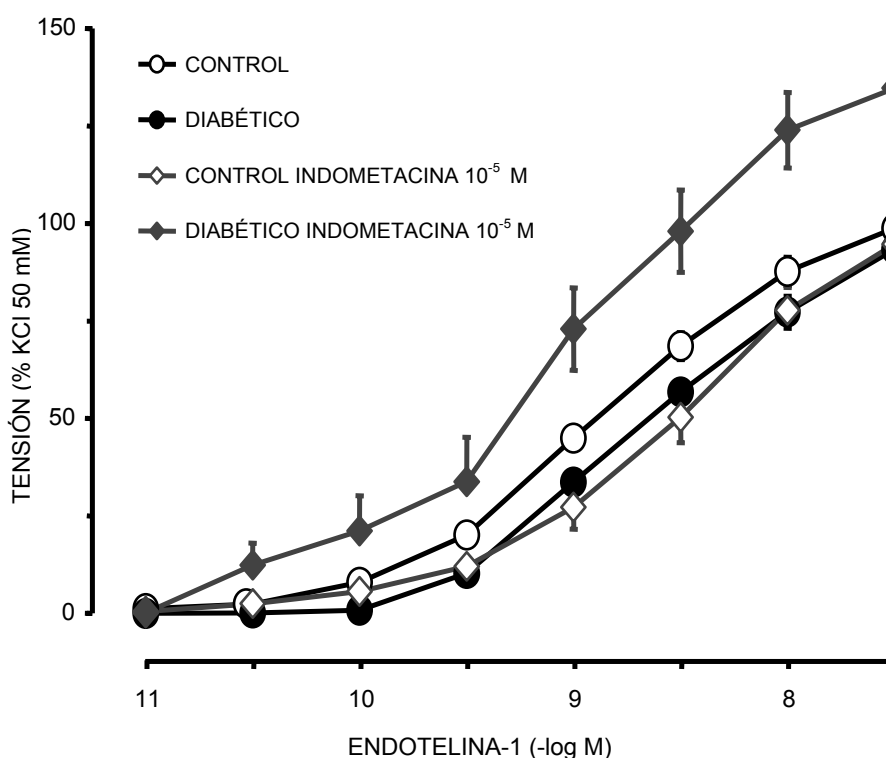


Figura 28. Curva concentración-respuesta de ET-1 en segmentos de arteria renal procedente de conejo control y de conejo diabético, en situación control y tras la incubación con indometacina 10^{-5} M. Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima desarrollada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media \pm EEM.

4.5. Efecto de la ET-1 tras la incubación con nimesulide

La incubación de los segmentos arteriales renales, procedentes tanto de conejos control como de conejos diabéticos, con nimesulide (10^{-6} M)

incrementó de forma significativa el E_{max} de la curva concentración-respuesta a la ET-1, sin modificar significativamente el valor de CE_{50} (Figura 29, Tabla 4).

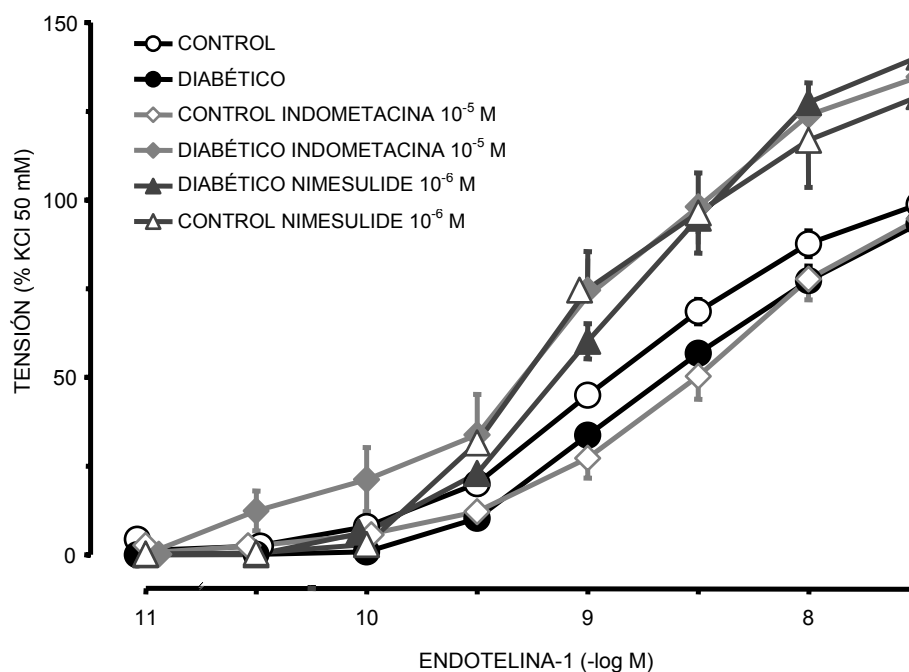


Figura 29. Curva concentración-respuesta de ET-1 en segmentos de arteria renal procedente de conejo control y de conejo diabético, en situación control y tras la incubación con indometacina 10^{-5} M y nimesulide 10^{-6} M. Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima desarrollada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media \pm EEM.

Al comparar con los resultados obtenidos en arterias incubadas con indometacina, el inhibidor de la COX-2 aumentó de forma significativa el E_{max} de la curva concentración-respuesta a la ET-1, sin afectar al valor de CE_{50} en animal control. En animal diabético, la respuesta contráctil a la ET-1 no se vio modificada al incubar los segmentos arteriales con nimesulide con respecto a los valores obtenidos en arterias tratadas con indometacina.

El valor de CE_{50} de la curva concentración-respuesta a la ET-1 obtenido en arterias tratadas con nimesulide procedentes de conejo diabético

fue significativamente mayor que el obtenido en arterias incubadas con nimesulide procedentes de conejos control (Tabla 4).

4.6. Efecto de la ET-1 tras la incubación con furegrelate

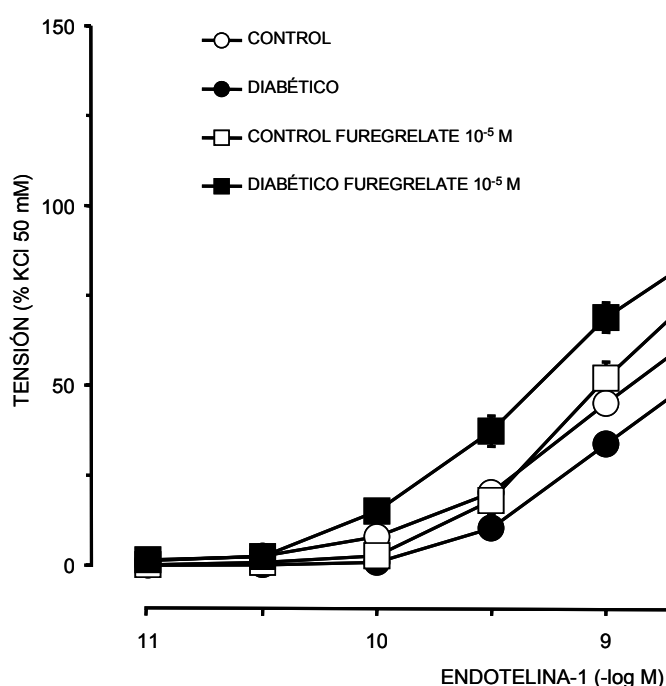


Figura 30. Curva concentración-respuesta de ET-1 en segmentos de arteria renal procedente de conejo control y de conejo diabético, en situación control y tras la incubación con furegrelate 10^{-5} M. Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima desarrollada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media \pm EEM.

La incubación de los segmentos arteriales con furegrelate (10^{-5} M), un inhibidor de la tromboxano sintasa, produjo un aumento de la contracción máxima a la ET-1 en ambos grupos de animales, además de disminuir significativamente el valor de CE_{50} en animal diabético (Figura 30, Tabla 4). El valor de CE_{50} de la curva concentración-respuesta a la ET-1 obtenido en

arterias preincubadas con furegrelate procedentes de animal diabético fue significativamente menor que el obtenido en arterias de animal control incubadas con furegrelate (Tabla 4).

4.7. Efecto de la ET-1 tras la incubación con BQ-123

La incubación con BQ-123 (10^{-6} M) inhibió la respuesta contráctil a la ET-1 (disminución del E_{max} y aumento de CE_{50}) en arterias renales procedentes de animal control. Sin embargo, en segmentos arteriales procedentes de animales diabéticos la inhibición selectiva de los receptores ET_A produjo un aumento significativo de la respuesta contráctil a la ET-1. Los valores del E_{max} de la curva concentración-respuesta de la ET-1 en arterias diabéticas preincubadas con BQ-123 fueron significativamente mayores a los obtenidos en arterias de animal control con el mismo tratamiento (Figura 31, Tabla 4).

La incubación con indometacina (10^{-5} M) de las arterias renales pre-tratadas con BQ-123 (10^{-6} M) produjo, en conejos control, un aumento significativo del valor de E_{max} de la curva concentración-respuesta a la ET-1; este valor de E_{max} se vio inhibido, en el caso de arterias procedentes de animal diabético, respecto al valor obtenido en arterias tratadas con BQ-123 (10^{-6} M) en ausencia de indometacina (Figura 31, Tabla 4).

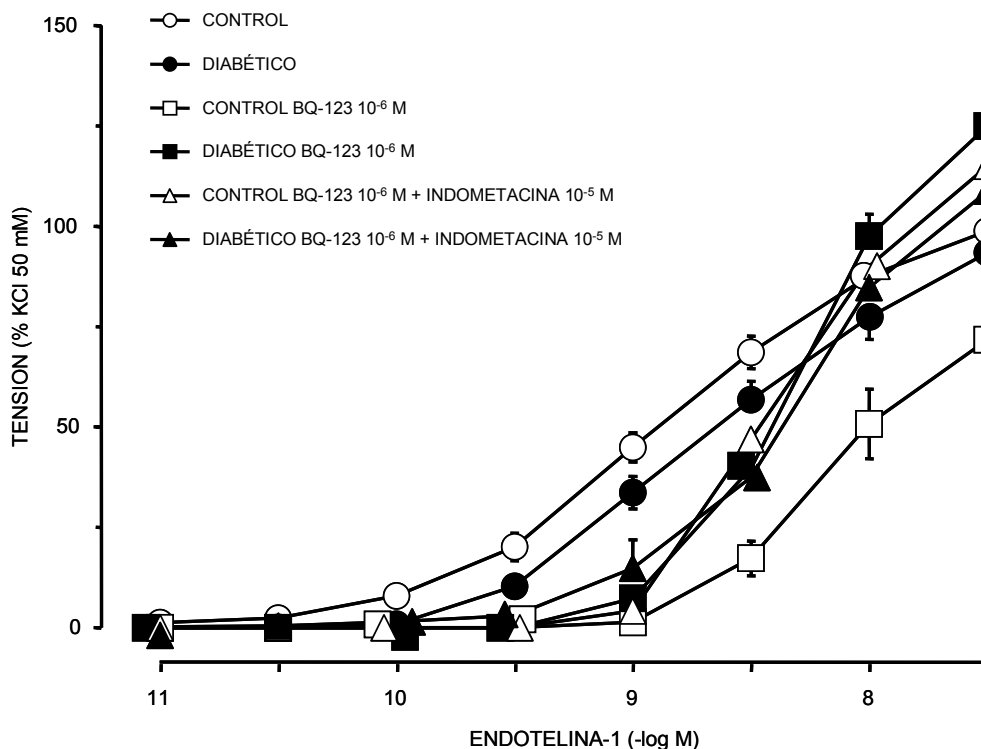


Figura 31. Curva concentración-respuesta de ET-1 en segmentos de arteria renal procedente de conejo control y de conejo diabético, en situación control y tras la incubación con BQ-123 10^{-6} M y con BQ-123 10^{-6} M + indometacina 10^{-5} M. Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima desarrollada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media \pm EEM.

4.8. Efecto de la ET-1 tras la incubación con BQ-788

La incubación de las arterias renales de conejos control con BQ-788 (10^{-6} M) aumentó de forma significativa el valor de E_{max} de la curva concentración-respuesta a la ET-1 pero no modificó el valor de CE_{50} (Figura 32, Tabla 4). En arterias procedentes de conejos diabéticos, la incubación con BQ-788 (10^{-6} M) no modificó de forma significativa la respuesta contráctil a la ET-1 (Figura 32, Tabla 4). Al comparar las curvas concentración-respuesta a la ET-1 obtenidas a partir de segmentos arteriales de conejo control y de segmentos arteriales de conejo diabético, preincubados con BQ-788 (10^{-6} M), se observó

una disminución significativa del E_{max} de la curva concentración-respuesta a la ET-1 obtenido en arterias de conejos diabéticos (Tabla 4).

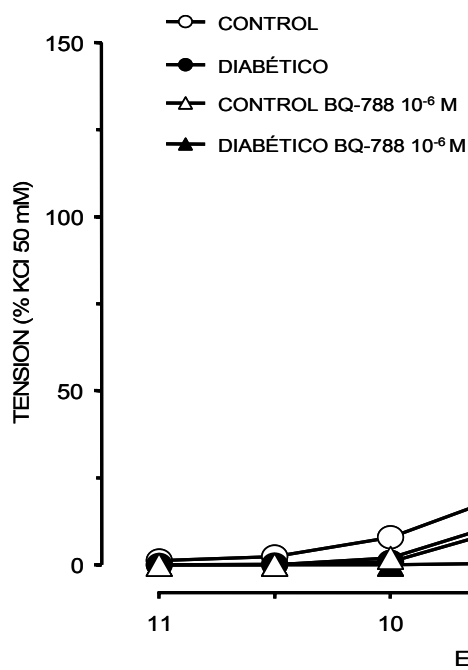


Figura 32. Curva concentración-respuesta de ET-1 en segmentos de arteria renal procedente de conejo control y de conejo diabético, en situación control y tras la incubación con BQ-788 10^{-6} M. Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima desarrollada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media \pm EEM.

