

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

INFLUENCIA DE LA DIABETES EXPERIMENTAL SOBRE
LA REACTIVIDAD DE LA ARTERIA RENAL DE CONEJO

ROSA FUSTER RUIZ DE APODACA

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2004

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 14 de Juliol de 2004 davant un tribunal format per:

- Dr. D. Eduardo Nava Hernández
- Dr. D. Francisco Pérez Sánchez
- Dra. D^a. Silvia Llorens Folgado
- Dr. D. Antonio M. Alberola Aguilar
- Dr. D. José María Vila Salinas

Va ser dirigida per:

D. Enrique Alborch Domínguez

D. Francisco J. Miranda Alonso

D. J. Antonio Alabadí Ferrer

©Copyright: Servei de Publicacions
Rosa Fuster Ruiz De Apodaca

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6069-9

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 LA ARTERIA
RENAL DE CONEJO**

Memoria presentada por:

Dña. Rosa Fuster Ruiz de Apodaca

para optar al Grado de Doctor.

Burjassot, enero de 2004.

D. **ENRIQUE ALBORCH DOMÍNGUEZ**, Catedrático de Fisiología de la Universitat de València, D. **JOSÉ ANTONIO ALABADÍ FERRER**, Profesor Titular 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. **ROSA FUSTER RUIZ DE APODACA**, Licenciada con Grado en Farmacia ha realizado bajo nuestra dirección el presente trabajo experimental para la realización de su Tesis Doctoral: "**INFLUENCIA DE LA DIABETES EXPERIMENTAL SOBRE LA REACTIVIDAD DE LA ARTERIA RENAL DE CONEJO**" en el Departamento de Fisiología de la Universitat de València.

Y para que así conste, expedimos el presente en Valencia, a 30 de enero de 2004

Dr. Enrique Alborch

Dr. José A. Alabadí

Dr. Francisco J. Miranda

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero resaltar mi más sincero agradecimiento a los directores de esta tesis, sin cuyo apoyo incondicional este trabajo no se hubiera podido realizar:

Al Dr. **Enrique Alborch** por haberme dado la posibilidad de incorporarme a este grupo de investigación y a los Dres. **José Antonio Alabadí** y **Francisco Javier Miranda**, por todo lo que me habéis enseñado, el tiempo que me habéis dedicado, por vuestra paciencia, pero sobre todo por haberme animado en todo momento.

A Silvia, porque sin su ayuda esta tesis no existiría. Muchas gracias por estar ahí en los buenos y malos momentos. Sin amigas como tú la vida sería muy aburrida.

A Ángela, Jose y Vannina y a todos los miembros del equipo que en algún momento han participado en este trabajo.

A Salva por la asistencia técnica.

A mis padres, por haberme animado y apoyado en mis estudios.

A Carlos, por toda su paciencia y por compartir su vida conmigo.

A mi hermana y hermanos

ABREVIATURAS

5-HT: 5-hidroxitriptamina

Ach: acetilcolina

ADA: Asociación Americana de Diabetes

ADN: ácido desoxirribonucleico

AMP: adenosín monofosfato

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

ATP: adenosín trifosfato

CE₅₀: concentración eficaz 50

EDHF: factor hiperpolarizante derivado del endotelio

EDRF: factor relajante derivado del endotelio

EEM: error estándar de la media

E_{max}: efecto máximo

eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial

ET: endotelina

ET-1: endotelina-1

ET-2 : endotelina-2.

ET-3: endotelina-3.

GMP_C: guanosin monofosfato cíclico

IDDM: diabetes mellitus insulino-dependiente

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

L-NA: N⁶-nitro-L-arginina

NIDDM: diabetes mellitus no insulino-dependiente

nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintasa

OMS: Organización Mundial de la Salud

PGI₂: prostaglandina I₂, prostaciclina

STZ: estreptozotocina

TxA₂: Tromboxano A₂

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. DIABETES MELLITUS	2
1.1. Generalidades	2
1.2. Diabetes y afectación renal	6
2. MODELOS DE DIABETES EXPERIMENTAL	8
2.1. Diabetes química	8
2.2. Diabetes quirúrgica	9
2.3. Diabetes viral	10
2.4. Diabetes espontánea	10
3. DIABETES Y FUNCIÓN VASCULAR	11
3.1. Mecanismo básico de contracción del músculo liso	11
3.2. Papel del endotelio en la regulación vascular	13
3.3. Importancia de las alteraciones vasculares en la fisiopatología y clínica de la diabetes mellitus	19
3.3.1. Cambios estructurales en la pared arterial inducidos por la diabetes	20
3.3.2. Cambios en la función arterial producidos en la diabetes	24
OBJETIVOS	29
MATERIAL Y MÉTODOS	31
1. INDUCCIÓN DE LA DIABETES EXPERIMENTAL	32
2. REGISTRO DE LA TENSIÓN ISOMÉTRICA DESARROLLADA POR SEGMENTOS DE ARTERIA RENAL DE CONEJO	34
2.1. Obtención y montaje de los segmentos arteriales	34
2.2. Técnicas de registro y medición	36
2.3. Procedimiento experimental	36
2.4. Protocolo experimental	38
2.4.1. Estudio de la respuesta de la arteria renal de conejo a la Ach y del efecto de la diabetes experimental sobre dicha respuesta	38
2.4.2. Estudio de la respuesta vasoconstrictora a la 5-HT de la arteria renal de conejo y del efecto de la diabetes experimental sobre dicha respuesta	40
2.4.3. Estudio de la respuesta vasoconstrictora de la arteria renal de conejo a la ET-1 y del efecto de la diabetes experimental sobre dicha respuesta	41
2.5. Análisis de los resultados	42
3. FÁRMACOS Y SOLUCIONES	44
RESULTADOS	46
1. INFLUENCIA DE LA DIABETES SOBRE LA RESPUESTA A LA ACH DE LA ARTERIA RENAL DE CONEJO	47
1.1. Efecto de la Ach	47
1.2. Efecto de la Ach tras la eliminación del endotelio	48
1.3. Efecto de la Ach tras la incubación con L-NA	49
1.4. Efecto de la Ach tras la incubación con indometacina	51

1.5.	Efecto de la Ach tras la incubación conjunta con L-NA e indometacina	54
1.6.	Efecto de la Ach tras la incubación conjunta con L-NA e indometacina en arterias despolarizadas con KCl	56
1.7.	Efecto del nitroprusiato sódico en la arteria renal de conejo	59
2.	INFLUENCIA DE LA DIABETES SOBRE LA RESPUESTA DE LA ARTERIA RENAL DE CONEJO A LA 5-HT	60
2.1.	Efecto de la 5-HT	60
2.2.	Efecto de la 5-HT tras la eliminación del endotelio	61
2.3.	Efecto de la 5-HT tras la incubación con L-NA	62
2.4.	Efecto de la 5-HT tras la incubación con L-NA de los segmentos arteriales sin endotelio	64
2.5.	Efecto de la 5-HT tras la incubación con indometacina	66
2.6.	Efecto de la 5-HT tras la incubación conjunta con L-NA e indometacina	69
3.	INFLUENCIA DE LA DIABETES SOBRE LA RESPUESTA DE LA ARTERIA RENAL DE CONEJO A LA ET-1	73
3.1.	Efecto de la ET-1	73
3.2.	Efecto de la ET-1 tras la eliminación del endotelio	74
3.3.	Efecto de la ET-1 tras la incubación con L-NA	75
3.4.	Efecto de la ET-1 tras la incubación con indometacina	76
3.5.	Efecto de la ET-1 tras la incubación con indometacina de los segmentos arteriales sin endotelio	77
	DISCUSIÓN	80
1.	MODELO EXPERIMENTAL	81
2.	INFLUENCIA DE LA DIABETES SOBRE LA RESPUESTA DE LA ARTERIA RENAL A LA ACH Y LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN DICHA RESPUESTA	82
3.	INFLUENCIA DE LA DIABETES SOBRE LA RESPUESTA DE LA ARTERIA RENAL A LA 5-HT Y LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN DICHA RESPUESTA	90
4.	INFLUENCIA DE LA DIABETES SOBRE LA RESPUESTA DE LA ARTERIA RENAL A LA ET-1 Y LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN DICHA RESPUESTA	96
	CONCLUSIONES	106
	BIBLIOGRAFÍA	109

INTRODUCCIÓN

DIABETES MELLITUS

1.1. Generalidades

El término diabetes mellitus engloba una serie de enfermedades caracterizadas por un déficit absoluto o relativo de insulina, resultante de defectos en la secreción o en la acción de la hormona o de ambos. La expresión bioquímica más conocida de la diabetes es la hiperglucemia, aunque existen anomalías no sólo en el metabolismo de los hidratos de carbono, sino también de los lípidos y de las proteínas. La gravedad de este síndrome se debe a que, a lo largo de los años de evolución, produce una serie de manifestaciones sistémicas, de las cuales la más específica es la microangiopatía (lesión de pequeños vasos de la retina, del riñón, etc.), si bien se producen igualmente lesiones macroangiopáticas (arterioesclerosis acelerada), neurológicas, etc.

La clasificación clásica de la diabetes incluye dos grandes tipos: diabetes mellitus insulino-dependiente (IDDM) y diabetes mellitus no insulino-dependiente (NIDDM). Sin embargo, actualmente se han acumulado nuevos conocimientos en los que se han identificado defectos a nivel de células, tejidos o funciones que están relacionados con la expresión de la enfermedad. Esto ha dado lugar a la aparición de nuevas propuestas para clasificar la diabetes mellitus. Recientemente, el Comité de Expertos de la Asociación Americana de Diabetes (ADA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) han propuesto una nueva clasificación que contempla 4 grupos:

1. Diabetes mellitus tipo 1
2. Diabetes mellitus tipo 2

3. Otros tipos específicos de diabetes

4. Diabetes mellitus gestacional

En la diabetes tipo 1 se incluyen las formas de diabetes por destrucción de la célula β -pancreática causada por alteraciones inmunológicas o de causa idiopática. Se describen como diabetes tipo 2 aquellas formas con resistencia insulínica predominante y, eventualmente, una deficiencia relativa de secreción de insulina. En el tercer grupo se incluyen los casos cuyo defecto básico es conocido y puede ser identificado; paradójicamente en este grupo se encuentran diabéticos tipo 1 y tipo 2 de causas conocidas. La diabetes gestacional se define simplemente por el hecho de aparecer durante el embarazo.

La importancia de esta enfermedad deriva de su frecuencia y de sus complicaciones crónicas, constituyendo una de las principales causas de invalidez y mortalidad prematura en la mayoría de los países desarrollados, aparte de afectar a la calidad de vida de las personas afectadas. Presenta una elevada prevalencia y comporta un importante gasto sanitario, tanto por el cuidado de la enfermedad como por la atención sanitaria de las complicaciones asociadas. Supone pues un importante coste, tanto personal como económico, para los enfermos, familiares y para la sociedad en conjunto.

Según el informe de la OMS titulado *“Global Burden of Diabetes 1995-2025: Prevalence, Numerical Estimates and Projections”*, actualmente hay 143 millones de personas con diabetes en todo el mundo y está previsto que esta cifra se eleve a 300 millones para el año 2025 debido, sobretodo, al

aumento, envejecimiento y urbanización de la población. Los aumentos de prevalencia entre 1995 y 2025 no serán homogéneos en todos los países, así el mayor aumento lo presentarán China (68%) e India (59%). Los países Iberoamericanos y del Caribe, así como otras islas de Asia experimentarán un aumento del 41%. En Oriente Medio aumentará un 30%, mientras que este incremento será menor en los países de Antigua Economía Socialista de Europa (26%) y en los países propios de una Economía de Mercado, como es el caso de España, el incremento será de un 28%. Estas cifras resultan más dramáticas si se tiene en cuenta que por cada caso de diabetes diagnosticado hay uno sin diagnosticar.

La prevalencia de la diabetes en España se sitúa en el 6%, aunque en personas mayores de 30 años este porcentaje sube hasta el 12% y en mayores de 65 años hasta el 25%, y empieza a observarse en edad pediátrica.

Entre las complicaciones crónicas asociadas a esta enfermedad están la retinopatía, la nefropatía, la enfermedad coronaria, la neuropatía y la isquemia periférica. La retinopatía diabética es la primera causa de ceguera en Occidente. Después de 15 años de evolución de la enfermedad diabética, la ceguera afecta al 2% de los enfermos mientras que otro 10% manifiesta problemas visuales graves. La enfermedad cardiovascular, que se origina a partir de la macroangiopatía diabética, provoca el 75% de las muertes de los pacientes diabéticos en países industrializados. Por otra parte, la diabetes es la principal causa del fallo renal, siendo la nefropatía la principal causa de muerte en la población diabética tipo 1. Por su parte, la neuropatía es

probablemente la complicación más común en la diabetes, apareciendo en mayor o menor grado en el 50% de los enfermos y produciendo pérdidas sensoriales y daños en las extremidades, constituyendo además la principal causa de impotencia en el varón diabético. Por último, cabe señalar que las ulceraciones en las extremidades inferiores son el resultado de la neuropatía e isquemia periféricas y constituyen la causa más frecuente de amputaciones no traumáticas de los miembros inferiores (OMS, Fact Sheet nº 138, 1999).

Las complicaciones de la diabetes son las responsables de la mayor parte del gasto sanitario directo (hospitalizaciones, visitas ambulatorias, tratamiento farmacológico, tiras reactivas e instrumentos para la automonitorización), aunque en cuanto al gasto social derivado de la enfermedad, las complicaciones contribuyen más a los costes indirectos que llevan asociados (pérdidas de productividad, jubilación anticipada, muerte prematura antes de la jubilación). Dentro de las complicaciones, son las cardiovasculares las que suponen un mayor gasto. Por otra parte, la diabetes presenta un coste intangible considerable por el estrés, dolor y ansiedad que la enfermedad comporta, y que puede reducir la calidad de vida, tanto de enfermos como de familiares (Rubio *et al.*, 1998).

El estudio europeo CODE-2, que examinó los costes médicos directos de la diabetes tipo 2 en diferentes países, muestra que el coste anual sanitario por paciente en España fue de 1305 euros frente a los 1130 euros de la población no diabética. Esta cifra se triplicaba si había complicaciones microvasculares y/o macrovasculares (Mata *et al.*, 2002).