La incubación con BQ-788 (10^{-6} M) de arterias sin endotelio procedentes de conejo control no modificó significativamente la respuesta contráctil a la ET-1 (Figura 33, Tabla 4), pero disminuyó la CE_{50} (desplazamiento hacia la izquierda) en las arterias de conejo diabético (Figura 34, Tabla 4).

CONEJO CONTROL

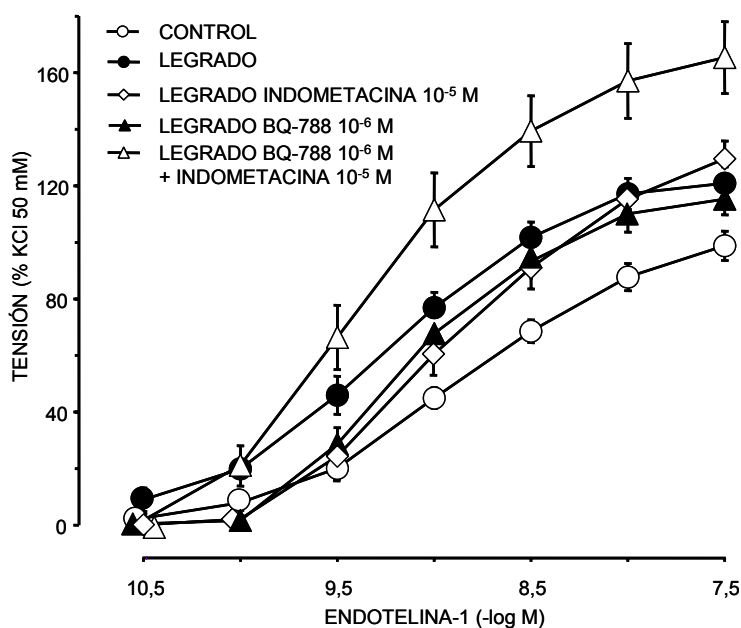


Figura 33. Curva concentración-respuesta de ET-1 en segmentos de arteria renal procedente de conejo control, en situación control con endotelio (control), y sin endotelio en situación control (legrado), y tras la incubación con BQ-788 10^{-6} M y con BQ-788 10^{-6} M + indometacina 10^{-5} M. Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima desarrollada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media \pm EEM.

CONEJO DIABÉTICO

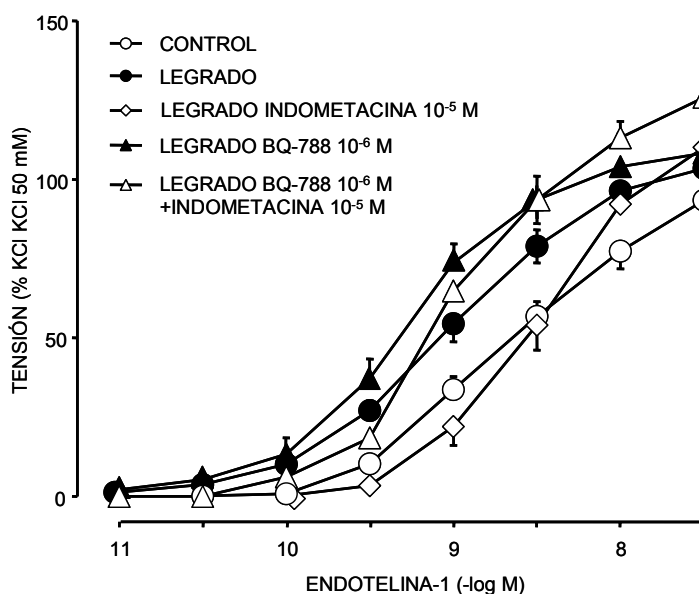


Figura 34. Curva concentración-respuesta de ET-1 en segmentos de arteria renal procedente de conejo diabético, en situación control con endotelio (control), y sin endotelio en situación control (legrado), y tras la incubación con BQ-788 10^{-6} M y con BQ-788 10^{-6} M + indometacina 10^{-5} M. Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima desarrollada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media \pm EEM.

La incubación con indometacina (10^{-5} M) de arterias sin endotelio, procedentes tanto de conejos control (Figura 33) como de animales diabéticos (Figura 34), previamente incubadas con BQ-788 (10^{-6} M) produjo un aumento significativo de la respuesta contráctil a la ET-1 en comparación con la curva obtenida en arterias legradas incubadas únicamente con BQ-788.

En arterias legradas preincubadas con indometacina y BQ-788 la ET-1 produjo una menor respuesta contráctil (menor E_{max} y mayor CE_{50}) que la obtenida en arterias legradas de animales control tratadas con BQ-788 e indometacina (Tabla 4).

TABLA 4

Efecto máximo (E_{max}) y CE_{50} de las curvas concentración-respuesta de ET-1 en arteria renal de conejo.

	E_{max}	CE_{50} (M)	n
Conejo Control			
Control	99 ± 5	1.0 (0.9 - 1.3) x 10 ⁻⁹	22
Legrado	121 ± 6 ^b	4.6 (3.7 - 5.6) x 10 ^{-10b}	16
L-NOArg 10 ⁻⁴ M	108 ± 6	3.0 (2.2 - 3.9) x 10 ^{-10b}	13
Indometacina 10 ⁻⁵ M	95 ± 4	2.3 (1.8 - 3.1) x 10 ^{-9b}	20
Legrado Indometacina 10 ⁻⁵ M	130 ± 6 ^{b, d}	1.2 (1.0 - 1.5) x 10 ^{-9c, d}	17
Nimesulide 10 ⁻⁶ M	129 ± 12 ^{b, d}	8.3 (7.2 - 9.5) x 10 ⁻¹⁰	7
Furegrelate 10 ⁻⁵ M	115 ± 3 ^b	1.0 (0.9 - 1.1) x 10 ⁻⁹	10
BQ-123 10 ⁻⁶ M	72 ± 10 ^b	6.5 (5.8 - 7.2) x 10 ^{-9b}	11
BQ-123 10 ⁻⁶ M + Indometacina 10 ⁻⁵ M	115 ± 7 ^{d, e}	4.6 (3.7 - 5.6) x 10 ^{-9b}	8
BQ-788 10 ⁻⁶ M	129 ± 7 ^b	1.2 (1.0 - 1.5) x 10 ⁻⁹	15
Legrado BQ-788 10 ⁻⁶ M	115 ± 5 ^b	6.6 (5.4 - 8.1) x 10 ⁻¹⁰	8
Legrado BQ-788 10 ⁻⁶ M +Indom 10 ⁻⁵ M	165 ± 13 ^{b, c, d, f, g, h}	4.9 (4.0 - 6.0) x 10 ^{-10d, f, h}	9
Conejo Diabético			
Control	93 ± 5	1.9 (1.6 - 2.2) x 10 ^{-9a}	23
Legrado	103 ± 4 ^a	8.7 (7.1 - 10.7) x 10 ^{-10a,b}	14
L-NOArg 10 ⁻⁴ M	112 ± 4 ^b	1.0 (0.9 - 1.1) x 10 ^{-9a,b}	13
Indometacina 10 ⁻⁵ M	135 ± 9 ^{a, b}	8.7 (6.5 - 11.7) x 10 ^{-10a,b}	13
Legrado Indometacina 10 ⁻⁵ M	110 ± 6 ^{a, d}	3.3 (2.9 - 3.8) x 10 ^{-9a, b, c, d}	11
Nimesulide 10 ⁻⁶ M	140 ± 5 ^b	1.3 (1.2 - 1.5) x 10 ^{-9a}	10
Furegrelate 10 ⁻⁵ M	121 ± 4 ^b	6.6 (5.4- 8.1) x 10 ^{-10 a, b}	11
BQ-123 10 ⁻⁶ M	125 ± 5 ^{a, b}	4.7 (4.1 - 5.4) x 10 ^{-9b}	17
BQ-123 10 ⁻⁶ M + Indometacina 10 ⁻⁵ M	109 ± 6 ^{d, e}	4.1 (3.2 - 5.1) x 10 ^{-9b, d}	8
BQ-788 10 ⁻⁶ M	91 ± 4 ^a	1.7 (1.5 - 1.8) x 10 ⁻¹⁰	10
Legrado BQ-788 10-6 M	108 ± 5 ^f	5.0 (4.4 - 5.8) x 10 ^{-10b, c, f}	10
Legrado BQ-788 10 ⁻⁶ M +Indom 10 ⁻⁵ M	126 ± 6 ^{a, b, f, g, h}	1.0 (0.8 - 1.3) x 10 ^{-9a, f, g, h}	9

Los valores E_{max} se expresan como porcentaje de la despolarización previa con KCl 50 mM y representan media ± EEM y los valores de CE_{50} representan la media y los intervalos de confianza; n: número de segmentos arteriales.

^a Significativamente diferente respecto de su correspondiente valor en conejo control, $P < 0.05$;

^b Significativamente diferente respecto de su correspondiente control, $P < 0.05$; ^c Significativamente diferente respecto de su correspondiente legrado, $P < 0.05$; ^d Significativamente diferente respecto de su correspondiente valor en segmentos arteriales incubados con indometacina, $P < 0.05$; ^e Significativamente diferente respecto de su correspondiente valor en segmentos arteriales incubados con BQ-123, $P < 0.05$; ^f Significativamente diferente respecto de su correspondiente valor en segmentos arteriales legrados incubados con BQ-123, $P < 0.05$; ^g Significativamente diferente respecto de su correspondiente valor en segmentos arteriales legrados incubados con BQ-788, $P < 0.05$; ^h Significativamente diferente respecto de su correspondiente valor en segmentos arteriales legrados incubados con indometacina, $P < 0.05$

DISCUSIÓN

1. INDUCCIÓN DE LA DIABETES

El animal de experimentación que se utilizó en el presente trabajo fue el conejo blanco de Nueva Zelanda y el modelo experimental para la inducción de la diabetes, el aloxano. Se trata de una sustancia química que daña específicamente las células beta pancreáticas mediante un mecanismo oxidativo y que provoca en el animal un cuadro clínico similar a la diabetes mellitus tipo 1. Durante las primeras 24 horas que siguen a la administración del tóxico el animal tiene tendencia a la hipoglucemia como consecuencia de la liberación masiva de insulina, pudiendo aparecer alteraciones graves, e incluso la muerte del animal. Sin embargo, tras este periodo de hipoglucemia se instaura la hiperglucemia característica, que se mantiene durante las seis semanas de estabulación. Además, los animales tratados con aloxano, comparativamente con los conejos control, tienen polidipsia, poliuria, polifagia, y una ganancia en peso significativamente menor. En conejos diabéticos inducidos por aloxano, las alteraciones endoteliales ocurren en la aorta a las dos semanas de la inducción de la diabetes y los cambios se vuelven más severos en las semanas siguientes; estas alteraciones incluyen adhesión a la superficie endotelial de leucocitos, plaquetas, y de un material similar a fibrina (Hadcock *et al.*, 1991). Todo ello pone de manifiesto la validez de la utilización del aloxano como agente diabetógeno cuando se utiliza el conejo como animal de experimentación (Öztürk *et al.*, 1996).

2. EFECTO DE LA ET-1 EN LA ARTERIA BASILAR

Los resultados que se presentan en este trabajo muestran un aumento de la respuesta contráctil de la arteria basilar de conejo a la ET-1 en la diabetes. Se ha observado un incremento de la respuesta vascular a la ET-1 en distintas condiciones fisiopatológicas como isquemia cerebral (Salom *et al.*, 2000), hemorragia subaracnoidea (Alabadí *et al.*, 1997) e hipertensión (Cardillo *et al.*, 1999). En la diabetes, la contracción inducida por la ET-1 se encuentra incrementada en aorta (Hattori *et al.*, 1999), arteria renal y mesentérica (Kiff *et al.*, 1991) de rata. Más recientemente, se ha observado un aumento de sensibilidad a la ET-1 en arterias de resistencia mesentéricas aisladas de pacientes diabéticos (McIntyre *et al.*, 2001). Además, estudios realizados *in vivo* mostraron un aumento de la reactividad a ET-1 endógena en vasos de resistencia de pacientes diabéticos (Cardillo *et al.*, 2002) y también se ha descrito una respuesta aumentada al péptido en arteriolas de resistencia de hamsters diabéticos (Mayhan *et al.*, 1999). Esta hiperreactividad vascular a la ET-1 puede jugar un papel importante en la patogénesis de la isquemia cerebral de pacientes diabéticos.

En contraposición a nuestros resultados, la respuesta a la ET-1 observada en la arteria basilar de rata *in vivo* es similar en ratas control y en ratas diabéticas 3-4 meses después de la inyección de estreptozotocina (Mayhan, 1998). Estas discrepancias podrían ser atribuidas a diferencias en la duración de la diabetes, especies animales, metodologías *in vivo* versus *in vitro* y agentes diabetogénicos, etc.

La hiperreactividad a la ET-1 no es el resultado de un incremento inespecífico en la reactividad de la arteria basilar inducida por la diabetes, ya que la respuesta contráctil de las arterias basilares a otro vasoconstrictor como UTP es similar en conejos diabéticos y control.

En arterias procedentes de conejos control, la eliminación mecánica del endotelio aumentó la contracción máxima y desplazó hacia la izquierda la curva concentración-respuesta a la ET-1, indicando una modulación endotelial inhibitoria de la acción contráctil de este péptido. Estos resultados concuerdan con resultados de trabajos previos realizados con arterias cerebrales de animales no diabéticos (Salom *et al.*, 1991; Petersson *et al.*, 1997). En arterias procedentes de conejos diabéticos, la eliminación del endotelio también desplazó hacia la izquierda la curva concentración respuesta a la ET-1 sin producir cambios significativos en la contracción máxima, sugiriendo un menor papel modulador del endotelio en la diabetes. Este hecho podría contribuir a la hiperreactividad a la ET-1 observada en conejos diabéticos. Coherentemente con nuestros resultados, la modulación endotelial de la respuesta vascular a varios estímulos está alterada en la aorta y arterias carótidas de la mujer con diabetes gestacional (Hu *et al.*, 1998) y en la aorta (Pagano *et al.*, 1998) y arteria renal (Costa e Forti y Fonteles, 1998) de conejos con diabetes inducida por aloxano.

La acción moduladora del endotelio puede llevarse a cabo, al menos parcialmente, a través de la liberación de NO. En conejos control, la incubación de los segmentos arteriales con L-NOArg, un inhibidor de la NO sintasa constitutiva, aumentó de forma significativa la contracción máxima inducida por

la ET-1, indicando un papel inhibitor del NO en la modulación de la respuesta contráctil de la arteria basilar a la ET-1. Este papel inhibitor del NO en la vasoconstricción inducida por ET-1 ya se ha descrito en el territorio cerebrovascular (Alabadí *et al.*, 1997). Sin embargo, la incubación de las arterias basilares procedentes de animal diabético con L-NOArg no modificó de forma significativa la contracción máxima pero desplazó hacia la izquierda la curva concentración-respuesta a la ET-1, sugiriendo que, en la diabetes, el papel inhibitor del NO en la respuesta de la arteria basilar a la ET-1 difiere del observado en conejos control. La alteración en el papel inhibitor del NO podría estar relacionado con cambios en la producción de NO y/o en la sensibilidad de las células del músculo liso vascular al NO inducidos por la diabetes. Se ha descrito una disminución de la producción de NO en diabetes (Lagaud *et al.*, 2001). Además, la menor relajación producida por el nitroprusiato sódico, un donante de NO, en arterias procedentes de conejos diabéticos, indica una menor sensibilidad al NO en las células del músculo liso de las arterias basilares diabéticas. Por lo tanto, estos datos sugieren que la diabetes altera la modulación endotelial de NO de la contracción inducida por la ET-1 en las arterias basilares mediante un mecanismo que incluye, al menos, una disminución de la sensibilidad al NO en las células del músculo liso vascular. Este hecho podría contribuir a la hiperreactividad a la ET-1 observada en este trabajo. Es interesante destacar que esta disminución de la sensibilidad al NO de las arterias basilares diabéticas no puede generalizarse a otros lechos vasculares. Así, por ejemplo, hemos observado previamente que, en arterias renales procedentes de conejos diabéticos, la sensibilidad de las células del músculo liso al NO no se encuentra alterada (Alabadí *et al.*, 2001).

El presente trabajo también ha analizado la participación de los derivados del ácido araquidónico en la modulación de la respuesta de la arteria basilar a la ET-1, mediante la obtención de curvas concentración-respuesta a este péptido en presencia de indometacina, un inhibidor del enzima ciclooxigenasa. Nuestros resultados muestran que la incubación de las arterias basilares, procedentes tanto de conejo control como de conejos diabéticos, con indometacina no modifica significativamente la contracción inducida por la ET-1, sugiriendo que, en arterias basilares de conejo, la contracción inducida por la ET-1 no está modulada por los derivados del ácido araquidónico.

Las acciones vasculares de la ET-1 están principalmente mediadas por dos subtipos distintos de receptores acoplados a proteína G denominados receptores de endotelina ET_A y ET_B (Hopfner y Gopalakrishnan, 1999). Ambos receptores ET_A y ET_B se localizan en las células del músculo liso y median vasoconstricción. Los receptores ET_B también se localizan en el endotelio y median vasodilatación a través de la activación de la liberación de NO. En este trabajo, la incubación con el antagonista de los receptores ET_A, el BQ-123, inhibió la respuesta contráctil de la arteria basilar a la ET-1, tanto en conejos control como en conejos diabéticos. Estos resultados confirman que la contracción de la arteria basilar de conejo en respuesta a la ET-1 está mediada por receptores endotelinérgicos ET_A. El hecho de que las diferencias entre la respuesta arterial a la ET-1 entre conejos control y diabéticos no persistan tras la incubación con BQ-123 sugiere una mayor participación de los receptores ET_A en la diabetes, lo que podría contribuir a la hiperreactividad a la ET-1 observada en animales diabéticos. Un estudio realizado *in vivo* muestra que la

actividad de la ET-1 endógena sobre los receptores ET_A está aumentada a la vez que la sensibilidad a la ET-1 exógena está disminuida en los vasos de resistencia de pacientes con diabetes de tipo 2 (Cardillo *et al.*, 2002). Además, la diabetes induce la regulación a la alza (“upregulation”) de los receptores ET_A en el corazón de rata (Chen *et al.*, 2000).

En conejos control, la incubación de arterias no legradas con el antagonista de los receptores endotelinérgicos ET_B, el BQ-788, aumentó la respuesta contráctil a la ET-1. Este resultado sugiere la participación de receptores endoteliales ET_B que median vasodilatación en la respuesta de la arteria basilar a la ET-1. La presencia de receptores ET_B que median relajación endotelio-dependiente en la arteria basilar de conejo se ha demostrado previamente (Zuccarello *et al.*, 1998). Por tanto, podemos concluir que en la arteria basilar de conejo, la ET-1 actúa sobre los receptores ET_B estimulando la liberación de NO, el cual a su vez contrarresta la acción vasoconstrictora del péptido. Por el contrario, en conejos diabéticos la incubación de arterias no legradas con BQ-788 no modificó la contracción máxima inducida por la ET-1. Este resultado indica que la diabetes altera la acción vasodilatadora de la ET-1 mediada por la liberación de NO a través de la activación de los receptores endoteliales ET_B, y podría explicar el menor papel modulador del endotelio en diabetes descrito en este trabajo en párrafos anteriores. La liberación alterada de NO en respuesta a la estimulación de los receptores ET_B observada en riñón de ratas diabéticas se atribuye, al menos en parte, a la disminución en el número o en la actividad de los receptores endoteliales ET_B (Kakoki *et al.*, 1999). Por tanto, un menor papel de los receptores endotelinérgicos ET_B podría

contribuir a la hiperreactividad de la arteria basilar del conejo a la ET-1 observada en la diabetes.

Además, nuestros resultados muestran que tanto en conejos control como en conejos diabéticos, la incubación de las arterias legradas con BQ-788 desplazó hacia la derecha la curva concentración-respuesta a la ET-1 con respecto a las curvas obtenidas con arterias legradas no tratadas. Estos resultados sugieren que la ET-1 actúa en los receptores ET_B localizados en el músculo liso vascular que median vasoconstricción. El hecho de que las diferencias en la respuesta a la ET-1 en arterias legradas entre conejos control y diabético (mayor potencia en diabetes) no persistan después de la incubación de las arterias legradas con BQ-788 (mayor potencia en control), sugiere una mayor participación de los receptores ET_B musculares en la diabetes que pueden también contribuir a la hiperreactividad de la arteria basilar a la ET-1 en la diabetes. Esto puede ser coherente con la regulación al alza de los receptores ET_B observada en el corazón de ratas diabéticas (Chen *et al.*, 2000).

En resumen, la diabetes induce hiperreactividad de la arteria basilar de conejo a la ET-1 a través de, al menos, tres mecanismos: (1) menor modulación inhibitoria endotelial de esta respuesta, incluyendo la alteración de la actividad de los receptores endotelinérgicos ET_B endoteliales; (2) menor sensibilidad al NO de las células del músculo liso vascular; y (3) mayor participación de los receptores endotelinérgicos ET_A y ET_B musculares que median vasoconstricción. La hiperreactividad del lecho cerebrovascular a la ET-

1 podría contribuir a la mayor susceptibilidad de enfermedades cerebrovasculares de los pacientes diabéticos.

3. EFECTO DE LA ET-1 SOBRE LA ARTERIA CARÓTIDA

Los resultados del presente trabajo demuestran que la diabetes experimental aumenta la respuesta contráctil de la arteria carótida de conejo a la ET-1. La respuesta arterial aumentada a la ET-1 se ha observado en distintas situaciones fisiopatológicas. En ratas diabéticas se ha observado una respuesta contráctil incrementada a la ET-1 en arteria renal y mesentérica (Kiff *et al.*, 1991) y aorta (Hopfner *et al.*, 1999). Además, la actividad de la ET-1 endógena en la regulación del tono vascular de los vasos de resistencia de pacientes con diabetes tipo 2 se encuentra intensificada (Cardillo *et al.*, 2002). La hiperrreactividad vascular a la ET-1, junto con el aumento de los niveles plasmáticos de este péptido en los individuos diabéticos, pueden jugar un papel fundamental en la patogénesis de la isquemia cerebral de los pacientes diabéticos (Sarman *et al.*, 2000; Seligman *et al.*, 2000; Kalogeropoulou *et al.*, 2002; Schneider *et al.*, 2002). Por otra parte, la ausencia de cambios en la contracción máxima de la arteria carótida de conejo diabético frente a una solución despolarizante (KCl 50 mM) o 5-hidroxitriptamina (Miranda *et al.*, 2000b) muestra la selectividad de los cambios de la arteria carótida frente a la ET-1 observados en el presente trabajo.

El endotelio tiene un papel decisivo en la regulación de la contracción de la pared vascular, mediante la secreción de sustancias vasoactivas. En este

trabajo, la eliminación del endotelio de los anillos arteriales procedentes de conejos control aumenta la respuesta contráctil de la arteria carótida a la ET-1, lo cual indica que el endotelio contrarresta parcialmente la vasoconstricción mediada por ET-1. En concordancia con nuestros resultados, otros trabajos han demostrado también que el endotelio atenúa la contracción de diversos lechos arteriales a la ET-1: arterias mesentéricas (Randall *et al.*, 1989), aorta (Sakata *et al.*, 1989) y arterias cerebrales (Kauser *et al.*, 1990; Alabadí *et al.*, 1997). En las arterias carótidas procedentes de conejos diabéticos, la eliminación del endotelio no modificó de forma significativa la acción contráctil de la ET-1. Este resultado podría indicar que la diabetes altera la actividad moduladora del endotelio, y esta alteración podría contribuir, al menos parcialmente, a la hiperreactividad de la arteria carótida a la ET-1 que se observa en los animales diabéticos. Se ha descrito la existencia de una alteración en la actividad moduladora del endotelio en la respuesta vascular a varios estímulos en aorta (Pagano *et al.*, 1998) y arteria renal (Costa e Forti y Fonteles, 1998) procedentes de conejos a los que se había inducido una diabetes mediante tratamiento con aloxano y en arterias carótida y aorta de mujeres con diabetes gestacional (Hu *et al.*, 1998).

En este trabajo hemos estudiado la posibilidad de que la acción moduladora del endotelio se lleve a cabo, al menos parcialmente, a través de la liberación de NO. La incubación de las arterias carótidas procedentes de conejos control con el inhibidor de la NOS constitutiva, la L-NOArg, aumentó de forma significativa la respuesta contráctil de los segmentos arteriales a la ET-1, indicando además la participación del NO en la acción moduladora del

endotelio en esta respuesta. Este resultado es similar al obtenido previamente en arteria cerebral media de cabra (Alabadí *et al.*, 1997). Además, estudios *in vivo* han demostrado que la ET-1 estimula la liberación de NO en la circulación del antebrazo en humanos (Cardillo *et al.*, 2000). En arterias procedentes de conejos diabéticos, la L-NOArg no produjo un aumento significativo de la contracción inducida por la ET-1. Este resultado sugiere que la diabetes altera la acción moduladora del NO endotelial en la respuesta de la arteria carótida a la ET-1. Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio muestran que la diabetes experimental incrementa la actividad moduladora del NO constitutivo de la respuesta de la arteria carótida de conejo a la 5-hidroxitriptamina (Miranda *et al.*, 2000a). Por lo tanto, la alteración en la acción moduladora del NO endotelial en la respuesta de la arteria carótida, procedente de conejos diabéticos, a la ET-1 no puede explicarse como un defecto inespecífico en la actividad de la eNOS, sino que se trata de un cambio específico en la modulación endotelial de la respuesta arterial a la ET-1.

En este trabajo también se examina la participación de un derivado del ácido araquidónico, vía ciclooxigenasa, en la modulación de la respuesta de la arteria carótida a la ET-1. Los resultados obtenidos muestran que la indometacina, un inhibidor de la enzima ciclooxigenasa, disminuye de forma significativa la contracción de la arteria carótida a la ET-1. Como el inhibidor de la síntesis de tromboxano A₂, furegrelate, también inhibió la respuesta contráctil a la ET-1, podemos asumir que el prostanoide vasoconstrictor que media esta respuesta es el tromboxano A₂. Con el fin de determinar el origen endotelial de este prostanoide, se realizaron curvas concentración-respuesta a la ET-1 en

arterias legradas en presencia de indometacina. Nuestros resultados muestran que la respuesta de las arterias legradas preincubadas con indometacina a la ET-1 no es significativamente diferente a la obtenida en ausencia del inhibidor, lo cual indica el origen endotelial del prostanoides vasoconstrictor. La ET-1 estimula la producción de prostaglandinas y tromboxano A_2 a partir del metabolismo del ácido araquidónico, vía ciclooxigenasa (Takayasu *et al.*, 1989). El tromboxano endotelial A_2 modula la respuesta a la ET-1 de la arteria basilar de perro (Shirahase *et al.*, 1991), el lecho vascular hepático de rata (Kurihara *et al.*, 1992) y la aorta de ratas hipertensas (Taddei y Vanhoutte, 1993). En trabajos previos hemos descrito que el endotelio modula la respuesta de la arteria carótida a la 5-hidroxitriptamina (Miranda *et al.*, 2000a) y a la acetilcolina (Miranda *et al.*, 2000b) y de la arteria renal a la 5-hidroxitriptamina (Miranda *et al.*, 2002) mediante la liberación tanto de NO como de un prostanoides vasoconstrictor. Debido al hecho de que tanto la incubación de las arterias de conejos diabéticos con indometacina o con furegrelate aumentó los valores de CE_{50} de la curva concentración-respuesta a la ET-1, puede deducirse que la indometacina y el furegrelate son más eficaces inhibiendo arterias diabéticas que arterias control. Este resultado indica un mayor papel regulador del tromboxano A_2 en la diabetes, que podría contribuir parcialmente a la hiperreactividad de la arteria carótida a la ET-1 en la diabetes. La producción renal de tromboxano A_2 y de prostaciclina se encuentra incrementada en ratas diabéticas (Okumura *et al.*, 2000). Sin embargo, otros estudios muestran una disminución en la formación del prostanoides vasoconstrictor en el lecho arterial mesentérico de rata en respuesta a la metoxamina (Makino y Kamata, 1998), en arterias carótidas de conejo en

respuesta a la 5-hidroxitriptamina (Miranda *et al.*, 2000a) o a la acetilcolina (Miranda *et al.*, 2000b) y en arterias renal de conejo en respuesta a la 5-hidroxitriptamina (Miranda *et al.*, 2002), en la diabetes. Estos datos muestran la especificidad de los cambios producidos por la diabetes en los mecanismos reguladores de la respuesta de la arteria carótida a la endotelina-1 y sugieren que dichos cambios pueden variar dependiendo de las especies, los lechos vasculares y los estímulos estudiados. Un estudio reciente indica la existencia de diferencias regionales y debidas al sexo en las alteraciones de la reactividad del músculo liso vascular inducidas por la diabetes (Sanz *et al.*, 2003).