Según la OMS también existe otro tipo de consecuencias más difícilmente cuantificables, pero que tienen una gran repercusión para el enfermo como son el dolor, la ansiedad, la disminución de la expectativa de vida, la posible discriminación laboral y el acortamiento de la vida laboral activa por discapacidad. Tanto es así que el paciente diabético, en general, valora su calidad de vida sensiblemente peor que pacientes con otras patologías como asma o infección por VIH (Mata *et al*, 2002).

1.2. Diabetes y afectación renal

La nefropatía diabética es una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad prematura en pacientes con diabetes mellitus, siendo además la causa individual más importante de insuficiencia renal en el mundo occidental. En Estados Unidos la diabetes es la causante del 40% de todas las insuficiencias renales (Akmal, 2001). En España, la prevalencia de afectación renal global es del 22 al 26% en la diabetes mellitus tipo 1 (13-14% con microalbuminuria y 8-12% con nefropatía establecida), ascendiendo el porcentaje de nefropatía inicial del 13% al 23% en la diabetes tipo 2, pero siendo similar la prevalencia de la nefropatía establecida (10-12%) (Esmatjes, 1999).

En la Comunidad Valenciana la nefropatía diabética supone el 8,31% de las enfermedades renales y el 2,75% de los transplantes renales (Registro de enfermos renales de la Comunidad Valenciana: datos del año 2001).

El establecimiento de la nefropatía diabética se entiende como un camino progresivo desde las alteraciones funcionales renales hasta la

insuficiencia renal terminal, atravesando estadíos intermedios por la aparición de microalbuminuria y proteinuria. Desde el punto de vista clínico, los primeros cambios funcionales renales en la diabetes tipo 1 son un incremento en la eliminación urinaria de albúmina y una elevación del filtrado glomerular. Estos cambios funcionales ocurren poco después del diagnóstico de la diabetes, pero una vez que el control glucémico es adecuado, la función renal vuelve a la normalidad. Después de 5 a 10 años de evolución de la diabetes, algunos pacientes progresan a un estadio en el cual aumenta la microalbuminuria sin existir cambios sustanciales en el filtrado glomerular. La existencia de microalbuminuria, 30 a 300 mg/24 horas, ya implica la existencia de nefropatía, aunque en fase incipiente. La mayoría de estos pacientes desarrollará proteinuria (>300 mg/24 horas), también conocida como macroalbuminuria o fase de nefropatía diabética establecida. Cuando se produzca el descenso de la tasa de filtrado glomerular, virtualmente todos los pacientes progresarán hacia insuficiencia renal crónica terminal. El curso clínico de la nefropatía en los pacientes con diabetes tipo 2 puede presentar diferencias significativas, comparado con el de los pacientes con diabetes tipo 1.

La histopatología de la nefropatía diabética incluye manifestaciones a nivel glomerular, como glomeruloesclerosis, a nivel vascular como aterosclerosis de las arteriolas aferente y eferente glomerulares y diversas alteraciones túbulo-intersticiales. (Documento de consenso sobre pautas de detección y tratamiento de la nefropatía diabética, 1997 Sociedades

españolas de: Diabetes, Endocrinología, Medicina Familiar y Comunitaria y Nefrología).

2. MODELOS DE DIABETES EXPERIMENTAL

Los modelos experimentales de diabetes en animales se utilizan tanto para el estudio de la etiología de la diabetes mellitus como para el estudio de los mecanismos involucrados en las complicaciones diabéticas a largo plazo, ya que las características generales de la diabetes en animales son similares a las de la diabetes humana.

Los diferentes modelos experimentales utilizados en distintas especies animales se pueden agrupar según la metodología usada para la inducción de la diabetes en cuatro grandes grupos: los modelos que utilizan agentes químicos para la inducción de la diabetes (diabetes química); los modelos en los que se induce la diabetes mediante procedimientos quirúrgicos (diabetes quirúrgica); aquellos en los que la diabetes se induce por infecciones víricas (diabetes vírica); y, por último, los modelos de diabetes espontánea.

2.1. Diabetes química

Se ha demostrado que la administración de diferentes sustancias químicas en animales provoca situaciones experimentales similares a la diabetes. Entre estos agentes químicos, el aloxano y la estreptozotocina (STZ) parecen ser los más específicos y son los más comúnmente utilizados. Ambas sustancias actúan destruyendo las células β -pancreáticas por lo que provocarían diabetes tipo 1 y teóricamente sería esperable una falta total de

secreción de insulina y la necesidad de administrar dicha hormona a estos animales para lograr su supervivencia. Sin embargo, aunque los niveles de insulina en estos animales son muy bajos, no hay una ausencia total de la misma y pueden sobrevivir durante meses sin un tratamiento con insulina (Bell y Hye, 1983).

La capacidad del aloxano para destruir selectivamente las células β -pancreáticas fue descrita por primera vez por Dunn y sus colaboradores (1943). Por su parte, Rakietyen y sus colaboradores (1963) fueron los primeros en demostrar que la STZ inyectada por vía intravenosa producía diabetes en ratas y perros. En ambos casos, el efecto tóxico estaría relacionado con alteraciones morfológicas de la membrana de las células β -pancreáticas y con un aumento de la permeabilidad de dicha membrana celular (Weaver *et al.*, 1978; Bell y Hye, 1983).

Tanto el aloxano como la STZ producen diabetes tipo 1 en un elevado número de especies, exceptuando el cobaya que es insensible a ambos fármacos (Bailey, 1949; Bell y Hye, 1983). Los animales tratados tanto con aloxano como con STZ presentan la mayoría de las complicaciones asociadas a la diabetes como son las cardiomiopatías, las neuropatías, las disfunciones arteriales coronarias, las alteraciones hepáticas, traqueales, del tejido conectivo, gastrointestinales, etc. (Öztürk *et al.*, 1996).

2.2. Diabetes quirúrgica

El origen pancreático de la diabetes mellitus fue descubierto por primera vez en 1889 por Oskar Minkowski al realizar una pancreatectomía

total en perros. Se desarrollaron entonces los modelos experimentales de diabetes quirúrgica consistentes en la realización de una pancreatometomía total o parcial que desencadenan estados hiperglucémicos parecidos a una diabetes tipo 1 y tipo 2 respectivamente (Ingle, 1948). Los modelos de pancreatometomía o diabetes quirúrgica sólo tienen en la actualidad una importancia histórica, ya que han sido totalmente sustituidos por modelos que entrañan menos dificultades experimentales, como son los modelos de diabetes química expuestos anteriormente.

2.3. Diabetes viral

La infección viral se señala como una causa de diabetes tanto en animales como en humanos (Craighead, 1975; Barret-Connor, 1985). Se han utilizado varios virus para inducir la diabetes experimental en diversas especies animales, como por ejemplo M-variantes del virus de la encefalomiocarditis, el virus coxackie, el virus de la rubeola, reovirus y el virus de la encefalitis equina de Venezuela. La susceptibilidad genética frente a la infección y la resistencia de las células β -pancreáticas a las lesiones virales son puntos que no están en la actualidad totalmente clarificados. Los modelos de diabetes vírica presentan además numerosas dificultades experimentales, por lo que son muy poco utilizados en investigación (Öztürk *et al.*, 1996).

2.4. Diabetes espontánea

Por último, entre los modelos animales utilizados para la investigación de la diabetes encontramos los animales espontáneamente diabéticos. Son

varias las especies animales en las que espontáneamente sus individuos pueden desarrollar la diabetes mellitus, de forma que tras los cruces adecuados se obtienen cepas de animales que, en un elevado porcentaje, desarrollan la diabetes. Entre las especies más utilizadas podemos citar las ratas Wistar BB, los hamsters chinos y los ratones OB. En el caso de las ratas Wistar BB el síndrome desarrollado tiene las características de la diabetes tipo 1 y en el de los ratones OB es similar al de la diabetes tipo 2 (Öztürk *et al.*, 1996).

3. DIABETES Y FUNCIÓN VASCULAR

3.1. Mecanismo básico de contracción del músculo liso

La contracción del músculo liso depende fundamentalmente del aumento intracelular de Ca^{+2} , participando tanto el Ca^{+2} extracelular como el intracelular almacenado en el retículo sarcoplásmico (Jiang y Stephens, 1994). Este aumento lleva a la formación de un complejo del Ca^{+2} con la calmodulina (polipéptido ácido con cuatro dominios de fijación para el Ca^{+2}), el cual estimula la formación de un complejo ternario con la quinasa de la cadena ligera de la miosina, activándola. Esta quinasa cataliza la fosforilación de los sitios activos de la miosina permitiendo la interacción actina-miosina, que desencadena la contracción del músculo liso.

El Ca^{+2} puede entrar en la célula muscular lisa por apertura de los canales dependientes de voltaje, activados por despolarización, o por los canales dependientes de receptor, activados por agonistas. Estos agonistas inducen además la formación de inositol trifosfato, el cual actúa sobre

receptores específicos localizados en la membrana del retículo sarcoplásmico, provocando la liberación de Ca^{+2} al citosol (Bolton, 1979).

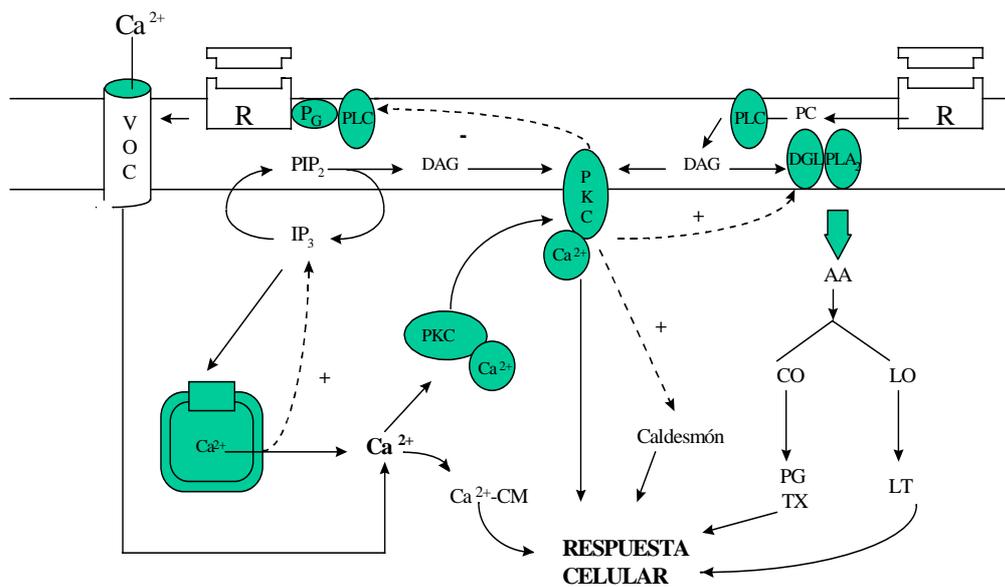
La activación del receptor de membrana, que se encuentra acoplado a través de una proteína G a una fosfodiesterasa específica (fosfolipasa C) inicia la hidrólisis de lípidos complejos de la membrana celular, como el fosfatidilinositol-bifosfato que genera diacilglicerol e inositol trifosfato, los cuales actúan como segundos mensajeros.

El diacilglicerol generado permanece en la membrana y activa a la proteinquinasa C que previamente ha sufrido una traslocación del citosol a la membrana debido a su unión con Ca^{+2} . Esta proteinquinasa C es capaz de fosforilar a una serie de proteínas, mediando así efectos celulares que incluyen fosforilación de otras proteínas, secreción, modulación de conductancias iónicas, contracción del músculo liso, proliferación celular y activación del intercambio Na^+ - Ca^{+2} (Nishizuca, 1988).

El diacilglicerol, además, sirve de sustrato a la fosfolipasa A_2 para liberar ácido araquidónico, precursor de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, que juegan un importante papel en la regulación de distintas funciones celulares.

Para que se produzca la relajación del músculo liso vascular tiene que disminuir la concentración de Ca^{+2} intracelular. Esta disminución puede estar producida por dos mecanismos: por una bomba Ca^{+2} - H^+ ATPasa que se encuentra presente tanto en la membrana del retículo sarcoplásmico como en el sarcolema, y por un intercambiador Na^+ - Ca^{+2} situado en el sarcolema (Casteels *et al.*, 1986).

Al disminuir la concentración de Ca^{2+} se activan fosfatasa presentes en la célula que desfosforilan las cadenas de miosina originando en principio la relajación; sin embargo, el músculo liso tiene un mecanismo por el cual los puentes cruzados de la miosina desfosforilada permanecen fijados a la actina durante cierto tiempo pudiéndose producir una contracción sostenida con poco gasto de energía.



AA: ácido araquidónico, Ca^{2+} : ion calcio, CM: calmodulina, CO: ciclooxigenasa, DAG: diacilglicerol, DGL: diglicéridolipasa, IP₃: inositol 1,4,5-trifosfato, LO: lipoxigenasa, LT: leucotrienos, PC: fosfatidilcolina, P_G: proteína G, PG: prostaglandinas, PIP₂: fosfatidilinositol-bifosfato, PKC: protein quinasa C, PLA₂: fosfolipasa A₂, PLC: fosfolipasa C, R: receptor de membrana, TX: tromboxanos, VOC: canales dependientes de voltaje.

Figura 1: Mecanismo de contracción del músculo liso.

3.2. Papel del endotelio en la regulación vascular

El endotelio es la estructura que limita la pared vascular con la sangre circulante, sirviendo de barrera que evita el paso de agentes nocivos al

interior de la pared vascular. El endotelio no es simplemente una barrera física que separa la pared vascular de la sangre circulante, reconociéndose en la actualidad su papel como “órgano” de regulación autocrina, paracrina y endocrina. El endotelio constituye un elemento clave en la homeostasis cardiovascular ya que es capaz de detectar cambios tanto mecánicos como humorales y realizar ajustes en el tono vascular o en la estructura de los vasos mediante la producción de diversas sustancias.

El endotelio tiene un papel importante en el mantenimiento del flujo laminar. Tiene función antitrombótica, inhibiendo la adhesión de las células sanguíneas a la pared del vaso. El óxido nítrico (NO) y la prostaciclina (PGI₂) endoteliales tienen un conocido efecto antiagregante plaquetar. En situaciones patológicas (como las que se dan en los factores de riesgo de la arteriosclerosis) se produce un daño endotelial que conlleva la liberación de una serie de factores quimiotácticos y la expresión de una serie de moléculas que facilitan la adhesión de leucocitos, plaquetas, etc., contribuyendo de esta forma al daño vascular (Haller, 1997).