Como hemos comentado en la sección anterior, las acciones vasculares de la ET-1 están mediadas principalmente por dos receptores distintos asociados a proteínas G, designados como ET_A y ET_B (Hopfner y Gopalakrishnan, 1999). En este trabajo, la incubación con el antagonista de los receptores ET_A, el BQ-123, produjo una inhibición significativa de la respuesta contráctil de la arteria carótida a la ET-1, tanto en conejos control (aumento del valor de CE₅₀, sin afectar el E_{max}) como en conejos diabéticos (incremento del valor de CE₅₀ e inhibición del E_{max}). Estos resultados confirman el dato previamente conocido (White *et al.*, 1993; Calo *et al.*, 1996) de que la contracción de la arteria carótida de conejo a la ET-1 está mediada por receptores ET_A. El hecho de que el BQ-123 inhibiera la contracción máxima a la ET-1 en arterias carótidas procedentes de conejos diabéticos, pero no de las procedentes de conejo control, sugiere una mayor participación de los receptores ET_A en diabetes, que podría contribuir parcialmente a la hiperreactividad de la arteria carótida de conejo a la ET-1 en diabetes. Esto

estaría de acuerdo con un estudio reciente que describe una actividad incrementada de la ET-1 endógena en los receptores ET_A de los vasos de resistencia de pacientes con diabetes tipo 2 (Cardillo *et al.*, 2002). En arterias procedentes de conejos control, la incubación de los segmentos arteriales no legrados con BQ-788 incrementó de forma significativa la contracción a la ET-1, sugiriendo la existencia de receptores ET_B endoteliales mediadores de la vasodilatación. Existe una cierta controversia sobre la presencia de receptores ET_B en la arteria carótida de conejo. Diversos estudios han sido incapaces de poner en evidencia la presencia de tales receptores (White *et al.*, 1993; Lodge *et al.*, 1995; Calo *et al.*, 1996). Debido a que la activación de los receptores ET_B media efectos opuestos dependiendo de la localización endotelial o muscular de dichos receptores, la superposición de estos efectos contrapuestos puede haber enmascarado el efecto de la activación de cada uno de ellos por separado. Sin embargo, otros estudios describen la presencia de receptores ET_B funcionalmente activos en la arteria carótida de conejo y su posible papel en diversas situaciones fisiopatológicas (Lauth *et al.*, 2000; Cattaruzza *et al.*, 2002). Estudios *in vivo* han demostrado que la ET-1 contribuye a la regulación del tono vascular de los vasos de resistencia humanos mediante la estimulación de la actividad del NO y este efecto, a su vez, está mediado a través de receptores endoteliales ET_B (Cardillo *et al.*, 2000). En arterias procedentes de conejos diabéticos, el BQ-788 desplazó hacia la derecha la curva de concentración-respuesta a la ET-1, lo cual indica que la vasodilatación mediada por receptores endoteliales ET_B se encuentra alterada en la diabetes. Por lo tanto, la alteración en la actividad moduladora de la respuesta a la ET-1 de la arteria carótida aislada procedente de conejo

diabético que se observa en este estudio podría ser consecuencia de la reducción del número o de la actividad de los receptores endoteliales ET_B. Recientemente se ha descrito en el riñón una liberación reducida de NO mediada por receptores ET_B en distintos modelos experimentales de hipertensión, diabetes mellitus e hipercolesterolemia (Kakoki *et al.*, 1999). La incubación de las arterias legradas con el antagonista de los receptores ET_B, el BQ-788, produjo un desplazamiento significativo de la curva concentración-respuesta a la ET-1 hacia la derecha con respecto a la curva obtenida en arterias legradas no tratadas, tanto en conejos control como en conejos diabéticos. Esto indica la existencia de receptores ET_B localizados en el músculo liso mediadores de la vasoconstricción. Por otra parte, la contracción máxima a la ET-1 obtenida en arterias legradas tratadas con BQ-788 procedentes de conejos diabéticos fue significativamente mayor que la obtenida en arterias legradas tratadas con BQ-788 procedentes de conejo control, apoyando de este modo la hipótesis sugerida anteriormente de que la hiperreactividad de la arteria carótida a la ET-1 podría estar relacionada con un incremento tanto en el número como en la actividad de los receptores ET_A.

En resumen, la diabetes induce hiperreactividad de la arteria carótida de conejo a la ET-1 a través de, al menos, tres mecanismos: (1) mayor actividad de los receptores ET_A musculares; (2) alteración de la liberación de NO mediada por la activación de los receptores ET_B; y (3) mayor producción de tromboxano A₂. Al igual que hemos comentado en la sección anterior, la hiperreactividad de la arteria carótida a la ET-1 también podría contribuir a la

mayor susceptibilidad de enfermedades cerebrovasculares de los pacientes diabéticos.

4. EFECTO DE LA ET-1 SOBRE LA ARTERIA RENAL

En este estudio la ET-1 indujo una contracción concentración dependiente de la arteria renal de conejo que fue significativamente menos potente en los segmentos arteriales procedentes de conejo diabético, indicando con ello que la diabetes disminuye la sensibilidad de la arteria renal de conejo a la ET-1. Existen varios estudios demostrando una respuesta reducida a la ET-1 en vasos sanguíneos de animales diabéticos (Hodgson y King, 1992; Chakravarthy *et al.*, 1994). En pacientes con diabetes tipo 2 las respuestas vasoconstrictoras a ET-1 exógena se encuentran alteradas en el flujo sanguíneo del antebrazo (Nugent *et al.*, 1996; Cardillo *et al.*, 2002). Por el contrario, la diabetes no modifica la respuesta contráctil de la arteria basilar de rata a la ET-1 (Mayhan, 1998) y aumenta la sensibilidad de las arteriolas cutáneas humanas a la ET-1 (McIntyre *et al.*, 2001).

La eliminación del endotelio de los segmentos arteriales procedentes de conejos control produjo un aumento de la respuesta contráctil de la arteria renal a la ET-1, tanto en términos de E_{max} como de CE_{50} , indicando que el endotelio contrarresta parcialmente la vasoconstricción mediada por ET-1. En arterias procedentes de conejos diabéticos, la eliminación del endotelio incrementó la sensibilidad de la arteria renal a la ET-1 (desplazó hacia la izquierda la curva concentración respuesta a la ET-1). La contracción inducida

por la ET-1 en arterias legradas de animales diabéticos fue significativamente menor a la obtenida en arterias legradas procedentes de conejos control. Teniendo en cuenta que tanto en presencia como en ausencia del endotelio la sensibilidad de las arterias de animal diabético a la ET-1 fue menor que la correspondiente a las arterias de conejo control, esta sensibilidad disminuida de las arterias renales de animal diabético a la ET-1 no puede explicarse mediante un incremento en la actividad de los moduladores vasodilatadores endoteliales. Por el contrario, la menor contracción máxima a la ET-1 observada en arterias legradas procedentes de conejos diabéticos, en comparación con la obtenida en arterias legradas procedentes de conejo control, sugiere que la diabetes disminuye la actividad moduladora vasodilatadora de origen endotelial.

Hemos estudiado la posibilidad de que la acción moduladora del endotelio pudiera producirse, al menos parcialmente, mediante la liberación de NO. La incubación de las arterias renales procedentes de conejo control con el inhibidor de la NOS, L-NOArg, aumentó significativamente la sensibilidad de los segmentos arteriales a la ET-1 sin modificar la contracción máxima, indicando la participación del NO en la acción moduladora del endotelio en esta respuesta. Esto parece estar de acuerdo con los estudios realizados *in vivo* que han demostrado que la ET-1 estimula la liberación de NO en la circulación del antebrazo humano (Cardillo *et al.*, 2000). En arterias procedentes de conejos diabéticos, la L-NOArg aumentó de forma significativa la contracción inducida por la ET-1 (mayor E_{max} y menor CE_{50}). Este resultado sugiere que la diabetes aumenta la acción moduladora del NO endotelial en la respuesta de la arteria

renal a la ET-1. Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio muestran que la diabetes experimental aumenta la actividad moduladora del NO constitutivo endotelial en la respuesta de la arteria renal a la acetilcolina (Alabadí *et al.*, 2001) y de la arteria carótida a la 5-hidroxitriptamina (Miranda *et al.*, 2000b). Por el contrario, en este trabajo hemos observado una alteración de la acción moduladora del NO endotelial en la respuesta a la ET-1 en arterias carótidas procedentes de conejos diabéticos. En experimentos previos pusimos de manifiesto que la diabetes no modifica la sensibilidad del músculo liso al NO en la arteria renal de conejo (Alabadí *et al.*, 2001). Por tanto, nuestros resultados sugieren que la diabetes aumenta la producción de NO por parte de las células endoteliales de la arteria renal de conejo.

Entre las múltiples acciones de la ET-1 se encuentra la estimulación de la fosfolipasa A₂ con el consiguiente aumento de mediadores derivados del ácido araquidónico (Imig *et al.*, 2000). En este trabajo hemos examinado la participación de derivados del ácido araquidónico de la vía COX en la modulación de la respuesta de la arteria renal a la ET-1. En arterias procedentes de conejo control, la indometacina, un inhibidor tanto de COX-1 como de COX-2, disminuyó de forma significativa la sensibilidad de la arteria renal a la ET-1. Nimesulide, un inhibidor selectivo de COX-2, produjo un aumento significativo de la contracción a la ET-1. Nuestros resultados sugieren que la respuesta de la arteria renal a la ET-1 está modulada mediante la liberación de un prostanoide vasoconstrictor vía COX-1, y de un prostanoide vasodilatador vía COX-2, predominando la influencia del prostanoide vasoconstrictor sobre el vasodilatador. Estos resultados concuerdan con la

atenuación de la vasoconstricción arteriolar aferente a la ET-1 tras la inhibición de los derivados del ácido araquidónico descrita en ratas, sugiriendo que los metabolitos procedentes del ácido araquidónico contribuyen a la respuesta vasoconstrictora de la arteria aferente a la ET-1 (Imig *et al.*, 2000). Por otra parte, nuestros resultados indican que COX-2 se expresa en la arteria renal de los conejos control. COX-2 se expresa en el sistema vascular del riñón humano adulto en condiciones normales (Therland *et al.*, 2004). Celecoxib, un inhibidor selectivo de COX-2, disminuye la concentración medular de prostaciclina y tromboxano A₂ en el riñón de conejo (Miyataka *et al.*, 2002) disminuyendo la proporción prostaciclina/tromboxano A₂ (Lomnicka *et al.*, 2003). Además, celecoxib bloquea la producción de prostaciclina de las células endoteliales de la vena umbilical humana (Smith *et al.*, 2002). Sin embargo, nuestros resultados están en desacuerdo con la ausencia de efecto del nimesulide en la acción vasoconstrictora del ácido araquidónico en el riñón de rata, sugiriendo que la isoforma COX-2 no está expresada (Quilley y Chen, 2003). Probablemente estas diferencias se puedan explicar por la variabilidad entre las especies.

En arterias procedentes de conejos diabéticos, tanto la indometacina como el nimesulide aumentaron de forma significativa la respuesta arterial a la ET-1, sugiriendo que la diabetes altera el balance entre prostanoides vasoconstrictores (COX-1) y vasodilatadores (COX-2) a favor de estos últimos. Varios estudios han descrito una disminución en la formación de prostanoides vasoconstrictores en arteria mesentérica de rata en respuesta a metoxamina (Makino y Kamata, 1998), en arterias carótidas en respuesta a acetilcolina

(Miranda *et al.*, 2000a) o 5-hidroxitriptamina (Miranda *et al.*, 2000b) y en arterias renales de conejo en respuesta a 5-hidroxitriptamina en condiciones de diabetes. Por el contrario, resultados presentados en esta Tesis muestran una producción incrementada de prostanoïdes vasoconstrictores en las arterias carótidas procedentes de conejos diabéticos en respuesta a la ET-1. Además, la producción renal de tromboxano A₂ y prostaciclina se encuentra incrementada en ratas diabéticas (Okumura *et al.*, 2000). Asimismo, en riñón de rata se ha observado que la diabetes induce un incremento de los prostanoïdes vía COX-2 (Quiley y Chen, 2003). De forma similar a lo observado en la arteria carótida, estos datos apoyan la especificidad de los cambios de los mecanismos moduladores de la respuesta arterial a la ET-1.

La respuesta contráctil a la ET-1 en arterias previamente tratadas con indometacina fue significativamente más elevada en arterias procedentes de conejos diabéticos que en arterias procedentes de conejo control, sugiriendo, por tanto, que el cambio en el balance de prostanoïdes vasoconstrictores a vasodilatadores contribuye a la menor sensibilidad de la arteria renal a la ET-1 en la diabetes. Además, este resultado también evidencia que, en ausencia de prostanoïdes, hay una hiperreactividad de las arterias de animal diabético a la ET-1.

En arterias sin endotelio, procedentes tanto de animales control como de diabéticos, la indometacina disminuyó de forma significativa la sensibilidad de la arteria renal a la ET-1 con respecto a la obtenida en ausencia del inhibidor, sugiriendo además que el prostanoïde vasoconstrictor COX-1 es liberado por las células del músculo liso. Este resultado es similar al obtenido *in*

in vitro en preparaciones de nefronas yuxtaglomerulares perfundidas, indicando que los metabolitos de COX que contribuyen a la citada vasoconstricción a la ET-1 están en gran parte generados por las células del músculo liso de los vasos renales (Imig *et al.*, 2000).

Furegrelate, un inhibidor de la síntesis de tromboxano A_2 , aumentó significativamente la respuesta contráctil de la arteria renal a la ET-1, tanto en conejo control como en diabético. Este resultado es difícil de explicar; hubiera sido esperable bien una inhibición de la respuesta contráctil o bien una ausencia de influencia sobre dicha respuesta, en función de si el prostanoide vasoconstrictor fuera tromboxano A_2 o no. En la arteria carótida hemos visto cómo el furegrelate inhibió la respuesta arterial a la ET-1. Una posible explicación sería atribuir este aumento de la contracción al metabolito precursor del tromboxano A_2 , la prostaglandina H_2 , o bien, alternativamente, podríamos especular con un redireccionamiento de la ruta biosintética con producción de metabolitos vasoconstrictores más potentes que el tromboxano A_2 (por ejemplo, la prostaglandina $F_{2\alpha}$). De acuerdo con esta línea de especulación se ha publicado que el furegrelate redirecciona el metabolismo del ácido araquidónico hacia prostaglandinas vasodilatadoras en el riñón de la rata (Wilson *et al.*, 1993; Badahman y Wilson, 1994).

En el presente trabajo hemos estudiado también la participación de los receptores ET_A y ET_B en la respuesta de la arteria renal a la ET-1. En conejos control, el antagonista de los receptores de la endotelina ET_A , el BQ-123, inhibió de forma significativa la respuesta contráctil de la arteria renal a la ET-1, y el antagonista de los receptores ET_B , el BQ-788, aumentó

significativamente la acción contráctil de la ET-1. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en conejos (Evans *et al.*, 2000) y en ratas (Just *et al.*, 2004) mostrando una influencia neta vasoconstrictora de los receptores ET_A y una influencia vasodilatadora neta de los receptores ET_B en el flujo sanguíneo renal.

En conejos diabéticos, el BQ-123 produjo un aumento significativo de la contracción de la arteria renal a la ET-1, pero el BQ-788 no la modificó. Estos resultados sugieren que la diabetes induce un cambio en el papel de los receptores específicos ET_A y ET_B: la activación de los receptores ET_A tiene una influencia vasodilatadora neta mientras que la activación de los receptores ET_B no tiene influencia o, lo que es más probable, existe un equilibrio entre la influencia vasoconstrictora y vasodilatadora tras su activación. En ratas diabéticas Zucker se ha observado un cambio en el balance de las influencias vasoconstrictoras y vasodilatadoras mediadas por los receptores ET_A y ET_B respectivamente, dando como resultado un efecto predominantemente vasodilatador (Ajayi *et al.*, 2004). En presencia de BQ-788 la respuesta de las arterias renales procedentes de conejos diabéticos fue menor a la obtenida en arterias procedentes de conejos control. Este resultado sugiere que la menor sensibilidad a la ET-1 de la arteria renal en animales diabéticos podría estar relacionada con una menor actividad contráctil de los receptores ET_A. En pacientes con diabetes tipo 2 el bloqueo de los receptores ET_A no produjo vasodilatación, indicando que la vasoconstricción debida a la ET-1 endógena mediada por los receptores ET_A se encuentra alterada (McAuley *et al.*, 2000). En arterias mesentéricas de ratas diabéticas el efecto vasoconstrictor de la ET-

1 es menor que el obtenido en ratas control, indicando una desensibilización de los receptores ET_A, posiblemente debida a los elevados niveles de ET-1 en plasma (Makino y Kamata, 1998). Sin embargo, otros estudios realizados en pacientes con diabetes tipo 2 indican una actividad aumentada de la ET-1 endógena sobre los receptores ET_A en los vasos de resistencia; no obstante, la disminución de la acción contráctil de la ET-1 exógena observada en este estudio indica que el aumento de actividad está más relacionado con un incremento del nivel de ET-1 endógena que con una mayor sensibilidad del receptor ET_A (Cardillo *et al.*, 2002).

En este trabajo hemos estudiado la posible relación existente entre la pérdida de actividad del vasoconstrictor COX-1 en la diabetes y los cambios encontrados en el papel de los receptores específicos ET_A y ET_B. En arterias procedentes de conejos control, en presencia de BQ-123, la incubación con indometacina aumentó la respuesta contráctil a la ET-1, indicando, por tanto, la existencia de prostanooides con acción neta vasodilatadora activados por receptores ET_B. Por el contrario, en arterias procedentes de conejos diabéticos, en presencia de BQ-123, la incubación con indometacina inhibió la respuesta contráctil a la ET-1, señalando la existencia de una influencia neta vasoconstrictora de los prostanooides mediados por la activación de los receptores ET_B. La contracción de la vesícula biliar de cobayas causada a través de los receptores ET_B está mediada en gran medida por eicosanoides contráctiles (Nora *et al.*, 2000).

En arterias legradas procedentes de conejos control, la incubación con BQ-788 no modificó significativamente la acción contráctil de la ET-1. Este

resultado, junto con el aumento de la respuesta contráctil inducido por el BQ-788 en arterias con endotelio, sugiere que la activación de los receptores ET_B induce una vasodilatación que es dependiente de endotelio, probablemente mediada por NO y prostanooides vasodilatadores COX-2. Resultados similares se han obtenido mostrando que la activación de los receptores endoteliales ET_B produce vasodilatación mediada por NO y eicosanoides (Cardillo *et al.*, 2000; D'Orleans-Juste *et al.*, 2002). En arterias legradas procedentes de animales diabéticos, la incubación con BQ-788 aumentó la potencia contráctil de la ET-1, mostrando asimismo la existencia en la diabetes de una acción vasodilatadora mediada por receptores ET_B (probablemente a través de NO y prostanooides vasodilatadores COX-2). Por tanto, nuestros resultados sugieren que, en la diabetes, la activación de los receptores ET_B induce la liberación de prostanooides vasoconstrictores COX-1, los cuales contrarrestan la acción del NO y de los prostanooides vasodilatadores COX-2 liberados simultáneamente.

Finalmente, tanto en conejos control como en diabéticos, la incubación con indometacina de las arterias legradas preincubadas con BQ-788 produjo un aumento de la acción contráctil a la ET-1, sugiriendo así que la activación de los receptores ET_A induce la liberación por parte de las células del músculo liso de prostanooides con una actividad neta vasodilatadora. Otros estudios han referido la liberación de prostanooides vasodilatadores en respuesta a la activación de receptores ET_A (Wright y Malik, 1995; Nora *et al.*, 2000). La acción contráctil de la ET-1 en arterias legradas incubadas con BQ-788 más indometacina en conejos diabéticos fue menor que la acción correspondiente en arterias de conejo control. Debido a que en ausencia de

indometacina no se observaron diferencias significativas, estos resultados sugieren que la diabetes disminuye la actividad vasodilatadora de los prostanoïdes liberados por parte de las células del músculo liso en respuesta a la activación de los receptores ET_A. Obviamente, esta actividad vasodilatadora disminuida no explicaría la pérdida de influencia vasoconstrictora de la activación de los receptores ET_A observada en la diabetes, la cual probablemente podría explicarse por una alteración en la liberación de prostanoïde vasoconstrictor COX-1 en respuesta a la activación de dichos receptores.

En resumen, la diabetes induce cambios complejos en los mecanismos reguladores de la respuesta de la arteria renal del conejo a la ET-1: 1) aumento del NO endotelial; 2) alteración del balance entre prostanoïdes vasoconstrictores (COX-1) y vasodilatadores (COX-2) a favor de estos últimos; y 3) disminución del cociente entre prostanoïdes vasoconstrictores y vasodilatadores liberados tras la activación de los receptores ET_A, predominando esta disminución sobre el aumento de dicho cociente tras la activación del receptor ET_B. La suma de todos estos cambios tiene como resultado una disminución de la sensibilidad de la arteria renal a la ET-1.

CONCLUSIONES

1. La diabetes experimental modifica la respuesta vascular a la ET-1 de forma diferente dependiendo del lecho vascular estudiado.
2. La diabetes induce hiperreactividad de la arteria basilar de conejo a la ET-1 a través de, al menos, tres mecanismos: (1) menor modulación inhibitoria endotelial de esta respuesta, incluyendo la alteración de la actividad de los receptores endotelinérgicos ET_B endoteliales; (2) menor sensibilidad al NO de las células del músculo liso vascular; y (3) mayor participación de los receptores endotelinérgicos ET_A y ET_B musculares que median vasoconstricción.
3. La diabetes induce hiperreactividad de la arteria carótida de conejo a la ET-1 a través de, al menos, tres mecanismos: (1) mayor actividad de los receptores ET_A musculares; (2) alteración de la liberación de NO mediada por la activación de los receptores ET_B ; y (3) mayor producción de tromboxano A_2 .
4. La hiperreactividad de las arterias basilar y carótida a la endotelina-1 observada en la diabetes podría ser un factor condicionante del mayor riesgo de enfermedad cerebrovascular del paciente diabético.
5. La diabetes induce cambios complejos en los mecanismos reguladores de la respuesta de la arteria renal del conejo a la ET-1: (1) aumento del NO endotelial; (2) alteración del balance entre prostanoides vasoconstrictores (COX-1) y vasodilatadores (COX-2)

a favor de estos últimos; y (3) disminución del cociente entre prostanoides vasoconstrictores y vasodilatadores liberados tras la activación de los receptores ET_A, predominando esta disminución sobre el aumento de dicho cociente tras la activación del receptor ET_B. La suma de todos estos cambios tiene como resultado una disminución de la sensibilidad de la arteria renal a la ET-1.

6. Deberían valorarse las posibles implicaciones vasculares del uso terapéutico de fármacos inhibidores de la COX-1 y COX-2 y de fármacos relacionados con la ET-1 en el manejo del paciente diabético.

BIBLIOGRAFÍA

- Ajayi, A.A., Ogungbade, G.O., Hercule, H.C., Oyekan, A.O., Mutembei, L., 2004. Alteration in endothelin receptor sub-type responsiveness and in the endothelin-TXA₂ mimetic U46619 interaction, in type-2 hypertensive diabetic Zucker rats. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 63, 155-169.
- Alabadí, J.A., Miranda, F.J., Lloréns, S., Ruiz de Apodaca, R.F., Centeno, J.M., Alborch, E., 2001. Diabetes potentiates acetylcholine-induced relaxation in rabbit renal arteries. *Eur. J. Pharmacol.* 415, 225-232.
- Alabadí, J.A., Torregrosa, G., Miranda, F.J., Salom, J.B., Centeno, J.M., Alborch, E., 1997. Impairment of the modulatory role of nitric oxide on the endothelin-1-elicited contraction of cerebral arteries: a pathogenetic factor in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage? *Neurosurgery* 41, 245-253.
- Amezcuca, J.L., Palmer, R.M., de Souza, B.M., Moncada, S. 1989. Nitric oxide synthesized from L-arginine regulates vascular tone in the coronary circulation of the rabbit. *Br. J. Pharmacol.* 97, 1119-1124.
- Angulo, J., Cuevas, P., Fernandez, A., Gabancho, S., Allona, A., Martín-Morales, A., Moncada, I., Videla, S., Saenz de Tejada, I., 2003. Diabetes impairs endothelium-dependent relaxation of human penile vascular tissues mediated by NO and EDHF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312, 1202-1208.
- Badahman, A.H., Wilson, T.W., 1994. A renal vasodilator effect of angiotensin II revealed by dual thromboxane inhibition. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 72, 632-636.

- Barone, F.C., White, R.F., Elliott, J.D., Feuerstein, G.Z., Ohlstein, E.H., 1995. The endothelin receptor antagonist SB217242 reduces cerebral focal ischemic brain injury. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 26 (Suppl 3), S404-S407.
- Blauw, G.J., Westendorp, R.G., Srivastava, N., Burggraaf, K., Frolich, M., Simons, R., Cohen, A.F., Meinders, A.E., 1995. Hypoxia-induced arterial endothelin does not influence peripheral vascular tone. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 26 (Suppl 3), S242-S243.
- Bolton, T.B., Lang, R.J., Takewaki, T., 1984. Mechanisms of action of noradrenaline and carbachol on smooth muscle of guinea-pig anterior mesenteric artery. *J. Physiol.* 351, 549-572.
- Breyer, J.A., 1992. Diabetic nephropathy in insulin-dependent patients. *Am. J. Kidney Dis.* 20, 533-547.
- Calo, G., Gratton, J.P., Telemaque, S., D'Orleans-Juste, P., Regoli, D., 1996. Pharmacology of endothelins : vascular preparations for studying ET_A and ET_B receptors. *Mol. Cell Biochem.* 154, 31-37.
- Caplan, L.R., 1996. Diabetes and brain ischemia. *Diabetes* 45(suppl. 3), S95-S97.
- Cardell, L.O., Uddman, R., Edvinsson, L., 1994. Endothelins: a role in cerebrovascular disease? *Cephalalgia*, 14, 259-265.
- Cardillo, C., Campia, U., Bryant, M.B., Panza, J.A., 2002. Increased activity of endogenous endothelin in patients with type II diabetes mellitus. *Circulation* 106, 1783-1787.