El endotelio tiene, además, importantes funciones secretoras, liberando sus productos de secreción tanto hacia la sangre como hacia la pared vascular. El endotelio segrega una serie de factores que regulan el crecimiento y diferenciación de las células musculares lisas de la pared vascular. Diversas situaciones pueden estimular una mayor producción endotelial de estos factores con la consiguiente proliferación de células musculares lisas, lo cual constituye un fenómeno precoz en la vasculopatía. Entre estas situaciones podemos citar el aumento crónico en la tensión de la

pared vascular y la exposición crónica a niveles aumentados de vasoconstrictores (noradrenalina, angiotensina II).

El endotelio desempeña también otro tipo de actividades fisiológicas entre las que se pueden citar la captación y metabolización de la 5-hidroxitriptamina (5-HT) y de la noradrenalina circulante, la conversión de la angiotensina I en angiotensina II, el metabolismo de la bradiquinina, así como la inhibición de la liberación de noradrenalina por las terminaciones nerviosas adrenérgicas (Cohen y Weisbrod, 1988).

Por otra parte, el endotelio participa de forma muy importante en la modulación del tono vascular. El tono vascular, o grado de contracción basal del músculo liso de la pared vascular, es el resultado de la interacción de diversos factores tanto vasorrelajantes como vasoconstrictores, entre los que destacan las presiones parciales de CO₂ y O₂, el pH y la acción de diferentes sustancias vasoactivas y de distintos neurotransmisores liberados desde las terminaciones nerviosas perivasculares. Entre las sustancias vasoactivas con acción reguladora, algunas tienen su origen en glándulas concretas (vasopresina, noradrenalina, etc.), otras poseen un origen más difuso, por ejemplo las plaquetas (5-HT, prostaglandinas, etc.), y muchas de ellas proceden del endotelio vascular. Estas sustancias endoteliales pueden ser liberadas por distintos estímulos como autacoides (histamina, bradiquinina, 5-HT) y neurotransmisores (noradrenalina, acetilcolina (Ach), sustancia P) entre otros. En condiciones fisiológicas existe un equilibrio entre las sustancias relajantes y las sustancias constrictoras liberadas por el endotelio, lo cual contribuye a mantener el tono vascular normal (Wahl y Schilling, 1993).

Entre los factores contráctiles derivados del endotelio se encuentra uno de los vasoconstrictores más potentes que se conocen, la endotelina (ET), un polipéptido de 21 aminoácidos identificado por primera vez en cultivos de células endoteliales porcinas (Yanagisawa *et al.*, 1988). El péptido original pasó a llamarse ET-1 cuando se descubrió la existencia de otros péptidos relacionados, la ET-2 y la ET-3 (Inoue *et al.*, 1989). Las endotelinas derivan de un péptido precursor de 203 aminoácidos denominado preproendotelina, el cual es transformado por endopeptidasas específicas para formar proendotelina (big endothelin), con 38-39 aminoácidos según la especie. Esta proendotelina es convertida en endotelina activa por el enzima convertidor de la endotelina (Yanagisawa *et al.*, 1988). La ET-1 es la isoforma más abundante, de origen fundamentalmente endotelial, aunque también se produce en el tejido epitelial y renal, en macrófagos humanos, en el hipotálamo, etc. (Yoshimoto *et al.*, 1990; Masaki, 1995; Miyauchi y Masaki, 1999). Por otra parte tanto la ET-1 como la ET-3 han sido identificadas en neuronas y en la glía y se ha observado que las células musculares lisas de la pared vascular también producen ET-1, aunque en cantidades 100 veces menores que el endotelio (Cardell *et al.*, 1994).

En el territorio vascular la endotelina actúa a través de dos tipos de receptores, el receptor ET_A y el receptor ET_B. Ambos tipos de receptores muestran diferente afinidad por las tres isoformas de la ET y están presentes en las células del músculo liso vascular mediando vasoconstricción. Sin embargo, en las células endoteliales sólo está presente el receptor ET_B y su estimulación induce vasodilatación a través de la liberación de NO y PGI₂

(Masaki, 1995). Así la ET-1, actuando de una manera autocrina y paracrina, puede tener efectos opuestos sobre el tono vascular. La ET-1 liberada desde las células endoteliales ejerce una influencia autocrina provocando vasodilatación secundaria a la activación de los receptores ET_B endoteliales, y ejerce una influencia paracrina sobre el músculo liso vascular adyacente provocando vasoconstricción y estimulando su proliferación (acción mitogénica) a través de la estimulación de los receptores musculares ET_A y ET_B. 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. No obstante, la respuesta funcional a la ET-1 varía de unos lechos vasculares a otros dependiendo de la distribución y expresión de ambos tipos de receptores en los mismos (Takuwa, 1993; Masaki, 1995; Salom *et al.*, 1995; Hopfner *et al.*, 1999; Miyauchi y Masaki, 1999).

Por otra parte, el endotelio también es capaz de liberar tromboxano A₂ (TxA₂), un derivado del ácido araquidónico, el cual media la contracción producida por noradrenalina y ATP (Shirahase *et al.*, 1987). También se ha descrito la existencia de otros factores derivados del endotelio y con acción contráctil que todavía no han sido bien identificados y entre los que se pueden citar otra sustancia derivada del ácido araquidónico (un prostanoido o anión superóxido) y una sustancia no prostanoido liberada en situaciones de hipoxia (Cardell *et al.*, 1994).

Junto con los anteriores factores contráctiles, el endotelio también es capaz de sintetizar y liberar diferentes sustancias con acción vasorrelajante. Entre ellas destacan el clásicamente denominado factor de relajación derivado del endotelio (endothelium derived relaxing factor o EDRF), que ha sido caracterizado como NO (Ignarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987), el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (endothelium derived hyperpolarizing factor o EDHF) y la PGI₂.

El NO es un potente agente vasorrelajante producido y liberado por el endotelio tanto en condiciones basales como tras la unión de diversas sustancias vasoactivas a sus receptores específicos de la membrana de la célula endotelial (Wahl y Schilling, 1993). El NO se sintetiza a partir del aminoácido L-arginina por la acción del enzima óxido nítrico sintasa (NOS) (Myers *et al.*, 1990; Moncada *et al.*, 1991). Se han identificado tres isoenzimas diferentes de la NOS (Moncada *et al.*, 1997): 1) la NOS neuronal (nNOS), identificada en tejido neuronal y también conocida como NOS tipo I; 2) la NOS endotelial (eNOS), identificada en células endoteliales vasculares y también conocida como NOS tipo III; y 3) la NOS inducible (iNOS), también llamada NOS tipo II, que es inducida por citocinas en macrófagos y hepatocitos y que también está presente en el músculo liso (Katušić y Cosentino, 1994; Knowles y Moncada, 1994). Las dos primeras isoformas son constitutivas y parecen ser la "forma fisiológica" del enzima. El NO producido por estos isoenzimas influye en el tono vascular basal y media la respuesta vascular a diferentes estímulos en condiciones normales. Por su parte, la iNOS parece ser la "forma fisiopatológica" del enzima y el NO producido por

este isoenzima sería un importante mediador de la citotoxicidad (Faraci y Brian, 1994).

El NO produce la relajación de la musculatura lisa al activar el enzima guanilato ciclasa. Estudios *in vitro* han demostrado que la acción de distintos vasoconstrictores puede verse potenciada por la ausencia de endotelio, sugiriendo que, de alguna forma, el endotelio modula la respuesta contráctil del músculo liso vascular a través de la liberación de NO, el cual contrarrestaría parcialmente la acción del vasoconstrictor (Brian y Kennedy, 1993).

Por su parte, la PGI₂ es un metabolito de la vía del ácido araquidónico que también produce relajación del músculo liso vascular. Su acción está mediada por la adenilato ciclasa, cuya activación provoca un aumento en la producción de AMP_C que desencadena la relajación. Al igual que el NO, la PGI₂ no se sintetiza de forma exclusiva en el endotelio ya que también las células musculares lisas pueden sintetizarla (Hassid y Williams, 1983).

3.3. Importancia de las alteraciones vasculares en la fisiopatología y clínica de la diabetes mellitus

Entre las complicaciones de la diabetes, las alteraciones vasculares constituyen la principal causa de morbilidad y mortalidad en los pacientes diabéticos (Stamler *et al.*, 1993).

Las alteraciones vasculares que aparecen en el curso de la diabetes mellitus (macroangiopatía y microangiopatía) afectan tanto a la estructura como a la funcionalidad de los vasos sanguíneos pudiendo modificar el tono

normal del músculo liso vascular y contribuir al desarrollo de otras complicaciones a largo plazo de la diabetes como son el fallo cardíaco, el accidente vascular cerebral, la hipertensión, la retinopatía, la neuropatía y la nefropatía (García *et al.*, 1974; Crepaldi y Nosadini, 1988; Kastrup, 1988; Jarret, 1989).

La lesión ateromatosa que aparece en la diabetes mellitus es, desde el punto de vista anatomopatológico, similar a la observada en individuos no diabéticos y sólo se distingue por desarrollarse de manera más rápida, intensa y precoz en el caso de los pacientes diabéticos (Strandness *et al.*, 1964).

La esclerosis de los glomérulos renales provoca la insuficiencia renal crónica en los pacientes diabéticos, aunque también la macroangiopatía podría estar implicada en esta lesión renal asociada a la diabetes (Carmena y Ascaso, 1993).

3.3.1. Cambios estructurales en la pared arterial inducidos por la diabetes

Utilizando distintos modelos experimentales tanto en humanos como con animales se ha evidenciado que la diabetes produce cambios morfológicos en la pared de los vasos. Estas alteraciones se producen a nivel del endotelio, subendotelio y músculo liso.

La permeabilidad del endotelio en animales diabéticos está aumentada por un factor liberado por las plaquetas (Colwell *et al.*, 1983). Este aumento de la permeabilidad endotelial permite el paso al subendotelio de

determinadas sustancias presentes en la sangre, lo cual provoca la aparición de un área de descamación focal que va a desencadenar la adhesión de plaquetas en esa zona, con depósito de lípidos y colesterol y formación de tejido conjuntivo, lo que lleva a la formación de placas ateromatosas (Öztürk *et al.*, 1996).

En aorta de conejos, dos semanas después de la inducción de la diabetes con aloxano, se produce adhesión de glóbulos blancos, plaquetas y material similar a la fibrina a la superficie endotelial, siendo estas alteraciones más severas a las seis semanas de la inducción (Hadcock *et al.*, 1991). Esta adhesión incrementada de glóbulos blancos al endotelio vascular puede tener como resultado un aumento en la formación de radicales libres en la pared vascular. Todas estas alteraciones pueden desembocar finalmente en la muerte de las células endoteliales vasculares. De hecho, se ha demostrado que la diabetes experimental provoca un aumento de la muerte celular endotelial en aorta de rata (Lin *et al.*, 1993) y una reducción significativa de la proliferación celular endotelial en aorta de conejo (Santilli *et al.*, 1992).

En células extraídas de cordón umbilical de mujeres embarazadas diabéticas se han observado alteraciones endoteliales incluyendo incremento del área mitocondrial y aumento de la fluidez de la membrana endotelial (Cester *et al.*, 1996).

La neuropatía diabética ha sido relacionada con el engrosamiento de la membrana basal, con el número de núcleos endoteliales y el área endotelial (Matikainen *et al.*, 1982; Yasuda *et al.*, 1987; Malik *et al.*, 1993). En humanos con diabetes tipo 1 se ha observado un engrosamiento de la membrana basal

de los capilares de la piel comparado con individuos sanos (Aageneas *et al.*, 1961). Además, un adecuado control glucémico de los pacientes disminuyó el espesor de la membrana basal de los capilares de los músculos esqueléticos (Rosenstock *et al.*, 1988).

La diabetes también produce un aumento de la proliferación celular del músculo liso de la pared vascular. Entre las numerosas causas que pueden dar lugar a esta proliferación cabe destacar la pérdida de células endoteliales ocasionada por la diabetes y la subsiguiente disminución de la síntesis de NO, el cual se ha demostrado que además de sus propiedades vasorrelajantes, también tiene una actividad reguladora del crecimiento, ya que tiene un efecto antiproliferativo (Garg y Hassid, 1989). Otras de las causas que contribuyen a dicha proliferación celular son las siguientes: el aumento de las concentraciones de hormona del crecimiento y de otros factores de crecimiento en el plasma de animales diabéticos y el consiguiente contacto de estas sustancias con el subendotelio (Koschinsky *et al.*, 1979; Ledet, 1981); el efecto de factores intrínsecos producidos por la propia célula muscular (Alipui *et al.*, 1991); la glucosilación no enzimática de las proteínas plasmáticas y las proteínas de la membrana celular que se produce en la diabetes, ya que los productos finales de dicha glucosilación inhiben los efectos antiproliferativos del NO en el músculo liso vascular de diabéticos (Bucala *et al.*, 1991; Hogan *et al.*, 1992); el aumento de la síntesis de TxA₂ y del factor de crecimiento semejante a la insulina (insulin-like growth factor, IGF), los cuales poseen propiedades mitogénicas y por tanto tienen un papel importante en el desarrollo de esta proliferación celular del músculo liso

vascular (Hanasaki *et al.*, 1990; Murphy *et al.*, 1990; Bornfeldt *et al.*, 1992; Nicosia *et al.*, 1994); y por último, la reducción en la biosíntesis de PGI₂ que se observa en la diabetes, ya que la PGI₂ tiene un efecto antimitogénico sobre las células musculares lisas de arterias procedentes de diabéticos (Shirotani *et al.*, 1991; Koh *et al.*, 1993).

Por otra parte, se ha observado que la diabetes provoca una acumulación excesiva de colágeno en la pared arterial como consecuencia de la estimulación de la síntesis del mismo (Hamlin *et al.*, 1975) y del aumento de la glucosilación no enzimática del colágeno que se produce en las arterias tras la diabetes (Rosenberg *et al.*, 1979; Brownlee y Cerami, 1981; Brownlee *et al.*, 1986). Además, las fibras de colágeno que se forman en los tejidos diabéticos son generalmente más rígidas y resistentes a la solubilización y digestión enzimática. Por todo ello, la secreción aumentada de colágeno por los fibroblastos en respuesta a altas concentraciones de glucosa contribuye de forma importante a los cambios estructurales y funcionales que se producen en el músculo liso de diabéticos (Kennedy y Baynes, 1984).

El engrosamiento del músculo liso arterial produce una disminución del gradiente de oxígeno transarterial (Santilli *et al.*, 1993) y, consecuentemente se produce una hipoxia en la pared arterial que también contribuye a la formación de lesiones arterioscleróticas, así como al desarrollo de complicaciones no vasculares tales como la neuropatía y la nefropatía.

3.3.2. Cambios en la función arterial producidos en la diabetes

Numerosos estudios han descrito la existencia en la diabetes de una alteración de la respuesta vascular a diferentes estímulos, que puede estar relacionada con cambios en la sensibilidad de los receptores vasculares a ciertos agonistas, con cambios en la población de receptores (cantidad, tipos, etc.), o con cambios en los mecanismos reguladores de la respuesta vascular a determinados estímulos. Existe, no obstante, una gran disparidad en los resultados obtenidos, lo cual puede estar relacionado con diferencias regionales, metodológicas, etc.

De hecho, los resultados obtenidos con sustancias vasoconstrictoras como la noradrenalina o la 5-HT son contradictorios. En vasos de gran calibre, o vasos de conducción, se ha descrito tanto aumento (Wong y Tzeng, 1992; Félétou *et al.*, 1994) como disminución en la contracción (Sikorski *et al.*, 1993; James *et al.*, 1994), e incluso en algunos casos no se observa modificación en dicha respuesta tras la diabetes (Mulhern y Docherty, 1989; Fulton *et al.*, 1991). Otros trabajos muestran que el efecto constrictor de la 5-HT está aumentado en la circulación pulmonar (El Kashef, 1996) y en arteria basilar (Van Buren *et al.*, 1998) y carótida (Miranda *et al.*, 2000b) de animales diabéticos. En contraste con estos estudios, la diabetes disminuye la respuesta contráctil de la aorta de rata a la 5-HT (James *et al.*, 1994; James y Hodgson, 1997). También aparecen resultados discrepantes en cuanto al efecto de la diabetes sobre la contracción provocada por otros agentes vasoconstrictores como el calcio o el potasio (Wakabayashi *et al.*, 1987; Legan, 1989). A nivel renal, la adenosina induce una vasoconstricción más

marcada en ratas diabéticas comparada con el grupo control (Pflueger *et al.*, 1999) y la reactividad de la vasculatura renal a la 5-HT está modificada en ratas diabéticas (Boston y Hodgson, 1997).

Otro de los vasoconstrictores que ha sido implicado en la fisiopatología de la diabetes es la ET-1. La actividad de la ET-1 se encuentra alterada en muchas complicaciones asociadas a la diabetes como son la arteriosclerosis (Lerman *et al.*, 1991), la nefropatía (Tammesild *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1994), la retinopatía (De la Rubia *et al.*, 1992; Kawamura *et al.*, 1992) y la neuropatía (Cameron *et al.*, 1994). De hecho, se ha sugerido la posible utilidad terapéutica de diversos antagonistas de los receptores endotelinérgicos o inhibidores del enzima convertidor de la endotelina en la prevención y tratamiento de las complicaciones vasculares de la diabetes (Miyachi y Masaki, 1999).

Existen varios trabajos en los que se relaciona alteraciones en la función normal de la ET-1 con la diabetes. Así, se han encontrado niveles plasmáticos de ET-1 elevados tanto en enfermos diabéticos (Collier *et al.*, 1992; Haak *et al.*, 1992; Perfetto *et al.*, 1998) como en modelos de diabetes en animales (Mathew *et al.*, 1997; Makino y Kamata, 1998b; Makino *et al.*, 2001); además, niveles altos de glucosa e insulina estimulan la producción de ET-1 por parte de las células endoteliales en cultivo (Yamauchi *et al.*, 1990; Hattori *et al.*, 1991). Sin embargo, en otros estudios las concentraciones plasmáticas de ET-1 permanecieron invariables o disminuyeron (Shin *et al.*, 1995; Hopfner *et al.*, 1998a,b; Makino *et al.*, 1998). Por otra parte, la liberación endotelial de ET-1 está atenuada en arteria aorta y mesentérica de

ratas diabéticas (Wu y Tang, 1998). Como se puede observar, existe gran variabilidad entre los distintos estudios y las razones de estas discrepancias están mal definidas. Parte de esta variabilidad, salvando las diferencias metodológicas, podrían ser explicadas por los numerosos factores metabólicos y vasculares que participan en la liberación y acción de la ET-1, incluyéndose la función endotelial (Vermes *et al.*, 1993), insulinemia (Oliver *et al.*, 1991; Frank *et al.*, 1993; Hopfner *et al.*, 1998a,b), EDHF (Boulangier y Luscher, 1990), glucemia (Hattori *et al.*, 1991), lipemia (Lerman *et al.*, 1993), etc.

Respecto a los agentes vasodilatadores está generalmente aceptado que la relajación dependiente de endotelio está alterada en los distintos lechos vasculares de varias especies animales en las que se indujo la diabetes, aunque los resultados también son contradictorios. Por ejemplo, hay trabajos en pacientes diabéticos que evidencian tanto alteración como respuestas normales a la relajación mediada por endotelio (Sobrevia y Mann, 1997; Chan *et al.*, 2000). Concretamente se ha demostrado una respuesta alterada a la Ach (Bhardwaj y Moore, 1988; Omer *et al.*, 1999) e histamina (White y Carrier, 1986) en diabetes. En nuestro propio grupo, también hemos evidenciado una respuesta alterada a la Ach en arteria carótida de conejos diabéticos así como alteraciones en los mecanismos reguladores endoteliales (Miranda *et al.*, 2000a).

Existen varios trabajos que muestran que la vasodilatación mediada por NO está alterada en humanos y animales en las fases tempranas de la diabetes (Gupta *et al.*, 1992; Elliot *et al.*, 1993; Diederich, 1997).

Concretamente en el lecho renal algunos trabajos muestran que la vasodilatación de los vasos renales está alterada en animales diabéticos (Wang *et al.*, 1993; Ohishi y Carmines, 1995; Diederich, 1997).

El NO juega un importante papel en la regulación de la hemodinámica renal tanto en condiciones fisiológicas (Kone y Baylis, 1997) como en la diabetes (Komers *et al.*, 2000a). Algunos estudios muestran alteraciones en la síntesis de NO en riñones de animales diabéticos, habiendo sido descritos tanto aumentos de la producción (Tolins *et al.*, 1993; Shin *et al.*, 2000) como disminución (Craven *et al.*, 1994; Derubertis y Craven, 1994; Kamata y Yamashita, 1999).

Se ha sugerido que la diabetes podría afectar la función moduladora del NO a tres niveles: 1) modificando la síntesis del NO en las células endoteliales; 2) disminuyendo la biodisponibilidad del NO una vez liberado, como consecuencia de su inactivación por productos derivados de la glucosilación avanzada o por radicales libres; y 3) modificando la sensibilidad del "receptor", es decir, de la guanilatociclasa de la célula muscular lisa (Chan *et al.*, 2000).

Los mecanismos patogénicos de la nefropatía diabética se han relacionado con cambios en la función reguladora del endotelio (Rabelink y Bakris, 1998), además, con técnicas inmunohistoquímicas se ha demostrado que se produce una disminución de la expresión de la NOS en las células de la mácula densa renal en la diabetes (Yagihashi *et al.*, 1996). Sin embargo, otros estudios sugieren que una excesiva producción de NO podría contribuir

a la hiperfiltración e hiperperfusión renal que se produce en la nefropatía (Sugimoto *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 1999).

En los últimos años ha quedado establecida la importancia del endotelio en la regulación del tono vascular tanto en situación fisiológica como en las diferentes situaciones patológicas; aún así podemos ver que todos los mecanismos que se ven involucrados en las alteraciones vasculares que se producen en la diabetes no están todavía esclarecidos y siguen siendo un tema relevante para muchos autores.

OBJETIVOS

El objetivo genérico de la presente Tesis Doctoral es analizar los cambios inducidos por la diabetes experimental en la respuesta de la arteria renal de conejo frente a tres sustancias vasoactivas: Ach, vasodilatador endotelio-dependiente, y 5-HT y ET-1, dos sustancias vasoconstrictoras que participan en condiciones fisiológicas en el mantenimiento del tono vascular, y que pueden desempeñar un papel importante en las alteraciones hemodinámicas que se producen a nivel renal en la diabetes, y que en última instancia podrían contribuir a la aparición de la nefropatía diabética.

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

1. Estudiar la respuesta de la arteria renal de conejo a la Ach, 5-HT y ET-1, analizando los posibles cambios inducidos por la diabetes experimental en dicha respuesta.
2. Estudiar la función moduladora del endotelio en la respuesta de la arteria renal de conejo a la Ach, 5-HT y ET-1, estudiando los efectos de la diabetes experimental sobre dicha función moduladora.
3. Estudiar la actividad reguladora del óxido nítrico en la respuesta de la arteria renal de conejo a la Ach, 5-HT y ET-1, así como la posible alteración de dicha actividad en la diabetes experimental.
4. Estudiar la actividad reguladora de derivados del ácido araquidónico en la respuesta de la arteria renal de conejo a la Ach, 5-HT y ET-1, analizando posteriormente los posibles cambios en dicha actividad inducidos por la diabetes experimental.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización del presente trabajo se han utilizado conejos blancos machos de Nueva Zelanda, los cuales fueron divididos en dos grupos al azar. A los animales de uno de los grupos no se les realizó ninguna manipulación experimental y constituyeron el grupo de conejos control, mientras que a los animales del otro grupo se les indujo la diabetes de forma experimental y constituyeron el grupo de conejos diabéticos.

1. INDUCCIÓN DE LA DIABETES EXPERIMENTAL

La inducción de la diabetes se realiza mediante la inyección, en la vena marginal de la oreja, de una dosis única de un tóxico selectivo de las células β -pancreáticas, el aloxano. La inyección de aloxano (100 mg/kg disueltos en 10 mL de solución salina) se realiza tras sedar previamente al animal con 40 mg de clorhidrato de Ketamina (Ketolar[®]). Debido a la destrucción de las células β -pancreáticas provocada por el aloxano, en las primeras horas posteriores a la inyección del mismo se produce una liberación masiva de insulina y un estado de hipoglucemia. Con el fin de evitar los graves problemas que la hipoglucemia puede acarrear para la vida del animal, tras el aloxano se le administran 2 mL de solución glucosada al 5% por vía intravenosa, y al cabo de 15-20 minutos 8 mL de la misma solución por vía subcutánea. Durante las primeras horas se mantiene al conejo con agua de bebida glucosada al 10% hasta que alcanza el estado hiperglucémico (normalmente entre 24 y 48 horas después de la inyección del aloxano). Posteriormente, la solución glucosada se sustituye por agua de bebida normal. Tanto los animales del grupo control

como los del grupo diabético permanecen estabulados con agua y comida regular *ad libitum* durante seis semanas.

En el periodo de estabulación a todos los animales (controles y diabéticos) se les realiza controles de peso y glucemia semanales. La medida de la glucemia se realizó con 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 y los resultados se visualizan en 60 segundos.

En la tabla 1 se muestran los valores medios de peso y glucemia para el grupo de conejos control y para el grupo de conejos diabéticos, se observa un marcado incremento de la concentración sérica de glucosa y una disminución en el incremento de peso en el grupo de animales diabéticos comparado con el control.

Tabla 1: Valores de peso y glucemia en conejos control y diabéticos

	Peso (Kg)	Glucemia (mg/dL)	n
Conejos grupo control			
Valor inicial	2.60 ± 0.10	106 ± 3	35
Valor final (6 semanas después)	3.54 ± 0.08	109 ± 4	35
Conejos grupo diabético			
Valor inicial	2.51 ± 0.07	104 ± 4	33
Valor final (6 semanas después)	2.94 ± 0.09 ^a	370 ± 25 ^a	33

^a Significativamente diferente del grupo control, P<0.05

Los valores iniciales se obtuvieron inmediatamente antes de la inducción de la diabetes en el grupo de conejos diabéticos y seis semanas antes del sacrificio en el grupo de conejos control. Los valores finales se obtuvieron en los dos grupos inmediatamente antes de sacrificar a los animales. Los valores representan la media ± EEM para “n” conejos

2. REGISTRO DE LA TENSIÓN ISOMÉTRICA DESARROLLADA POR SEGMENTOS DE ARTERIA RENAL DE CONEJO

2.1. Obtención y montaje de los segmentos arteriales

Seis semanas después de la inducción de la diabetes, los animales se anestesian con 100 mg de tiobarbital (Tiopental sódico®) y se sacrifican mediante una inyección, en la vena marginal de la oreja, de una solución de KCl (3.3 mEq/mL, 0.5 mL/kg). La muerte se produce por parada cardíaca como consecuencia de la despolarización miocárdica.

Posteriormente se diseccionan ambas arterias renales y se sumergen en una solución salina fisiológica fría (4 °C). A continuación, con la ayuda de una lupa binocular (Wild M3B Heerbrugg) y utilizando una fuente de luz fría (Euromex EK-1) para no deteriorar el tejido, se eliminan los restos de sangre del interior de las arterias y se cortan en segmentos de aproximadamente 4 mm de longitud.

Para el registro de la tensión isométrica desarrollada por los segmentos arteriales, se introducen los extremos finos y rígidos de dos alambres de acero inoxidable (125 µm de diámetro) a través de la luz vascular. 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. El transductor está acoplado a su vez a un amplificador de señal y a un polígrafo, para poder así registrar la tensión

isométrica ejercida por los segmentos arteriales como resultado de una contracción o relajación (Figura 2).

Cada segmento vascular, con los alambres en el interior de su luz, se aloja en un baño de órganos que contiene 5 mL de una solución que simula las condiciones fisiológicas (solución nutritiva de Ringer Locke). Dicha solución tiene la siguiente composición (mM): NaCl, 119.8; KCl, 5.0; CaCl₂, 2.2; MgCl₂, 1.0; glucosa, 5.6; y NaHCO₃, 23.8; y se encuentra burbujeadada continuamente 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, en condiciones idénticas a las descritas, que se utiliza para renovar el medio en que se hallan inmersos los segmentos arteriales.