- Cardillo, C., Kilcoyne, C.M., Cannon, R.O. Iii, Panza, J.A., 2000. Interactions between nitric oxide and endothelin in the regulation of vascular tone of human resistance vessels in vivo. *Hypertension* 35, 1237-1241.
- Cardillo, C., Kilcoyne, C.M., Waclawiw, M., Cannon, R.O. III, Panza, J.A., 1999. Role of endothelin in the increased vascular tone of patients with essential hypertension. *Hypertension* 33, 753-758.
- Cattaruzza, M., Berger, M.M., Ochs, M., Fayyazi, A., Fuzesi, L., Richter, J., Hecker, M., 2002. Deformation-induced endothelin B receptor-mediated smooth muscle cell apoptosis is matrix-dependent. *Cell Death Differ.* 9, 219-226.
- Chakrabarti, S., Cukiernik, M., Mukherjee, S., Chen, S., 2000. Therapeutic potential of endothelin receptor antagonists in diabetes. *Expert Opin. Investig. Drugs* 9, 2873-2888.
- Chakravarthy, U., McGinty, A., McKillop, J., Anderson, P., Archer, D.B., Trimble, E.R., 1994. Altered endothelin-1 induced contraction and second messenger generation in bovine retinal microvascular pericytes cultured in high glucose medium. *Diabetologia*, 37, 36-42.
- Chan, N.N., Vallance, P., Colhoun, H.M., 2000. Nitric oxide and vascular responses in Type I diabetes. *Diabetologia* 43, 137-147.
- Chen, G., Suzuki, H., Weston, A.H., 1988. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br. J. Pharmacol.* 95, 1165-1174.

-
- Chen, S., Evans, T., Mukherjee, K., Karmazyn, M., Chakrabarti, S., 2000. Diabetes-induced myocardial structural changes: role of endothelin-1 and its receptors. *J. Mol. Cell Cardiol.* 32, 1621-1629.
- Choi, K.C., Lee, S.C., Kim, S.W., Kim, N.H., Lee, J.U., Kang, Y.J., 1999. Role of nitric oxide in the pathogenesis of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J. Intern. Med.* 14, 32-41.
- Chow, M., Dumont, A.S., Kassell, N.F., 2002. Endothelin receptor antagonists and cerebral vasospasm: an update. *Neurosurgery* 51, 1333-1342.
- Cipolla, M.J., Porter, J.M., Osol, G., 1997. High glucose concentrations dilate cerebral arteries and diminish myogenic tone through an endothelial mechanism. *Stroke* 28, 405-411.
- Cohen, R.A., Weisbrod, R.M., 1988. Endothelium inhibits norepinephrine release from adrenergic nerves of rabbit carotid artery. *Am.J. Physiol.* 254, H871-H878.
- Cooperstein, S.J. y Watkins, D., 1981. *The Islets of Langerhans*. New York: Academic, 387-425.
- Cosentino, F., Eto, M., De Paolis, P., van der Loo, B., Bachschmid, M., Ullrich, V., Kouroedov, A., Delli Gatti, C., Joch, H., Volpe, M, Luscher, T.F., 2003. High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation* 107,1017-1023.

- Costa e Forti, A., Fonteles, M.C., 1998. Decreased endothelium dependent relaxation (nitric oxide) in diabetic kidneys. *Horm. Metab. Res.* 30, 55-57.
- Craven, P.A., Melhem, M.F., De Rubertis, F.R., 1992. Thromboxane in the pathogenesis of glomerular injury in diabetes. *Kidney Int.* 42, 937-946.
- Creager, M.A., Luscher, T.F., Cosentino, F., Beckman, J.A., 2003. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. *Circulation* 108, 1527-1532.
- Dai, F-X., Diederich, A., Skopec, J., Diederich, D., 1993. Diabetes-induced endothelial dysfunction in streptozotocin-treated rats: role of prostaglandin endoperoxides and free radicals. *J. Am. Soc. Nephrol.* 4, 1327-1336.
- Davenport, A.P., 2002. International Union of Pharmacology. XXIX. Update on endothelin receptor nomenclature. *Pharmacol. Rev.* 54, 219-226.
- De Vriese, A.S., Verbeuren, T.J., Van de Voorde, J., Lameire, N.H., Vanhoutte, P.M., 2000. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br. J. Pharmacol.* 130, 963-974.
- D'Orleans-Juste, P., Labonte, J., Bkaily, G., Choufani, S., Plante, M., Honore, J.C., 2002. Function of the endothelin B receptor in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Pharmacol. Ther.* 95, 221-238.
- Douglas, S.A., James, S., Hiley, C.R., 1991. Endothelial modulation and changes in endothelin pressor activity during hypoxia in the rat isolated perfused superior mesenteric arterial bed. *Br. J. Pharmacol.* 103, 1441-1448.

-
- Edwards, G., Dora, K.A., Gardener, M.J., Garland, C.J., Weston, A.H., 1998. K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* 396, 269-272.
- Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) 1999. Design, implementation, and preliminary results of a long-term follow-up of the Diabetes Control and Complications Trial cohort. *Diabetes Care* 22, 99-111.
- Esmatjes, E., Conget, J.I., Gaya, J., Fernandez, M.R., Ferrer, J.P., Rivera, F., Vilardell, E., 1990. Effects of thromboxane synthesis inhibitor triflusal on renal hemodynamics in microalbuminuric diabetic patients. *Diabetes Care* 13, 1114-1117.
- Esmatjes, E., De Alvaro, F., 2002. Incidence of diabetic nephropathy in Type 1 diabetic patients in Spain: 'Estudio Diamante'. *Diabetes. Res. Clin. Pract.* 57, 35-43.
- Espinosa, G., Lopez, Farre. A., Cernadas, M.R., Manzarbeitia, F., Tan, D., Digiuni, E., Mosquera, J.R., Monton, M., Millas, I., Hernando, L., Casado, S., Caramelo, C., 1996. Role of endothelin in the pathophysiology of renal ischemia-reperfusion in normal rabbits. *Kidney Int.* 50, 776 -782.
- Etienne, P., Pares-Herbute, N., Monnier, L., 1996. Enhanced antiproliferative effect of nitric oxide in cultured smooth muscle cells from diabetic rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 27, 140-146.

- Evans, R.G., Madden, A.C., Cotterill, E., 2000. ET-receptor subtypes: roles in regional renal vascular actions of exogenous and endogenous endothelins in anesthetized rabbits. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 35, 677-685.
- Faraci, F.M., Heistad, D.D., 1990. Regulation of large cerebral arteries and cerebral microvascular pressure. *Circ. Res.* 66, 8-17.
- Feletou, M., Rasetti, C., Duhault, J., 1994. Magnesium modulates endothelial dysfunction produced by elevated glucose incubation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 24, 470-478.
- Fineman, J.R., Heymann, M.A., Soifer, S.J., 1991. N-nitro-L-arginine attenuates endothelium-dependent pulmonary vasodilation in lambs. *Am. J. Physiol.* 260, H1299-H1306.
- Fitzgerald, S.M., Kemp-Harper, B.K., Tare, M., Parkington, H.C., 2005. Role of endothelium-derived hyperpolarizing factor in endothelial dysfunction during diabetes. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* 32, 482-487.
- Fukao, M., Hattori, Y., Kanno, M., Sakuma, I., Kitabatake, A., 1997. Alterations in endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries from streptozotocin-induced diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* 121, 1383-1391.
- Fukuroda, T., Fujikawa, T., Ozaki, S., Ishikawa, K., Yano, M., Nishikibe, M., 1994. Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199, 1461-1465.

-
- Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V., 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376.
- Gallois, C., Habib, A., Tao, J., Moulin, S., Maclouf, J., Mallat, A., Lotersztajn, S., 1998. Role of NF-kappaB in the antiproliferative effect of endothelin-1 and tumor necrosis factor-alpha in human hepatic stellate cells. Involvement of cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* 273, 23183-23190.
- Gauthier, K.M., Edwards, E.M., Falck, J.R., Reddy, D.S., Campbell, W.B., 2005. 14,15-epoxyeicosatrienoic acid represents a transferable endothelium-dependent relaxing factor in bovine coronary arteries. *Hypertension* 45, 666-71.
- Gebremedhin, D., Koltai, M.Z., Pogátsa, G., Magyar, K., Hadházy, P., 1988. Influence of experimental diabetes on the mechanical responses of canine coronary arteries: role of endothelium. *Cardiovasc. Res.* 22, 537-544.
- Gilbert, R.E., Rumble, J.R., Cao, Z., Cox, A.J., van Eeden, P., Allen, T.J., Kelly, D.J., Cooper, M.E., 2000. Endothelin receptor antagonism ameliorates mast cell infiltration, vascular hypertrophy, and epidermal growth factor expression in experimental diabetes. *Circ. Res.* 86,158-165.
- Graier, W.F., Grubenthal, I., Dittrich, P., Wascher, T.C., Kostner, G.M., 1995. Intracellular mechanism of high D-glucose-induced modulation of vascular cell proliferation. *Eur. J. Pharmacol.* 294, 221-229.

-
- Hadcock, S., Richardson, M., Winocour, P.D., Hatton, M.W., 1991. Intimal alterations in rabbit aortas during the first 6 months of alloxan-induced diabetes. *Arterioscler. Thromb.* 11, 517-529.
- Hart, W.M., Espinosa, C., Rovira, J., 1997. Costs of known diabetes mellitus in Spain. *Med. Clin.* 109, 289-293.
- Hattori, Y., Kawasaki, H., Kanno, M., 1999. Increased contractile responses to endothelin-1 and U46619 via a protein kinase C-mediated nifedipine-sensitive pathway in diabetic rat aorta. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 104, 73-80.
- Haynes, W.G., Webb, D.J., 1994. Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone. *Lancet* 344, 852-854.
- Henriksson, M., Stenman, E., Edvinsson, L., 2003. Intracellular pathways involved in upregulation of vascular endothelin type B receptors in cerebral arteries of the rat. *Stroke* 34, 1479-1483.
- Heyman, S.N., Clark, B.A., Kaiser, N., Epstein, F.H., Spokes, K., Rosen, S., Brezis, M., 1992. In-vivo and in-vitro studies on the effect of amphotericin B on endothelin release. *J. Antimicrob. Chemother.* 29, 69-77.
- Hodgson, W.C., King, R.G., 1992. Effects of glucose, insulin or aldose reductase inhibition on responses to endothelin-1 of aortic rings from streptozotocin-induced diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* 106, 644-9.
- Hopfner, R.L., Gopalakrishnan, V., 1999. Endothelin: emerging role in diabetic vascular complications. *Diabetologia* 42, 1383-1394.

- Hopfner, R.L., Mcneill, J.R., Gopalakrishnan, V., 1999. Endothelin plasma levels and endothelin-1 evoked vascular responses at different temporal stages of diabetes in streptozotocin diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* 374, 221-227.
- Horowitz, A., Menice, C.B., Laporte, R., Morgan, K.G., 1996. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol. Rev.* 76, 967-1003.
- Hu, J., Norman, M., Wallenstein, M., Gennser, G., 1998. Increased large arterial stiffness and impaired acetylcholine induced skin vasodilatation in women with previous gestational diabetes mellitus. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 105, 1279-1287.
- Huijberts, M.S., Wolffenbuttel, B.H., Boudier, H.A., Crijns, F.R., Kruseman, A.C., Poitevin, P., Levy, B.I., 1993. Aminoguanidine treatment increases elasticity and decreases fluid filtration of large arteries from diabetic rats. *J. Clin. Invest.* 92, 1407-1411.
- Hyslop, S., De Nucci, G., 1992. Vasoactive mediators released by endothelins. *Pharmacol. Res.* 26, 223-242.
- Ignarro, L.J., Harbison, R.G., Wood, K.S., Wolin, M.S., McNamara, D.B., Hyman, A.L., Kadowitz, P.J., 1985. Differences in responsiveness of intrapulmonary artery and vein to arachidonic acid: mechanism of arterial relaxation involves cyclic guanosine 3':5'-monophosphate and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 233, 560-569.

-
- Iino, K., Yoshinari, M., Yamamoto, M., Kaku, K., Doi, Y., Ichikawa, K., Iwase, M., Fujichima, M., 1996. Effect of glycated collagen on proliferation of human smooth muscle cells in vitro. *Diabetologia* 39, 800-806.
- Imig, J.D., Pham, B.T., LeBlanc, E.A., Reddy, K.M., Falck, J.R., Inscho, E.W., 2000. Cytochrome P450 and cyclooxygenase metabolites contribute to the endothelin-1 afferent arteriolar vasoconstrictor and calcium responses. *Hypertension* 35, 307-312.
- Inoguchi, T., Xia, P., Kunisaki, M., Higashi, S., Feener, E.P., King, G.L., 1994. Insulin's effect on protein kinase C and diacylglycerol induced by diabetes and glucose in vascular tissues. *Am. J. Physiol.* 267, E369-E379.
- Inoue, A., Yanagisawa, M., Takuwa, Y., Mitsui, Y., Kobayashi, M., Masaki, T., 1989. The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J. Biol. Chem.* 264, 14954-14959.
- Iwata, F., Joh, T., Kawai, T., Itoh, M., 1992. Role of EDRF in splanchnic blood flow of normal and chronic portal hypertensive rats. *Am. J. Physiol.* 263, G149-G154.
- Jones, .L.F., Brody, M.J., 1992. Coronary blood flow in rats is dependent on the release of vascular nitric oxide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 260, 627-631.
- Jörns, A., Munday, R., Tiedge, M., Lenzen, S., 1997. Comparative toxicity of alloxan, N-alkylalloxans and ninhydrin to isolated pancreatic islets in vitro. *J. Endocrinol.* 155, 283-293.

-
- Jun, H.S., Yoon, J.W., 2001. The role of viruses in type I diabetes: two distinct cellular and molecular pathogenic mechanisms of virus-induced diabetes in animals. *Diabetologia* 44, 271-285.
- Just, A., Olson, A.J., Arendshorst, W.J., 2004. Dual constrictor and dilator actions of ET_B receptors in the rat renal microcirculation: interactions with ET_A receptors. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 286, F660-F668.
- Kakoki, M., Hirata, Y., Hayakawa, H., Tojo, A., Nagata, D., Suzuki, E., Kimura, K., Goto, A., Kikuchi, K., Nagano, T., Omata, M., 1999. Effects of hypertension, diabetes mellitus, and hypercholesterolemia on endothelin type B receptor-mediated nitric oxide release from rat kidney. *Circulation* 99, 1242-1248.
- Kalogeropoulou, K., Mortzos, G., Migdalis, I. Velentzas, C., Mikhailidis, D.P., Georgiadis, E., Cordopatis, P., 2002. Carotid atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus: potential role of endothelin-1, lipoperoxides, and prostacyclin. *Angiology* 53, 279-285.
- Kamata, K., Miyata, N., Abiru, T., Kasuya, Y., 1992. Functional changes in vascular smooth muscle and endothelium of arteries during diabetes mellitus. *Life Sci.* 50, 1379-1387.
- Karasu, C, Altan V.M., 1993. The role of endothelial cells on the alterations in vascular reactivity induced by insulin-dependent diabetes mellitus: effects of insulin treatment. *Gen. Pharmacol.* 24, 743-755.