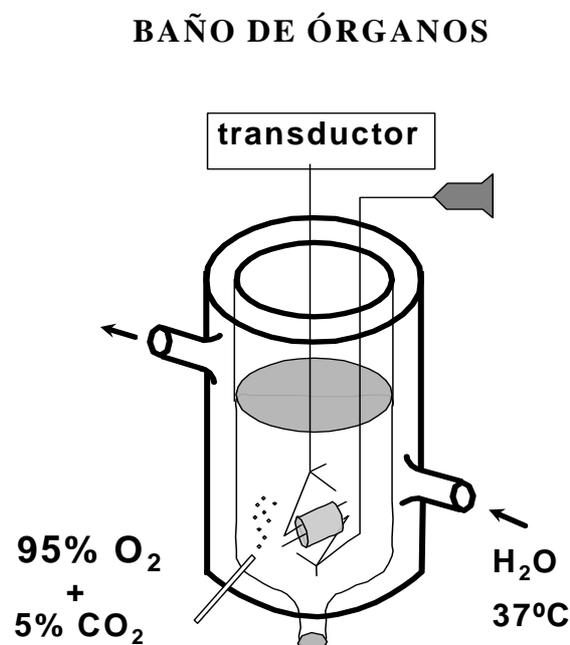


Figura 2: Disposición de un segmento cilíndrico de arteria en el baño de órganos

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, o bien un polígrafo (Omniscribe Serie D5000/Letica Poligraf 4006), o un sistema informatizado de recogida de datos (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 trazado de tono activo, el desplazamiento producido hasta el efecto máximo desarrollado por cada una de las 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). Las cantidades obtenidas pueden expresarse en términos absolutos (mg) o relativos, es decir, porcentualmente, bien respecto al efecto máximo producido por un estímulo aplicado con anterioridad (en nuestro caso KCl 50 mM) o bien respecto al tono activo.

2.3. Procedimiento experimental

Una vez situados los segmentos arteriales en el baño de órganos, previa calibración del aparato, se les aplica mediante rotación del tornillo micrométrico, una tensión basal de 2 g. Dado que la tendencia inmediata de los segmentos arteriales es relajarse, la tensión debe reajustarse

periódicamente hasta que se estabilizan a dicha tensión. Durante este período el líquido nutritivo se renueva cada 15 minutos. Una vez alcanzada una tensión basal constante de 2 g y con el fin de analizar la reactividad de los segmentos arteriales, éstos se someten a un estímulo despolarizante con una solución de KCl 50 mM. No hubo diferencias significativas en la respuesta al KCl entre segmentos arteriales de conejo control y de conejo diabético. Los segmentos arteriales que exhiben una contracción frente a este estímulo menor de 1 g son descartados. Posteriormente, se realizan varios lavados de las arterias con la solución nutritiva hasta que de nuevo alcanzan su tensión basal, dejando transcurrir siempre un tiempo mínimo de 45-60 minutos antes de iniciar las curvas concentración-respuesta. Dichas curvas se obtuvieron mediante la adición al baño de órganos de dosis acumulativas del fármaco a estudiar. Cada dosis se añade cuando la inmediatamente anterior ha desarrollado su efecto máximo, siendo la concentración del fármaco en el baño cuando se aplica una dosis, la suma de esta última con las dosis administradas con anterioridad a ella. El volumen total de los fármacos añadidos al baño no supera en ningún caso el 10% del volumen del líquido del baño.

Para la obtención de las curvas concentración-respuesta de Ach, los segmentos de arteria renal fueron previamente sometidos a un tono activo mediante la adición al baño de órganos de una dosis única de 5-HT (10^{-5} M). La 5-HT produjo una contracción que, tras alcanzar su valor máximo, se mantuvo estable en valores de tensión superiores a 1 g (3155 ± 289 mg para segmentos arteriales procedentes de animal control y 3417 ± 306 mg para

segmentos arteriales procedentes de animal diabético). Los segmentos arteriales en los que la contracción provocada por 5-HT 10^{-5} M no se mantuvo estable o fue inferior a 1g fueron descartados. Tras la aplicación de la 5-HT y una vez estabilizados los segmentos arteriales en su correspondiente tono activo, se obtuvieron las curvas concentración-respuesta de Ach de forma acumulativa.

2.4. Protocolo experimental

2.4.1. Estudio de la respuesta de la arteria renal de conejo a la Ach y del efecto de la diabetes experimental sobre dicha respuesta

Para el estudio de la respuesta de la arteria renal a la Ach, de los mecanismos que la modulan así como de la influencia de la diabetes sobre la respuesta arterial global y sobre cada uno de los mecanismos que participan en la misma, se realizaron curvas concentración-respuesta de Ach (10^{-9} - 10^{-5} M), en arterias precontraídas con 5-HT (10^{-5} M), en situación control y en cada una de las siguientes condiciones experimentales:

a) Para analizar el papel del endotelio en dichas respuestas, se obtuvieron curvas concentración-respuesta de Ach en segmentos desprovistos de endotelio. La eliminación del endotelio vascular se realizó mediante el legrado de la superficie íntima, siguiendo el método de Furchgott y Zawadzki (1980). Básicamente el procedimiento consiste en introducir en la luz del segmento arterial una aguja cuya superficie ha sido lijada previamente. Una vez introducida la aguja en la luz arterial y con la ayuda de un pincel, se hace rodar varias veces y con suavidad el segmento vascular sobre la superficie

rugosa de la aguja, tanto en sentido longitudinal como transversal, para asegurar su completa destrucción.

b) Con el fin de estudiar la posible participación del NO en la respuesta, se obtuvieron curvas concentración-respuesta de Ach tras la incubación (20 minutos) de los segmentos arteriales con el inhibidor de la síntesis de NO, N^G-nitro-L-arginina (L-NA, 10^{-5} y 10^{-4} M).

c) Para valorar la participación de metabolitos derivados del ácido araquidónico por la vía de la ciclooxigenasa en la respuesta relajante, se obtuvieron curvas concentración-respuesta de Ach en presencia del inhibidor del enzima, indometacina 10^{-5} M, el cual se añadió al baño 20 minutos antes de realizar la curva de Ach.

d) Para examinar si en la respuesta relajante a la Ach participaban otros factores distintos al NO o a la PGI₂, se realizaron curvas concentración-respuesta en arterias previamente incubadas durante 20 minutos con L-NA (10^{-4} M) e indometacina (10^{-5} M).

e) Para ver la participación del EDHF, se realizaron curvas concentración-respuesta para la Ach en arterias despolarizadas con KCl 30 mM e incubadas con L-NA (10^{-4} M) más indometacina (10^{-5} M).

Por otra parte, para detectar los posibles cambios en la sensibilidad al NO de las células del músculo liso vascular, se realizaron curvas concentración-respuesta de nitroprusiato sódico (10^{-9} - 10^{-4} M), un dador de NO que produce vasodilatación independiente de endotelio. Los segmentos arteriales fueron previamente contraídos con 5-HT (10^{-5} M).

Todos los experimentos descritos en los diferentes apartados se realizaron en arterias de animal control y en arterias procedentes de conejo diabético.

2.4.2. Estudio de la respuesta vasoconstrictora a la 5-HT de la arteria renal de conejo y del efecto de la diabetes experimental sobre dicha respuesta

Para el estudio de la respuesta de la arteria renal a la 5-HT, de los mecanismos que la modulan así como de la influencia de la diabetes sobre la respuesta arterial global y sobre cada uno de los mecanismos que participan en la misma, se realizaron curvas concentración-respuesta de 5-HT (10^{-8} – 3×10^{-6} M), en situación control y en cada una de las siguientes condiciones experimentales:

a) El papel del endotelio en la respuesta se analizó mediante la obtención de curvas concentración-respuesta de 5-HT en segmentos desprovistos de endotelio. La eliminación del endotelio vascular se realizó de forma mecánica siguiendo el método de Furchgott y Zawadzki (1980).

b) Con el fin de estudiar la posible participación del NO en dicha respuesta, se realizaron curvas concentración-respuesta de 5-HT tras la incubación (20 minutos) de los segmentos arteriales con el inhibidor de la síntesis de NO, L-NA (10^{-4} M).

c) La posible influencia de NO extraendotelial en la respuesta constrictora se analizó mediante la obtención de curvas concentración-respuesta de 5-HT en segmentos desprovistos de endotelio y previamente incubados durante 20 minutos con L-NA (10^{-4} M).

d) Para valorar la participación de metabolitos derivados del ácido araquidónico a través de la vía de la ciclooxigenasa en la respuesta constrictora, se obtuvieron curvas concentración-respuesta de 5-HT en presencia del inhibidor de dicho enzima, indometacina 10^{-5} M, el cual se añadió al baño 20 minutos antes de realizar la curva con 5-HT.

e) Para comprobar la participación conjunta que pudiera tener el NO y las sustancias derivadas de la ciclooxigenasa en la respuesta contráctil provocada por la 5-HT, se estudió la respuesta a esta amina de los segmentos vasculares incubados con L-NA (10^{-4} M) e indometacina (10^{-5} M).

Todos los experimentos descritos en los diferentes apartados se realizaron en arterias de animal control y en arterias procedentes de conejo diabético.

2.4.3. Estudio de la respuesta vasoconstrictora de la arteria renal de conejo a la ET-1 y del efecto de la diabetes experimental sobre dicha respuesta

Para el estudio de la respuesta de la arteria renal a la ET-1, de los mecanismos que la modulan así como de la influencia de la diabetes sobre la respuesta arterial global y sobre cada uno de los mecanismos que participan en la misma, se realizaron curvas concentración-respuesta de ET-1 (10^{-11} - 3×10^{-8} M), en situación control y en cada una de las siguientes condiciones experimentales:

a) Para analizar el papel del endotelio en dicha respuesta, se obtuvieron curvas concentración-respuesta de ET-1 en segmentos

desprovistos de endotelio. La eliminación del endotelio vascular se realizó de forma mecánica siguiendo el método de Furchgott y Zawadzki (1980).

b) Con el fin de estudiar la posible participación del NO en la respuesta, se obtuvieron curvas concentración-respuesta de ET-1 tras la incubación (20 minutos) de los segmentos arteriales con el inhibidor de la síntesis de NO, L-NA (10^{-4} M).

c) Para valorar la participación de metabolitos derivados del ácido araquidónico por la vía de la ciclooxigenasa en la respuesta constrictora, se obtuvieron curvas concentración-respuesta de ET-1 en presencia del inhibidor de la ciclooxigenasa, indometacina (10^{-5} M), el cual se añadió al baño 20 minutos antes de realizar la curva de ET-1.

d) Para valorar el origen endotelial o muscular de los derivados del ácido araquidónico que modulan la respuesta arterial a la ET-1 se realizaron curvas concentración-respuesta de ET-1 en arterias legradas e incubadas con indometacina (10^{-5} M).

Con el fin de estudiar el posible efecto de la diabetes sobre cada uno de estos mecanismos, todos los experimentos descritos se realizaron en arterias procedentes de conejos control y en arterias procedentes de conejos diabéticos.

2.5. Análisis de los resultados

La respuesta contráctil a la 5-HT y a la ET-1 se expresó como porcentaje respecto a la contracción inducida por KCl (50 mM), mientras que la respuesta vasodilatadora inducida por la Ach y el nitroprusiato sódico se

expresaron porcentualmente respecto al tono activo previamente inducido por 5-HT (10^{-5} M).

Cada curva concentración-respuesta se repitió en segmentos arteriales procedentes de animales diferentes. Los datos se agruparon posteriormente según el tipo de experimento y a partir de los resultados obtenidos para cada una de las concentraciones se calculó la media aritmética, la desviación típica y el error estándar de la media (EEM). Estos valores nos permitieron obtener las curvas concentración-respuesta medias para cada una de las situaciones experimentales. Por otra parte, para cada curva concentración-respuesta, se calculó la concentración eficaz 50 (CE_{50}), es decir, aquella concentración de la sustancia que produce la mitad del efecto máximo (E_{max}). Para ello, se halla la mitad del efecto máximo y las concentraciones que lo acotan y a continuación se calcula 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} .

El análisis estadístico para determinar las posibles diferencias entre los valores de efecto máximo y pD_2 obtenidos para las distintas situaciones experimentales planteadas, se realizó dentro de cada grupo de animales mediante un análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test de Student-Newman-Keuls. La comparación de cada situación experimental entre el grupo

de animales control y el grupo de animales diabéticos se realizó con el test de la t de Student. Las diferencias se consideraron significativas si $P < 0.05$.

3. FÁRMACOS Y SOLUCIONES

Los productos utilizados en el presente trabajo y la procedencia de cada uno de ellos son los que aparecen en la tabla 2.

El aloxano se disolvió en solución salina fisiológica.

Para preparar la solución nutritiva de Ringer Locke en primer lugar se preparó una solución concentrada (20x) de cloruros (NaCl , KCl , CaCl_2 , MgCl_2) que se diluyó en el momento de su uso, añadiendo entonces el NaHCO_3 y la glucosa. La solución despolarizante de KCl 50 mM, se preparó del mismo modo que la solución de Ringer Locke, pero sustituyendo parte del NaCl por una cantidad equimolar de KCl .

La 5-HT, Ach y L-NA se disolvieron en agua bidestilada y se diluyeron en solución salina fisiológica. Para la completa disolución de la L-NA fue necesaria la aplicación de ultrasonidos. La indometacina se disolvió en etanol y se diluyó en solución salina fisiológica. El nitroprusiato sódico se disolvió y diluyó con solución salina fisiológica.

La ET-1 se disolvió en ácido acético 0.1% y se diluyó en una solución que contiene la siguiente composición: tampón fosfato salino (NaCl 150 mM + NaH_2PO_4 10 mM) + seroalbúmina bovina al 0.05%.

Tabla 2: Productos utilizados y procedencia

Producto	Procedencia
Acetilcolina	Sigma-Aldrich
Alcohol etílico	Panreac
Ácido acético glacial	Panreac
Aloxano	Sigma-Aldrich
Bicarbonato sódico (NaHCO ₃)	Panreac
Clorhidrato ketamina, Ketolar [®]	Parke Davis
Cloruro cálcico (CaCl ₂ ·H ₂ O)	Merck
Cloruro magnésico (MgCl ₂ ·6H ₂ O)	Merck
Cloruro potásico (KCl)	Merck
Cloruro sódico (NaCl)	Panreac
Endotelina-1	Sigma-Aldrich
Fosfato sódico monobásico (NaH ₂ PO ₄)	Panreac
Glucosa	Panreac
5-hidroxitriptamina	Sigma-Aldrich
Indometacina	Sigma-Aldrich
N ⁶ -nitro-L-arginina	Peptide Institute Inc
Nitroprusiato sódico	RBI
Seroalbúmina bovina, Grado V	Sigma-Aldrich
Sol. salina fisiológica	Lab. Grifols SA
Solución glucosaza 5%	Lab. Grifols SA
Tiobarbital	B. Braun Medical SA

RESULTADOS

1. INFLUENCIA DE LA DIABETES SOBRE LA RESPUESTA A LA ACH DE LA ARTERIA RENAL DE CONEJO

1.1. Efecto de la Ach

La adición al baño de órganos de concentraciones crecientes de Ach (10^{-9} - 10^{-5} M) produjo relajación, de magnitud dependiente de la concentración, de los segmentos de arteria renal de conejo contraídos previamente con 5-HT 10^{-5} M (Figura 3).

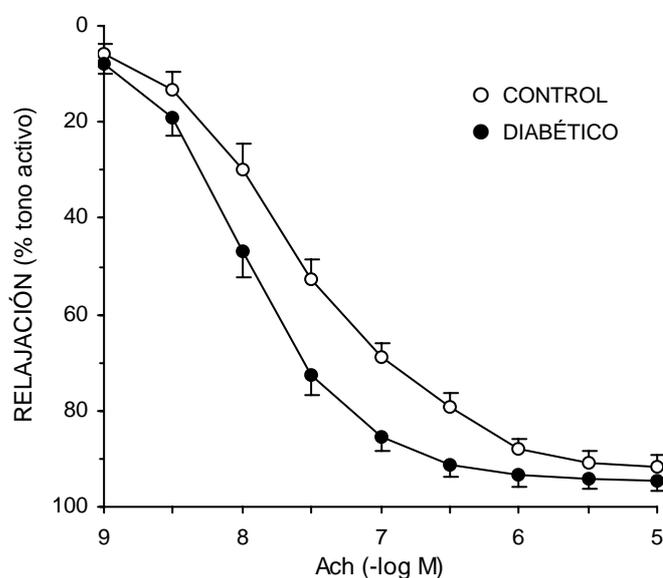


Figura 3: Curva concentración-respuesta de acetilcolina en segmentos de arteria renal procedentes de conejo control y conejo diabético. Los datos se expresan como porcentaje del tono activo inducido con 5-hidroxitriptamina 10^{-5} M y representan la media \pm EEM.

En los segmentos arteriales procedentes del grupo de animales control, la relajación máxima inducida por la Ach fue de 1614 ± 216 mg ($92 \pm 2\%$ del tono activo inducido por 5-HT 10^{-5} M), siendo el valor de la CE_{50} de

$3.0 (2.1-4.1) \times 10^{-8}$ M. En los segmentos arteriales procedentes de animales diabéticos, la Ach produjo una relajación con un E_{max} que no fue significativamente diferente del observado en animales control, mientras que el valor de la CE_{50} fue significativamente menor que el obtenido en arterias procedentes de animales control (Figura 3, Tabla 3), es decir, la diabetes aumentó la potencia relajante de la Ach en la arteria renal de conejo.

1.2. Efecto de la Ach tras la eliminación del endotelio

La eliminación mecánica del endotelio de los segmentos arteriales prácticamente elimina la respuesta relajante a la Ach tanto en los segmentos arteriales procedentes de conejos control como en los segmentos arteriales procedentes de conejos diabéticos (Figura 4, Tabla 3).

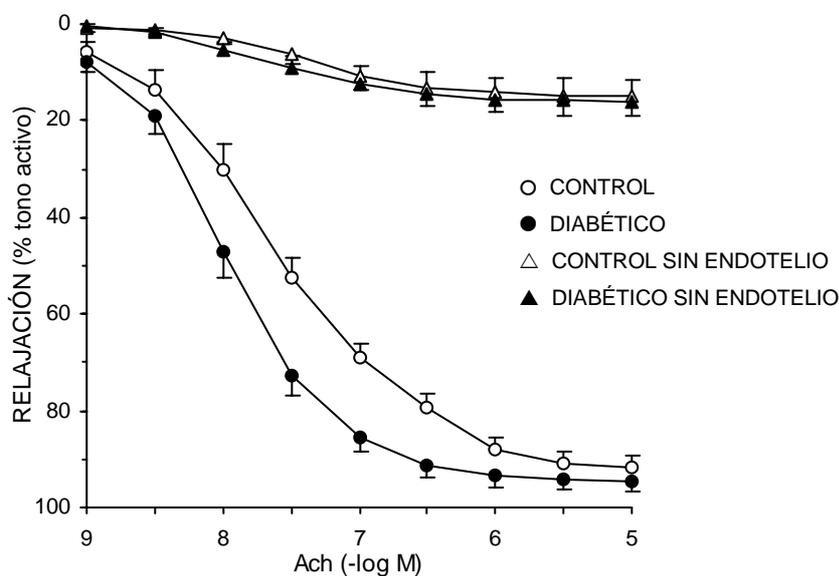


Figura 4: Curva concentración-respuesta de acetilcolina en segmentos de arteria renal procedentes de conejo control y conejo diabético, con endotelio y sin endotelio. Los datos se expresan como porcentaje del tono activo inducido con 5-hidroxitriptamina 10^{-5} M y representan la media \pm EEM.

1.3. Efecto de la Ach tras la incubación con L-NA

En arterias procedentes de animales control, la incubación con el inhibidor de la síntesis de NO, L-NA (10^{-5} M), no modificó significativamente ni el E_{\max} ni la CE_{50} de las curvas concentración-respuesta de la Ach comparadas con la situación control (Figura 5, Tabla 3). Sin embargo, la incubación de los segmentos arteriales de animales diabéticos con la misma concentración de inhibidor inhibió significativamente la potencia de la respuesta relajante de la Ach (aumentó la CE_{50}) sin modificar el efecto máximo (Figura 6, Tabla 3).

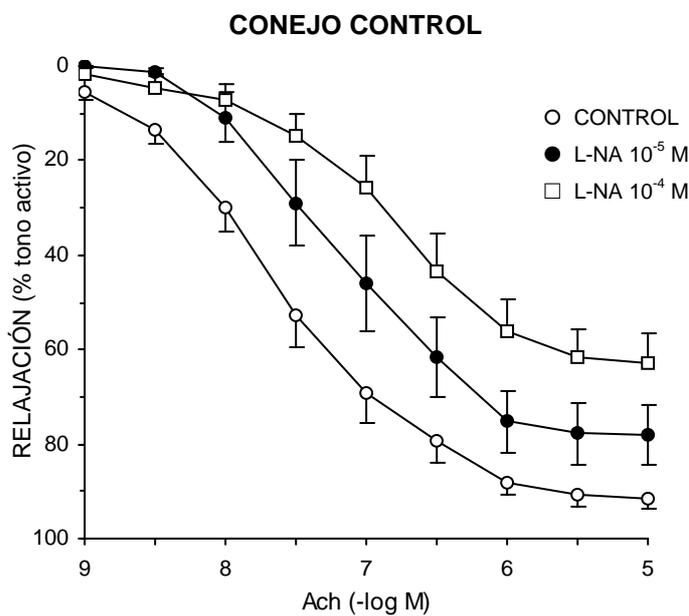


Figura 5: Curva concentración-respuesta de acetilcolina en segmentos de arteria renal procedentes de conejo control en situación control y tras la incubación con N^G -nitro-L-arginina (L-NA, 10^{-5} M y 10^{-4} M). Los datos se expresan como porcentaje del tono activo inducido con 5-hidroxitriptamina 10^{-5} M y representan la media \pm EEM.

La incubación con concentraciones mayores de L-NA (10^{-4} M) indujo una inhibición significativa de la respuesta relajante a la Ach de la arteria renal de conejo en ambos grupos de animales. El E_{max} de las curvas concentración-respuesta de la Ach disminuyó respecto a la situación control en ambos grupos de animales mientras que la CE_{50} disminuyó respecto a dicha situación en el grupo de conejos control y aumentó en el grupo de conejos diabéticos (Figuras 5 y 6, Tabla 3).

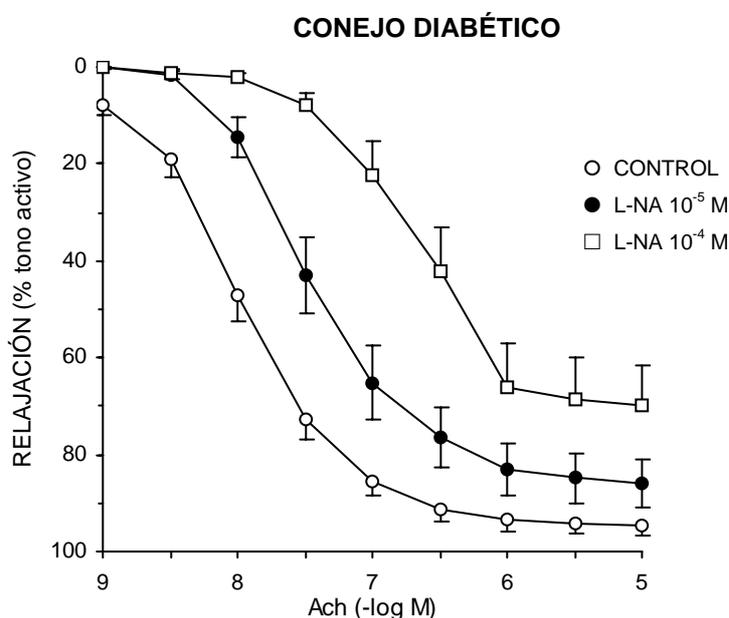


Figura 6: Curva concentración-respuesta de acetilcolina en segmentos de arteria renal procedentes de conejo diabético en situación control y tras la incubación con N^G -nitro-L-arginina (L-NA, 10^{-5} M y 10^{-4} M). Los datos se expresan como porcentaje del tono activo inducido con 5-hidroxitriptamina 10^{-5} M y representan la media \pm EEM.

No hubo diferencias significativas entre las curvas concentración-respuesta de la Ach de los segmentos arteriales preincubados con L-NA (10^{-5} y 10^{-4} M) entre el grupo de animales diabéticos y el grupo de animales control (Tabla 3).

La inhibición de la respuesta relajante a la Ach de los segmentos arteriales producida por L-NA (10^{-5} y 10^{-4} M) resultó significativamente más baja que la producida por la destrucción mecánica del endotelio en ambos grupos de animales (Figura 7, Tabla 3).

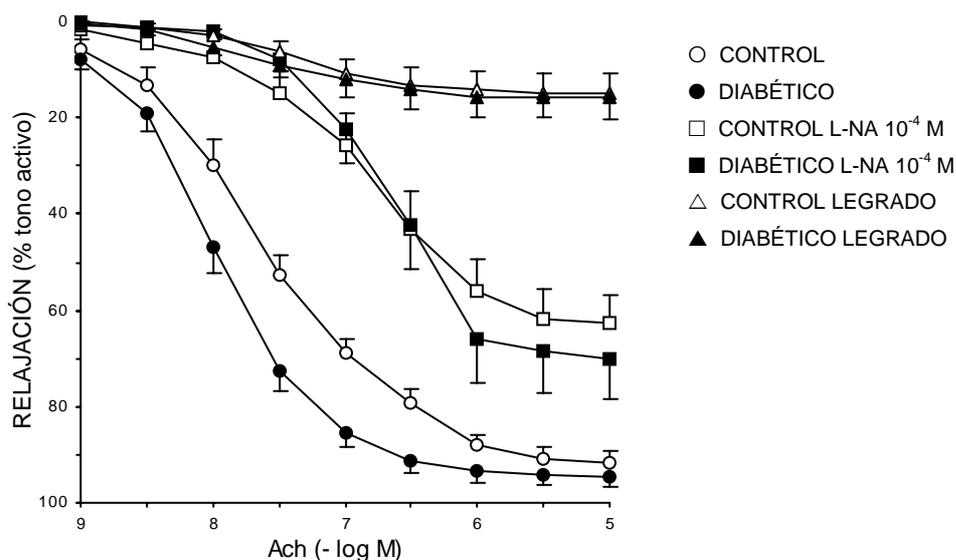


Figura 7: Curva concentración-respuesta de acetilcolina en segmentos de arteria renal procedentes de conejo control y conejo diabético, en situación control, en arterias legradas y tras la incubación con *N*^G-nitro-L-arginina (L-NA, y 10^{-4} M). Los datos se expresan como porcentaje del tono activo inducido con 5-hidroxitriptamina 10^{-5} M y representan la media \pm EEM.

1.4. Efecto de la Ach tras la incubación con indometacina

La incubación de los segmentos arteriales con el inhibidor de la ciclooxigenasa, indometacina (10^{-5} M), inhibió de forma significativa la relajación máxima provocada por la Ach tanto en las arterias procedentes de animales control (Figura 8, Tabla 3) como en las procedentes de animales diabéticos (Figura 9, Tabla 3).

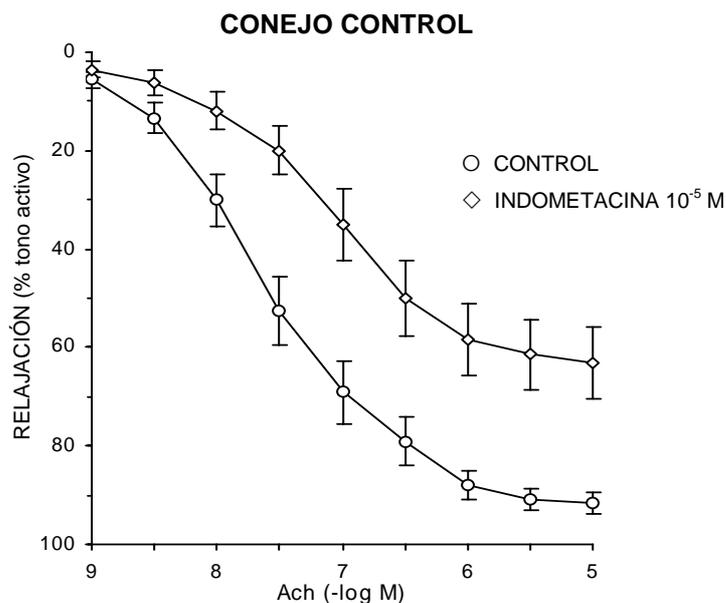


Figura 8: Curva concentración-respuesta de acetilcolina en segmentos de arteria renal procedentes de conejo control en situación control y tras la incubación con indometacina 10^{-5} M. Los datos se expresan como porcentaje del tono activo inducido con 5-hidroxitriptamina 10^{-5} M y representan la media \pm EEM.