-
- Kauser, K., Rubanyi, M., Harder, D.R., 1990. Endothelium-dependent modulation of endothelin-induced vasoconstriction and membrane depolarization in cat cerebral arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 252, 93-97.
- Kawamura, M., Ohgawara, H., Naruse, M., Suzuki, N., Iwasaki, N., Naruse, K., Hori, S., Demura, H., Omori, Y., 1992. Increased plasma endothelin in NIDDM patients with retinopathy. *Diabetes Care* 15, 1396-1397.
- Kiff, R.J., Gardiner, S.M., Compton, A.M., Bennet, T., 1991. The effects of endothelin-1 and NG-nitro-L-arginine methyl ester on regional haemodynamics in conscious rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Br. J. Pharmacol.* 103, 1321-1326.
- King, G.L., Kunisaki, M., Nishio, Y., Inoguchi, T., Shiba, T., Xia, P., 1996. Biochemical and molecular mechanisms in the development of diabetic vascular complications. *Diabetes* 45, 105-108.
- Knock, G.A., McCarthy, A.L., Lowy, C., Poston, L., 1997. Association of gestational diabetes with abnormal maternal vascular endothelial function. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 104, 229-234.
- Koepp, J., Cardozo, A.M., D'Orleans-Juste, P., Rae, G.A., 2002. Influence of indomethacin on effects of endothelin-1 on guinea pig isolated rings of common bile duct and sphincter of Oddi. *Eur. J. Pharmacol.* 435, 103-111.
- Koltai, M.Z., Rosen, P., Ballagi-Pordany, G., Hadhazy, P., Pogatsa, G., 1990. Increased vasoconstrictor response to noradrenaline in femoral vascular

bed of diabetic dogs. Is thromboxane A₂ involved? *Cardiovasc. Res.* 24, 707-710.

Koltai, M.Z., Hadházy, P., Pósa, I., Kocsis, E., Winkler, G., Rösen, P., Pogátsa, G., 1997. Characteristics of coronary endothelial dysfunction in experimental diabetes. *Cardiovasc Res.* 4, 157-163.

Kon, V., Sugiura, M., Inagami, T., Harvie, B.R., Ichikawa, I., Hoover, R.L., 1990. Role of endothelin in cyclosporine-induced glomerular dysfunction. *Kidney Int* 37, 1487-1491.

Kourembanas, S., McQuillan, L.P., Leung, G.K., Faller, D.V., 1993. Nitric oxide regulates the expression of vasoconstrictors and growth factors by vascular endothelium under both normoxia and hypoxia. *J. Clin. Invest.* 92, 99 -104.

Kourembanas, S., McQuillan, L.P., Leung, G.K., Faller, D.V., 1993. Nitric oxide regulates the expression of vasoconstrictors and growth factors by vascular endothelium under both normoxia and hypoxia. *J. Clin. Invest.* 92, 99-104.

Kraus, G.E., Bucholz, R.D., Yoon, K.W., Knuepfer, M.M., Smith, K.R Jr., 1991. Cerebrospinal fluid endothelin-1 and endothelin-3 levels in normal and neurosurgical patients: a clinical study and literature review. *Surg. Neurol.* 35, 20-29.

-
- Kukovetz, W.R., Holzmann, S., Wurm, A., Poch, G., 1979. Prostacyclin increases cAMP in coronary arteries. *J. Cyclic. Nucleotide Res.* 5, 469-476.
- Kurihara, T., Akimoto, M., Kurokawa, K., Ishiguro, H., Niimi, A., Maeda, A., Shigemoto, M., Yamashita, K., Yokoyama, I., Hirayama, Y., Ihara, M., Yano, M., 1992. Relationship between endothelin and thromboxane A₂ in rat liver microcirculation. *Life Sci.* 51, 281-285.
- Kurihara, Y., Kurihara, H., Suzuki, H., Kodama, T., Maemura, K., Nagai, R., Oda, H., Kuwaki, T., Cao, W.H., Kamada, N., Jishage, K., Ouchi, Y., Azuma, S., Toyoda, Y., Ishikawa, T., Kumada, M., Yazaki, Y., 1994. Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature* 368, 703-10.
- Kurzrok, R., Lieb, C.C., 1930. Biochemical studies on human semen II. action of semen on human uterus. *Proceedings: experimental Biology and Medicine* 28, 268-272.
- Lagaud, G.J., Masih-Khan, E., Kai, S., Van Breemen, C., Dube, G.P., 2001. Influence of type II diabetes on arterial tone and endothelial function in murine mesenteric resistance arteries. *J. Vasc. Res.* 38, 578-589.
- Lam, H.C., Lee, J.K., Chiang, H.T., Koh, S.J., Han, T.M., Lu, C.C., Yang, C.Y., Hao, L.J., 1995. Does endothelin play a role in the pathogenesis of early diabetic nephropathy? *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 26(Suppl. 3), S479-S481.

- Lauth, M., Berger, M., Cattaruzza, M., Hecker, M., 2000. Elevated perfusion pressure upregulates endothelin-1 and endothelin B receptor expression in the rabbit carotid artery. *Hypertension* 35, 648-654.
- Lenzen, S., Panten, U., 1988. Alloxan: history and mechanism of action. *Diabetologia*, 337-342.
- Lodge, N.J., Zhang, R., Halaka, N.N., Moreland, S., 1995. Functional role of endothelin ET_A and ET_B receptors in venous and arterial smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 287, 279-285.
- Lomnicka, M., Karouni, K., Sue, M., Wessel, L.A., Bing, R.J., 2003. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on prostacyclin and thromboxane in the kidney. *Pharmacology* 68, 147-153.
- Lowenstein, C.J., Dinerman, J.L., Snyder, S.H., 1994. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann. Intern. Med.* 120, 227-237.
- Lukovits, T.G., Mazzone, T., Gorelick, P.B., 1999. Diabetes mellitus and cerebrovascular disease. *Neuroepidemiology* 18, 1-14.
- Maguire, J.J., Davenport, A.P., 1995. ETA receptor-mediated constrictor responses to endothelin peptides in human blood vessels in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 115, 191-197.
- Makino, A., Kamata, K., 1998. Possible modulation by endothelin-1, nitric oxide, prostaglandin I₂ and thromboxane A₂ of vasoconstriction induced by an alpha-agonist in mesenteric arterial bed from diabetic rats. *Diabetologia* 41, 1410-1418.

- Masaki, T., 1995. Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35, 235-255.
- Mather, K.J., Lteif, A., Steinberg, H.O., Baron, A.D., 2004. Interactions between endothelin and nitric oxide in the regulation of vascular tone in obesity and diabetes. *Diabetes* 53, 2060-2066.
- Mather, K.J., Mirzamohammadi, B., Lteif, A., Steinberg, H.O., Baron, A.D., 2002. Endothelin contributes to basal vascular tone and endothelial dysfunction in human obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 51, 3517-3523.
- Matoba, T., Shimokawa, H., 2003. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *J. Pharmacol. Sci.* 92, 1-6.
- Mayhan, W.G., 1998. Constrictor responses of the rat basilar artery during diabetes mellitus. *Brain Res.* 783, 326-331.
- Mayhan, W.G., Irvine, S.D., Sharpe, G.M., 1999. Constrictor responses of resistance arterioles during diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 44, 147-156.
- McAuley, D.F., Nugent, A.G., McGurk, C., Maguire, S., Hayes, J.R., Johnston, G.D., 2000. Vasoconstriction to endogenous endothelin-1 is impaired in patients with type II diabetes mellitus. *Clin. Sci. (Lond.)* 99, 175-179.
- McIntyre, C.A., Hadoke, P.W.F., Williams, B.C., Lindsay, R.M., Elliot, A.I., McKnight, J.A., 2001. Selective enhancement of sensitivity to endothelin-1

despite normal endothelium-dependent relaxation in subcutaneous resistance arteries isolated from patients with type I diabetes. *Clin. Sci.* 100, 311-318.

McNally, P.G., Watt, P.A.C., Rimmer, T., Burden, A.C., Hearnshaw, J.R., Thurston, H., 1994. Impaired contraction and endothelium-dependent relaxation in isolated resistance vessels from patients with insulin dependent diabetes mellitus. *Clin. Sci.* 87, 31-36.

Miao, L., Dai, Y., Zhan, J., 2002. Mechanism of RhoA/Rho kinase activation in endothelin-1- induced contraction in rabbit basilar artery. *Am. J. Physiol.* 283, H983-H989.

Milsom, A.B., Jones, C.J., Goodfellow, J., Frenneaux, M.P., Peters, J.R., James, P.E., 2002. Abnormal metabolic fate of nitric oxide in Type I diabetes mellitus. *Diabetologia* 45,1515-1522.

Miranda, F.J., Alabadí, J.A., Lloréns, S., Ruiz de Apodaca, R.F., Centeno, J.M., Alborch, E., 2000a. Influence of experimental diabetes on regulatory mechanisms of vascular response of rabbit carotid artery to acetylcholine. *Life Sci.* 66, 2071-2080.

Miranda, F.J., Alabadí, J.A., Lloréns, S., Ruiz de Apodaca, R.F., Centeno, J.M., Alborch, E., 2000b. Diabetes-induced changes in endothelial mechanisms implicated in rabbit carotid arterial response to 5-hydroxytryptamine. *Eur. J. Pharmacol.* 401, 397-402.

-
- Miranda, F.J., Alabadí, J.A., Lloréns, S., Ruiz de Apodaca, R.F., Centeno, J.M., Alborch, E., 2002. Experimental diabetes induces hyperreactivity of rabbit renal artery to 5-hydroxytryptamine. *Eur. J. Pharmacol.* 439, 121-127.
- Miyataka, M., Rich, K.A., Ingram, M., Yamamoto, T., Bing, R.J., 2002. Nitric oxide, anti-inflammatory drugs on renal prostaglandins and cyclooxygenase-2. *Hypertension* 39, 785-789.
- Miyauchi, T., Masaki, T., 1999. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu. Rev. Physiol.* 61, 391-415.
- Mogyorosi, A., Ziyadeh, F.N., 1996. Update on pathogenesis, markers and management of diabetic nephropathy. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 5, 243-53.
- Mohr, J.P., Albers, G.W., Amarenco, P., Babikian, V.L., Biller, J., Brey, R.L., Coull, B., Easton, J.D., Gomez, C.R., Helgason, C.M., Kase, C.S., Pullicino, P.M., Turpie, A.G., 1997. American Heart Association Prevention Conference. IV. Prevention and Rehabilitation of Stroke. Etiology of stroke. *Stroke* 28, 1501-1506.
- Moncada, S., Higgs, A., Furchgott, R., 1997. XIV International Union of Pharmacology Nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacol. Rev.* 49, 137-142.
- Morrish, N.J., Wang, S.L., Stevens, L.K., Fuller, J.H., Keen, H., 2001. Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia* 44 (Suppl 2), S14-S21.

- Mulhern, M. Docherty, J.R., 1989. Effects of experimental diabetes on the responsiveness of rat aorta. *Br. J. Pharmacol.* 97,1007-1012.
- Munday, R., Ludwig, K., Lenzen, S., 1993. The relationship between the physicochemical properties and the biological effects of alloxan and several N-alkyl substituted alloxan derivatives. *J. Endocrinol.* 139, 153-163.
- Murad, F., 1986. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J. Clin. Invest.* 78, 1-5.
- Napoli, C., Ignarro, L.J., 2003. Nitric oxide-releasing drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 97-123.
- Neubauer, B., Gundersen, H.J., 1983. Calcifications, narrowing and rugosities of the leg arteries in diabetic patients. *Acta Radiol. Diagn. (Stockh)* 24, 401-413.
- Nishizuka, Y., 1988. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334, 661-665.
- Nora, H.C., Cardozo, A.M., D'Orleans-Juste, P., Rae, G.A., 2000. Influences of indomethacin on contractions induced by endothelins in guinea pig isolated gallbladder. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 36(Suppl. 1), S267-S269.
- Nozaki, K., Moskowitz, M.A., Maynard, K.I., Koketsu, N., Dawson, T.M., Bredt, D.S., Snyder, S.H., 1993. Possible origins and distribution of immunoreactive nitric oxide synthase-containing nerve fibers in cerebral arteries. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 13, 70-79.

- Nugent, A.G., McGurk, C., Hayes, J.R., Johnston, G.D., 1996. Impaired vasoconstriction to endothelin 1 in patients with NIDDM. *Diabetes* 45, 105-107.
- Oberley, L.W., 1988. Free radicals and diabetes. *Radic. Biol. Med.* 5, 113-124.
- Okumura, M., Imanishi, M., Yamashita, T., Yamamura, Y., Kim, S., Iwao, H., Tanaka, S., Fujii, S., 2000. Renal production of thromboxane and prostaglandins in a rat model of type 2 diabetes. *Life Sci.* 66, 371-377.
- Oliva, J., Lobo, F., Molina, B., Monereo, S., 2004. Direct health care costs of diabetic patients in Spain. *Diabetes Care* 27, 2616-2621.
- Oyekan, A.O., McGiff, J.C., 1998. Cytochrome P-450-derived eicosanoids participate in the renal functional effects of ET-1 in the anesthetized rat. *Am. J. Physiol.* 274, R52-R61.
- Öztürk, Y., Altan, V.M., Yildizoğlu-Ari, N., 1996. Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. *Pharmacol. Rev.* 48, 69-112.
- Pagano, P.J., Griswold, M.C., Ravel, D., Cohen, R.A., 1998. Vascular action of the hypoglycaemic agent gliclazide in diabetic rabbits. *Diabetologia* 41, 9-15.
- Palmer, R.M., Ferrige, A.G., Moncada, S., 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524-526.