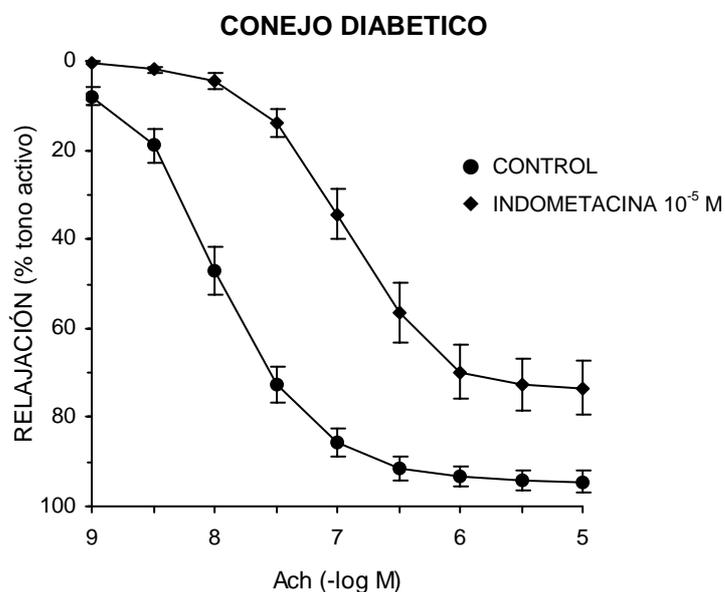


Figura 9: Curva concentración-respuesta de acetilcolina en segmentos de arteria renal procedentes de conejo diabético en situación control y tras la incubación con indometacina 10^{-5} M. Los datos se expresan como porcentaje del tono activo inducido con 5-hidroxitriptamina 10^{-5} M y representan la media \pm EEM.

Al comparar las curvas concentración respuesta de Ach en presencia de indometacina no hubo diferencias significativas entre los dos grupos de animales (Figura 10, Tabla 3).

Tanto en el grupo de animales control como en el grupo de animales diabéticos, la inhibición de la respuesta relajante a la Ach producida por la incubación de los segmentos arteriales con indometacina fue significativamente más baja que la producida por la eliminación mecánica del endotelio (Figura 10, Tabla 3).

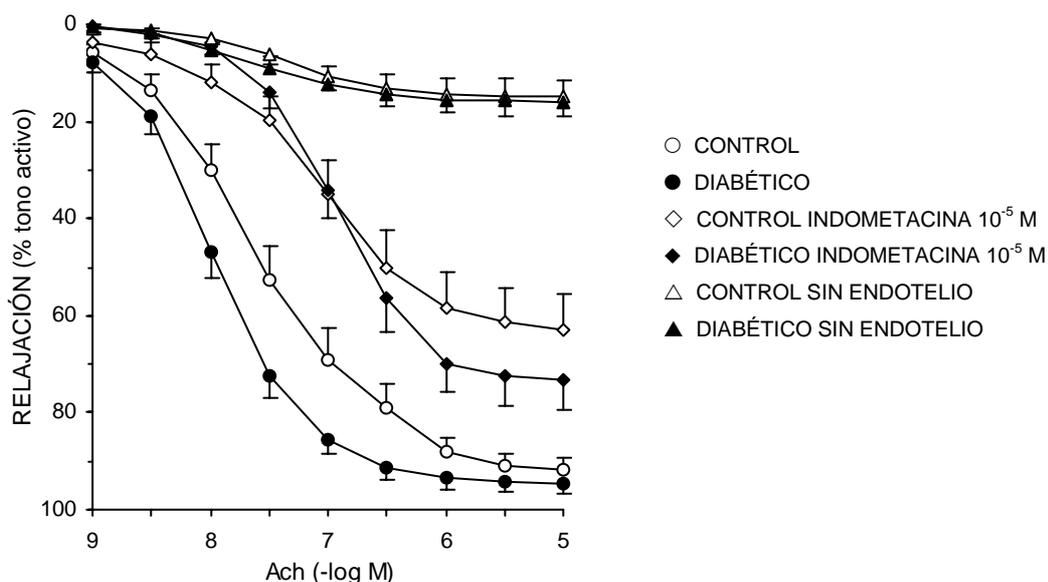


Figura 10: Curva concentración-respuesta de acetilcolina en segmentos de arteria renal procedentes de conejo control y conejo diabético en situación control, tras la incubación con indometacina 10^{-5} M y tras la eliminación mecánica del endotelio. Los datos se expresan como porcentaje del tono activo inducido con 5-hidroxitriptamina 10^{-5} M y representan la media \pm EEM.

1.5. Efecto de la Ach tras la incubación conjunta con L-NA e indometacina

La incubación de los segmentos arteriales con L-NA (10^{-4} M) e indometacina (10^{-5} M) conjuntamente produjo una inhibición de la respuesta relajante a la Ach en ambos grupos de animales. En el grupo de animales diabéticos esta inhibición fue significativamente mayor que en el grupo de animales control (Figura 11, Tabla 3).

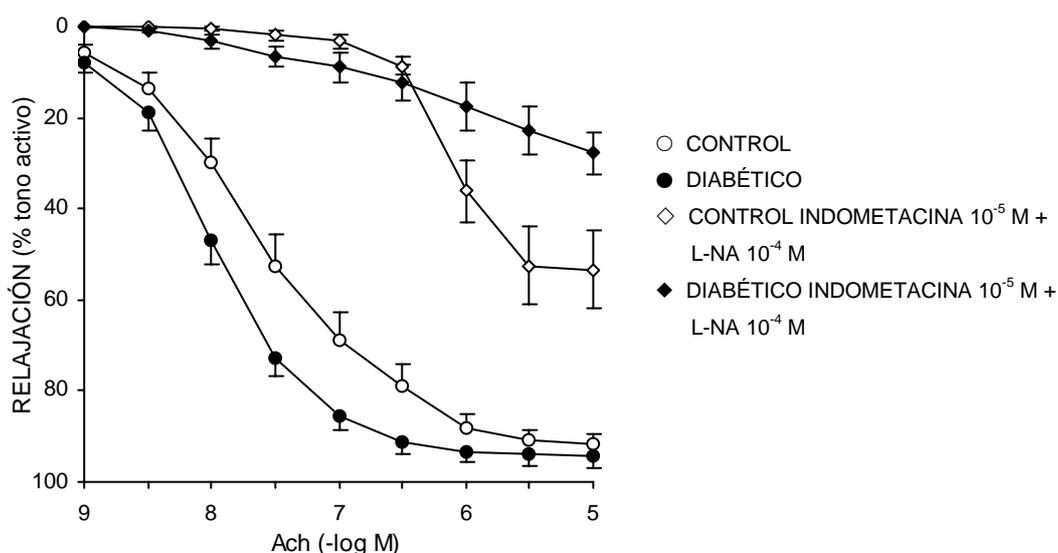


Figura 11: Curva concentración-respuesta de acetilcolina en segmentos de arteria renal procedentes de conejo control y conejo diabético en situación control y tras la incubación con indometacina 10^{-5} M más N^G -nitro-L-arginina (L-NA, y 10^{-4} M). Los datos se expresan como porcentaje del tono activo inducido con 5-hidroxitriptamina 10^{-5} M y representan la media \pm EEM.

En el grupo de animales control, la inhibición de la respuesta relajante a la Ach que produjo el tratamiento con los dos inhibidores fue significativamente menor que la producida por la eliminación mecánica del endotelio (Figura 12, Tabla 3).

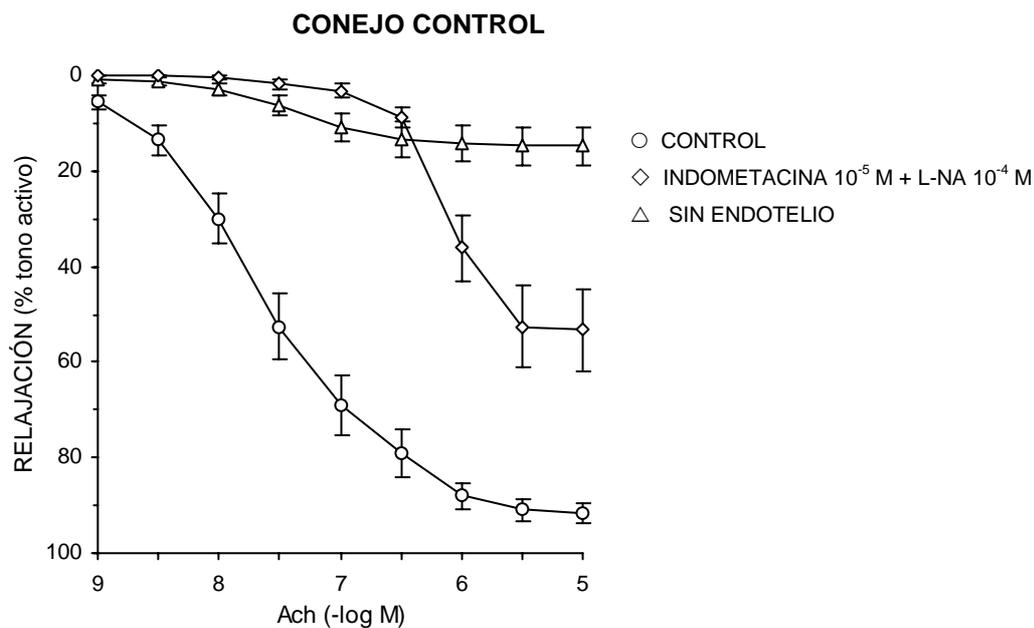


Figura 12: Curva concentración-respuesta de acetilcolina en segmentos de arteria renal procedentes de conejo control en situación control, tras la incubación con indometacina 10^{-5} M más *N*^G-nitro-L-arginina (L-NA, 10^{-4} M) y tras la eliminación mecánica del endotelio. Los datos se expresan como porcentaje del tono activo inducido con 5-HT 10^{-5} M y representan la media \pm EEM.

En el grupo de animales diabéticos, la incubación de los segmentos arteriales con ambos inhibidores al mismo tiempo indujo una mayor inhibición de la respuesta relajante a la Ach que la producida por ambos tratamientos por separado (Figura 13, Tabla 3).

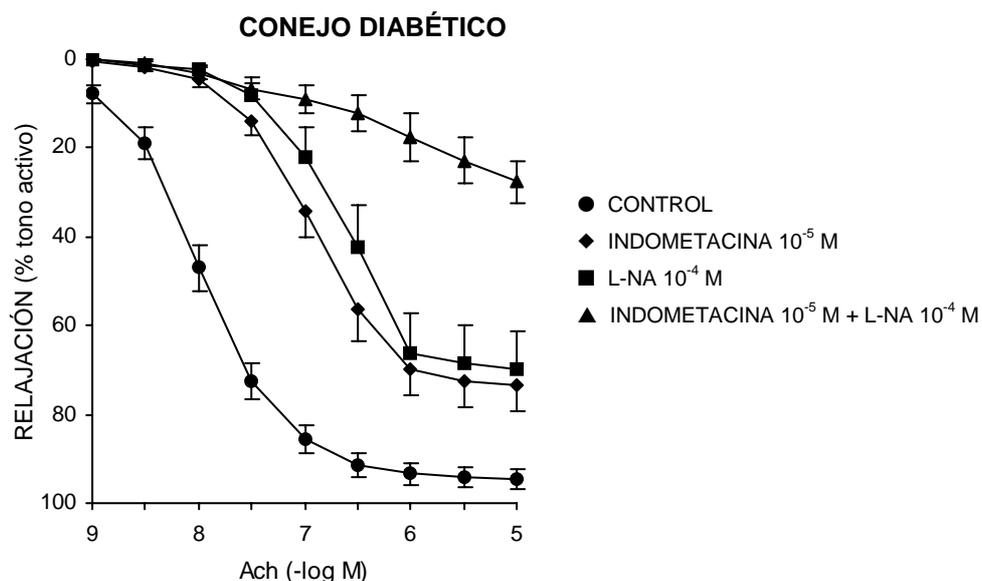


Figura 13: Curva concentración-respuesta de acetilcolina en segmentos de arteria renal procedentes de conejos diabéticos en situación control, tras la incubación con N^G -nitro-L-arginina (L-NA, 10^{-4} M), con indometacina 10^{-5} M e indometacina 10^{-5} M más L-NA 10^{-4} M. Los datos se expresan como porcentaje del tono activo inducido con 5-hidroxitriptamina 10^{-5} M y representan la media \pm EEM.

1.6. Efecto de la Ach tras la incubación conjunta con L-NA e indometacina en arterias despolarizadas con KCl

En arterias despolarizadas con KCl 30 mM e incubadas con L-NA (10^{-4} M) más indometacina (10^{-5} M) se inhibió totalmente la relajación inducida por Ach en ambos grupos de animales. No hubo diferencias significativas, en ninguno de los dos grupos, del efecto de la Ach producido con este tratamiento comparado con el que produjo en arterias en las que se había eliminado el endotelio.

La inhibición de la relajación producida por la Ach fue mayor en arterias tratadas con KCl+L-NA+indometacina que en las tratadas sólo con L-

NA+indometacina tanto en grupo diabético como en el grupo control (Figura 14, Tabla 2).