- Petersson, J., Andersson, K.E., Brandt, L., Hogestatt, E.D., 1997. Modulation by the endothelium of the inhibitory effects of pinacidil and nimodipine on endothelin-induced contraction in cerebral arteries. *Pharmacol. Toxicol.* 80, 30-37.
- Pieper, G.M., 1990. Arachidonic acid causes postischemic dysfunction in control but not diabetic hearts. *Am. J. Physiol.* 258, H923-H930.
- Quilley, J., Chen, Y.J., 2003. Role of COX-2 in the enhanced vasoconstrictor effect of arachidonic acid in the diabetic rat kidney. *Hypertension* 42, 837-843.
- Rae, G.A., Calixto, J.B., D'Orleans-Juste, P., 1995. Effects and mechanisms of action of endothelins on non-vascular smooth muscle of the respiratory, gastrointestinal and urogenital tracts. *Regul. Pept.* 55, 1-46.
- Randall, M.D., Douglas, S.A., Hiley, C.R., 1989. Vascular activities of endothelin-1 and some alanyl substituted analogues in resistance beds of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 98, 685-699.
- Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2002. *Diabetes Care* 25, S5-S20.
- Resink, T.J., Hahn, A.W., Scott-Burden, T., Powell, J., Weber, E., Buhler, F.R., 1990. Inducible endothelin mRNA expression and peptide secretion in cultured human vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 168, 1303-1130.

-
- Robbins., 2000. Patología estructural y funcional. 6ª edición. Mc Graw Hill Interamericana.
- Rubio, J.A., Alvarez, J., 1998. Economic costs of diabetes mellitus: critical review and cost-benefit evaluation of proposed strategies for its reduction *Aten. Primaria* 15, 239-255
- Ruderman, N.B., Williamson, J.R., Brownlee, M., 1992. Glucose and diabetic vascular disease. *FASEB J.* 6, 2905-2914.
- Ruschitzka, F., Shaw, S., Gygi, D., Noll, G., Barton, M., Luscher, T.F., 1999. Endothelial dysfunction in acute renal failure: role of circulating and tissue endothelin-1. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 953-962.
- Russell, F.D., Skepper, J.N., Davenport, A.P., 1998. Endothelin peptide and converting enzymes in human endothelium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 31, S19-S21. (a)
- Russell, F.D., Skepper, J.N., Davenport, A.P., 1998. Human endothelial cell storage granules: a novel intracellular site for isoforms of the endothelin-converting enzyme. *Circ. Res.* 83, 314-321. (b)
- Sakata, K., Ozaki, H., Kwon, S.C., Karaki, H., 1989. Effects of endothelin on the mechanical activity and the cytosolic calcium level of various types of smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 98, 483-492.
- Salom, J.B., Centeno, J.M., Torregrosa, G., Ortí, M., Barberá, M.D., Alborch, E., 2000. Vasoconstriction to endothelin-1 in the goat middle cerebral artery after transient global cerebral ischemia. *J. Stroke Cereb. Dis.* 9, 16-21.

-
- Salom, J.B., Torregrosa, G., Miranda, F.J., Alabadí, J.A., Álvarez, C., Alborch, E., 1991. Effects of endothelin-1 on the cerebrovascular bed of the goat. *Eur. J. Pharmacol.* 192, 39-45.
- Sanz, E., Fernández, N., Monge, L., Martínez, M.A., Climent, B., Diéguez, G., García-Villalón, A.L., 2003. Effects of diabetes on the vascular response to nitric oxide and constrictor prostanoids: gender and regional differences. *Life Sci.* 72, 1537-1547.
- Sarman, B., Farkas, K., Toth, M., Somogyi, A., Tulassay, Z., 2000. Circulating plasma endothelin-1, plasma lipids and complications in Type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Nutr. Metab.* 13, 142-148.
- Sarman, B., Toth, M., Somogyi, A., 1998. Role of endothelin-1 in diabetes mellitus. *Diabetes Metab. Rev.* 14, 171-175.
- Savage, M.W., Bodmer, C.W., Walker, A.B., Buchan, I.E., Masson, E.A., Williams, G., 1995. Vascular reactivity to noradrenaline and neuropeptide Y in the streptozotocin-induced diabetic rat. *Eur. J. Clin. Invest.* 25, 974-979.
- Schalkwijk, C.G., Stehouwer, C.D., 2005. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clin. Sci. (Lond)* 109, 143-159.
- Schneider, J.G., Tilly, N., Hierl, T., Sommer, U., Hamann, A., Dugi, K., Leidig-Bruckner, G., Kasperk, C., 2002. Elevated plasma endothelin-1 levels in diabetes mellitus. *Am. J. Hypertens.* 15, 967-972.

-
- Schramek, H., Wang, Y., Konieczkowski, M., Simonson, M.S., Dunn, M.J., 1994. Endothelin-1 stimulates cytosolic phospholipase A2 activity and gene expression in rat glomerular mesangial cells. *Kidney Int.* 46,1644-1652.
- Schumacher, K., Castrop, H., Strehl, R., de Vries, U., Minuth, W.W., 2002. Cyclooxygenases in the collecting duct of neonatal rabbit kidney. *Cell Physiol. Biochem.* 12, 63-74.
- Seligman, B.G., Biolo, A., Polanczyk, C.A., Gross, J.L., Clausell, N., 2000. Increased plasma levels of endothelin 1 and von Willebrand factor in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care* 23, 1395-1400.
- Shiba, R., Yanagisawa, M., Miyauchi, T., Ishii, Y., Kimura, S., Uchiyama, Y., Masaki, T., Goto. K., 1989. Elimination of intravenously injected endothelin-1 from the circulation of the rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 13 (Suppl 5), S98- S102.
- Shirahase, H., Usui, H., Shimaji, H., Kurahashi, K., Fujiwara, N., 1991. Endothelium-independent and-dependent contractions induced by endothelin-1 in canine basilar arteries. *Life Sci.* 49, 273-281.
- Sikorski, B.W., James, G.M., Glance, S.D., Hodgson, W.C., King, R.G., 1993. Effect of endothelium on diabetes-induced changes in constrictor responses mediated by 5-hydroxytryptamine in rat aorta. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 22, 423-430.

- Simonson, M.S., Dunn, M.J., 1992. The molecular mechanisms of cardiovascular and renal regulation by endothelin peptides. *J. Lab. Clin. Med.* 119, 622-639
- Smith, L.H., Boutaud, O., Breyer, M., Morrow, J.D., Oates, J.A., Vaughan, D.E., 2002. Cyclooxygenase-2-dependent prostacyclin formation is regulated by low density lipoprotein cholesterol in vitro. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 983-988.
- Smith, W.L., DeWitt, D.L., Garavito, R.M., 2000. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 145-182.
- Smith, W.L., Garavito, R.M., DeWitt, D.L., 1996. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 271, 33157-33160.
- Sobrevia, L., Mann, G.E., 1997. Dysfunction of the endothelial nitric oxide signalling pathway in diabetes and hyperglycaemia. *Exp. Physiol.* 82, 423-52.
- Sorokin, A., Kohan, D.E., 2003. Physiology and pathology of endothelin-1 in renal mesangium. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 285, F579-F589.
- Stehouwer, C.D., Lambert, J., Donker, A.J., Van Hinsbergh, V.W., 1997. Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy. *Cardiovasc. Res.* 34, 55-68.
- Taddei, S., Vanhoutte, P.M., 1993. Role of endothelium in endothelin-evoked contractions in the rat aorta. *Hypertension* 21, 9-15.

- Takayasu, M., Kondo, K., Terao, S., 1989. Endothelin-induced mobilization of Ca^{2+} and the possible involvement of platelet activating factor and thromboxane A_2 . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160, 751-789.
- Takeda, Y., Miyamori, I., Yoneda, T., Takeda, R., 1991. Production of endothelin-1 from the mesenteric arteries of streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.* 48, 2553-2556.
- Takuwa, Y., 1993. Endothelin in vascular and endocrine systems: biological activities and its mechanisms of action. *Endocr. J.* 40, 489-506.
- Tam, E.S., Ferguson, D.G., Bielefeld, D.R., Lorenz, J.N., Cohen, R.M., Pun, R.Y., 1997. Norepinephrine-mediated calcium signaling is altered in vascular smooth muscle of diabetic rat. *Cell Calcium* 21, 143-150.
- Tanaka, K., Gotoh, F., Gom,i S., Takashima, S., Mihara, B., Shirai, T., Nogawa, S., Nagata, E., 1991. Inhibition of nitric oxide synthesis induces a significant reduction in local cerebral blood flow in the rat. *Neurosci. Lett.* 127, 129-132.
- Tasaka, K., Kitazumi, K., 1994. The control of endothelin-1 secretion. *Gen. Pharmacol.* 25, 1059-1069.
- Taylor, P.D., Graves, J.E., Poston, L., 1995. Selective impairment of acetylcholine-mediated endothelium-dependent relaxation in isolated resistance arteries of the streptozotocin-induced diabetic rat. *Clin. Sci. (Lond)* 88, 519-524.

- Taylor, S.G., Weston, A.H., 1988. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. *Trends Pharmacol. Sci.* 9, 272-274.
- Tesfamariam, B., Brown, M.L., Deykin, D., Cohen, R.A., 1990. Elevated glucose promotes generation of endothelium-derived vasoconstrictor prostanoids in rabbit aorta. *J. Clin. Invest.* 85, 929-932.
- Tesfamariam, B., Jakubowski, J.A., Cohen, R.A., 1989. Contraction of diabetic rabbit aorta caused by endothelium-derived PGH₂-TxA₂. *Am. J. Physiol.* 257, H1327- H1333.
- Therland, K.L., Stubbe, J., Thiesson, H.C., Ottosen, P.D., Walter, S., Sorensen, G.L., Skott, O., Jensen, B.L., 2004. Cyclooxygenase-2 is expressed in vasculature of normal and ischemic adult human kidney and is colocalized with vascular prostaglandin E₂ EP4 receptors. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15, 1189-1198.
- Tirapelli, C.R., Casolari, D.A., Yogi, A., Montezano, A.C., Tostes, R.C., Legros, E., D'Orleans-Juste, P., de Oliveira, A.M., 2005. Functional characterization and expression of endothelin receptors in rat carotid artery: involvement of nitric oxide, a vasodilator prostanoid and the opening of K⁺ channels in ETB-induced relaxation. *Br. J. Pharmacol.* 146, 903-912.
- Toda, N., Okamura, T., 1990. Mechanism underlying the response to vasodilator nerve stimulation in isolated dog and monkey cerebral arteries. *Am. J. Physiol.* 259, H1511-H1517.

- Urakami-Harasawa, L., Shimokawa H., Nakashima, M., Egashira, K., Takeshita, A., 1997. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. *J. Clin. Invest.* 100, 2793-2799.
- Uriu, K., Kaizu, K., Hashimoto, O., Komine, N., Etoh, S., 1994. Acute and chronic effects of thromboxane A2 inhibition on the renal hemodynamics in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kidney Int.* 45, 794-802.
- Vallance, P., Chan, N., 2001. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart* 85, 342-350.
- Veelken, R., Hilgers, K.F., Hartner, A., Haas, A., Bohmer, K.P., Sterzel, R.B., 2000. Nitric oxide synthase isoforms and glomerular hyperfiltration in early diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11, 71-79.
- Von Euler, U.S., 1936. On the specific vasodilating and plain muscle stimulating substances from accessory genital glands in man and certain animals (prostaglandin and vesiglandin). *J. Physiol.*, 28, 213-214.
- Wakabayashi, I., Hatake, K., Kimura, N., Kakishita, E., Nagai, K., 1987. Modulation of vascular tonus by the endothelium in experimental diabetes. *Life Sci.* 40, 643-648.
- Webb, J.L., 1966. *Enzyme and Metabolic Inhibitors: Iodoacetate, Maleate, N-Ethylmaleimide, Alloxan, Quinones, Arsenicals.* Volume III. Academic Press, New York and London.

-
- Wilson, T.W., Badahman, A.H., Kaushal, R.D., 1993. Thromboxane synthase inhibition enhances furosemide-induced renal vasodilation. *Clin. Invest. Med.* 16, 372-378.
- White, D.G., Cannon, T.R., Garrat, H., Mundin, J.W., Sumner, M.J., Watts, I.S., 1993. Endothelin ET_A and ET_B receptors mediate vascular smooth-muscle contraction. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 22 (suppl. 8), S144-S148.
- Winterbourn, C.C. y Munday, R., 1989. Glutathione-mediated redox cycling of alloxan. Mechanisms of superoxide dismutase inhibition and of metal-catalyzed OH formation. *Biochem. Pharmacol.* 38, 271-277.
- Wright, H.M., Malik, K.U., 1995. Prostacyclin synthesis elicited by endothelin-1 in rat aorta is mediated by an ET_A receptor via influx of calcium and is independent of protein kinase C. *Hypertension* 26, 1035-1040.
- Yamada, K., Nakano, H., Nakayama, M., Nozaki, O., Miura, Y., Nishimura, M., Tsuchida, H., Mimura, N., 1995. Endothelium-dependent relaxation in peripheral vasculature and kidney of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Diabetes Complications* 9, 203-207.
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., Masaki, T., 1988. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332, 411-415.
- Yousif, M.H., Benter, I.F., Abraham, S., Akhtar, S., 2004. Inhibition of Ras-GTPase improves diabetes-induced abnormal vascular reactivity in the rat perfused mesenteric vascular bed. *Med. Princ. Pract.* 13, 57-62.

Yuan, S., Liu Y., Zhu, L., 1999. Vascular complications of diabetes mellitus. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 26, 977-978.

Yukimura, T., Yamashita, Y., Miura, K., Okumura, M., Yamanaka, S., Yamamoto, K., 1992. Renal effects of the nitric oxide synthase inhibitor, L-N^G-nitroarginine, in dogs. Am. J. Hypertens. 5, 484-487.

Zuccarello, M., Boccaletti, R., Rapoport, R.M., 1998. Endothelin ET(B1) receptor-mediated relaxation of rabbit basilar artery. Eur. J. Pharmacol. 357, 67-71.