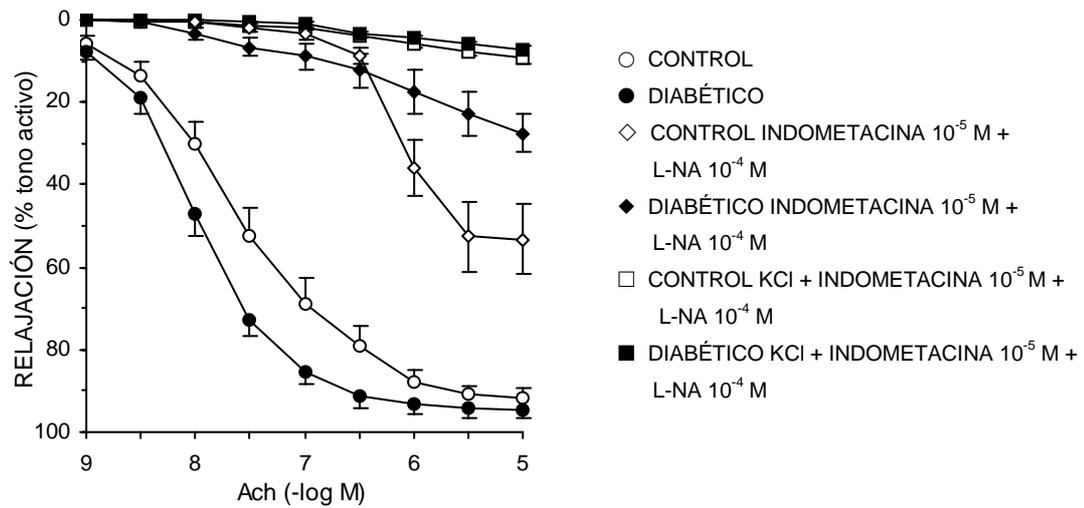


Figura 14: Curva concentración-respuesta de acetilcolina en segmentos de arteria renal procedentes de conejo control y conejo diabético en situación control, tras la incubación con indometacina 10^{-5} M más N^G -nitro-L-arginina (L-NA, 10^{-4} M) y en arterias precontraídas con KCl 30 mM e incubadas con indometacina 10^{-5} M más L-NA 10^{-4} M. Los datos se expresan como porcentaje del tono activo inducido con 5-hidroxitriptamina 10^{-5} M o KCl 30 mM y representan la media \pm EEM.

TABLA 3: Valores de CE_{50} y efecto máximo de relajación (E_{max}) para las curvas concentración-respuesta a la acetilcolina en arteria renal de conejo

Conejo control	EC_{50} (M)	E_{max} (%)	n
Control	$3.0 (2.1-4.1) \times 10^{-8}$	92 ± 2	24
Legrado	$4.5 (3.0-6.8) \times 10^{-8}$	15 ± 4^a	13
L-NA 10^{-5} M	$6.8 (4.7-9.8) \times 10^{-8}$	78 ± 6^b	11
L-NA 10^{-4} M	$1.5 (1.1-2.1) \times 10^{-7}^a$	$63 \pm 6^{a,b}$	14
Indometacina 10^{-5} M	$9.1 (6.9-12.0) \times 10^{-8}^a$	$63 \pm 7^{a,b}$	15
L-NA 10^{-4} M + Indometacina 10^{-5} M	$4.9 (3.5-6.9) \times 10^{-7}^{a,b,c}$	$53 \pm 8^{a,b}$	7
KCl + L-NA 10^{-4} M + Indometacina 10^{-5} M	-	$9 \pm 2^{a,c,d,e}$	10
Conejo diabético	EC_{50} (M)	E_{max} (%)	n
Control	$1.0 (0.9-1.2) \times 10^{-8}^f$	95 ± 2	20
Legrado	$3.3 (2.0-5.4) \times 10^{-8}^a$	16 ± 5^a	11
L-NA 10^{-5} M	$4.3 (3.2-5.6) \times 10^{-8}^{a,c,d}$	86 ± 5^b	14
L-NA 10^{-4} M	$2.3 (1.8-3.0) \times 10^{-7}^{a,b}$	$70 \pm 9^{a,b}$	11
Indometacina 10^{-5} M	$1.2 (1.0-1.5) \times 10^{-7}^a$	$73 \pm 6^{a,b}$	11
L-NA 10^{-4} M + Indometacina 10^{-5} M	$5.1 (2.2-12.0) \times 10^{-7}^{a,b,c}$	$28 \pm 5^{a,c,d,f}$	8
KCl + L-NA 10^{-4} M + Indometacina 10^{-5} M	-	$7 \pm 2^{a,c,d,e}$	11

Los valores de E_{max} se expresan como porcentaje del tono activo inducido por 5-hidroxitriptamina 10^{-5} M, exceptuando la situación experimental "KCl + L-NA + indometacina" en donde el tono activo se indujo con KCl 30 mM, y representan la media \pm EEM. Los valores de CE_{50} se expresan como media con su intervalo de confianza al 95%. n: número de segmentos arteriales.

^a Significativamente diferente del correspondiente valor control, $P < 0.05$

^b Significativamente diferente del correspondiente valor legrado, $P < 0.05$

^c Significativamente diferente del correspondiente valor "indometacina 10^{-5} M", $P < 0.05$

^d Significativamente diferente del correspondiente valor "L-NA 10^{-4} M", $P < 0.05$

^e Significativamente diferente del correspondiente valor "L-NA 10^{-4} M + indometacina 10^{-5} M", $P < 0.05$

^f Significativamente diferente del correspondiente valor del grupo de conejos control, $P < 0.05$

1.7. Efecto del nitroprusiato sódico en la arteria renal de conejo

La adición al baño de órganos de concentraciones crecientes de nitroprusiato sódico (10^{-9} - 10^{-4} M) produjo relajación de magnitud dependiente de la concentración de los segmentos de arteria renal de conejo contraídos previamente con 5-HT 10^{-5} M, en ambos grupos de animales (Figura 15). En la arteria renal procedente de conejo control el valor de la CE_{50} fue 8.7 (6.8 - 11.2) $\times 10^{-8}$ M y el valor del E_{max} resultó de 99 ± 1 % del tono activo ($n=9$). En arteria renal de conejo diabético, el valor de la CE_{50} fue 7.4 (5.1 - 10.7) $\times 10^{-8}$ M y el E_{max} de 99 ± 1 % del tono activo ($n=11$). No hubo diferencias significativas en estos valores, CE_{50} y E_{max} , entre el grupo control y el diabético.

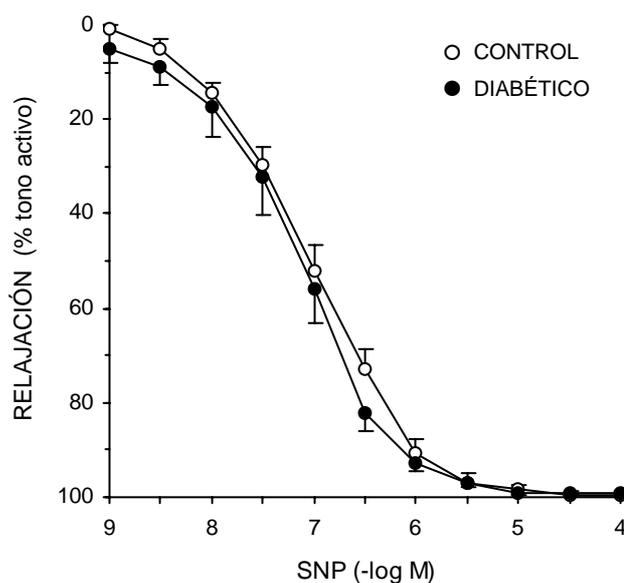


Figura 15: Curva concentración-respuesta de nitroprusiato sódico (SNP) en segmentos de arteria renal procedentes de conejo control y conejo diabético. Los datos se expresan como porcentaje del tono activo inducido con 5-hidroxitriptamina 10^{-5} M y representan la media \pm EEM.

2. INFLUENCIA DE LA DIABETES SOBRE LA RESPUESTA DE LA ARTERIA RENAL DE CONEJO A LA 5-HT

2.1. Efecto de la 5-HT

La adición al baño de órganos de concentraciones crecientes de 5-HT (10^{-8} - 3×10^{-6} M) produjo contracción de los segmentos de arteria renal de conejo, de magnitud dependiente de la concentración. En los segmentos arteriales procedentes del grupo de animales control la contracción alcanzó un E_{\max} del $22 \pm 3\%$ de la despolarización previa producida por KCl 50 mM, siendo el valor de la CE_{50} de $3.4 (3.1-3.7) \times 10^{-7}$ M. En los segmentos arteriales procedentes de animales diabéticos, la máxima contracción obtenida fue significativamente mayor que la obtenida en arterias procedentes del grupo control siendo el E_{\max} de la respuesta contráctil producida por la 5-HT del $34 \pm 4\%$ de la despolarización previa producida por KCl 50 mM. El valor de la CE_{50} para el grupo de animales diabéticos fue $3.2 (2.9-3.5) \times 10^{-7}$ M. No hubo diferencias significativas en el valor de la CE_{50} entre ambos grupos de animales (Figura 16, Tabla 4).

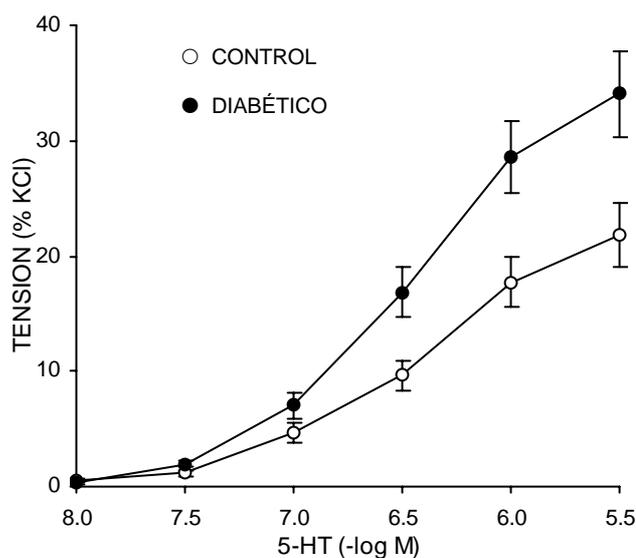


Figura 16: Curva concentración-respuesta de 5-hidroxitriptamina en segmentos de arteria renal procedentes de conejo control y conejo diabético. Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima alcanzada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media \pm EEM.

2.2. Efecto de la 5-HT tras la eliminación del endotelio

La 5-HT (10^{-8} - 3×10^{-6} M) produjo igualmente una respuesta contráctil, de magnitud dependiente de la concentración, en los segmentos arteriales sin endotelio procedentes de los dos grupos de animales, control y diabético (Figura 17).

En las arterias procedentes de conejos control, la eliminación del endotelio no modificó significativamente el E_{max} ni la CE_{50} de la curva concentración-respuesta de 5-HT (Figura 17, Tabla 4).

En los segmentos arteriales procedentes de conejos diabéticos la eliminación del endotelio produjo un aumento significativo del E_{max} y una disminución significativa de la CE_{50} de la curva concentración-respuesta de 5-

HT, siendo también el E_{\max} significativamente mayor al obtenido en arterias sin endotelio del grupo control (Figura 17, Tabla 4).

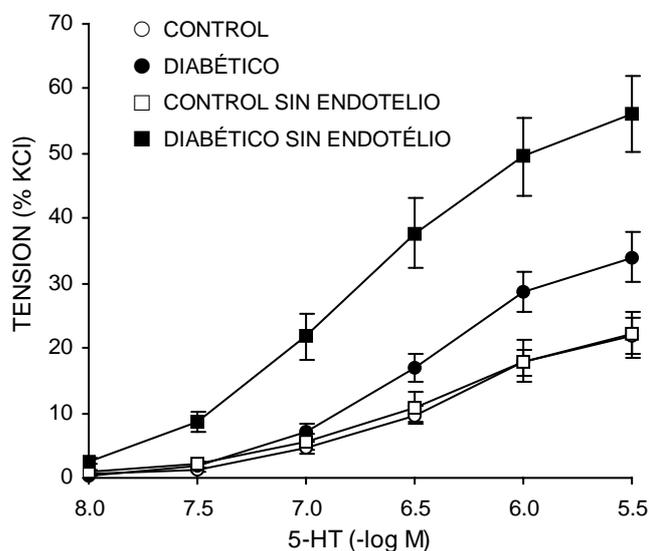


Figura 17: Curva concentración-respuesta de 5-hidroxitriptamina en segmentos de arteria renal procedentes de conejo control y conejo diabético, en situación control y en segmentos sin endotelio. Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima alcanzada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media \pm EEM.

2.3. Efecto de la 5-HT tras la incubación con L-NA

La incubación con el inhibidor de la síntesis de NO, L-NA (10^{-4} M), aumentó significativamente el E_{\max} de la curva concentración-respuesta de 5-HT tanto en las arterias procedentes de conejos control como en las arterias procedentes de conejos diabéticos. No hubo diferencias significativas en los valores de CE_{50} , (Figura 18, Tabla 4).

Al comparar las curvas de 5-HT obtenidas en segmentos arteriales procedentes de conejo control y conejo diabético preincubadas con L-NA 10^{-4}

M se encontraron diferencias significativas, siendo menor el E_{\max} obtenido en las arterias procedentes de animal diabético.

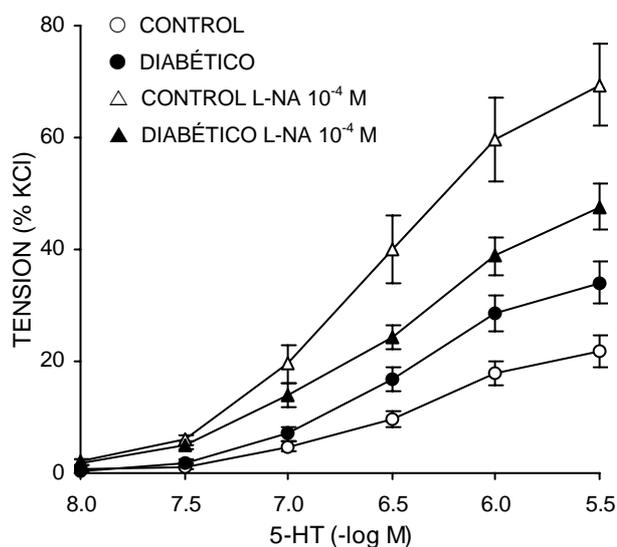


Figura 18: Curva concentración-respuesta de 5-hidroxitriptamina en segmentos de arteria renal procedentes de conejo control y conejo diabético, en situación control y tras la incubación con N^G -nitro-L-arginina (L-NA, 10^{-4} M). Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima alcanzada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media \pm EEM.

En arterias procedentes de animales control, el valor del E_{\max} de las curvas concentración respuesta para la 5-HT tras la incubación con L-NA fue significativamente mayor que el obtenido en arterias sin endotelio (Figura 19, Tabla 4). Sin embargo, en arterias procedentes de animales diabéticos no se encontraron diferencias significativas en la respuesta contráctil a la 5-HT entre las dos situaciones experimentales, incubación con L-NA y eliminación mecánica del endotelio (Figura 19, Tabla 4).

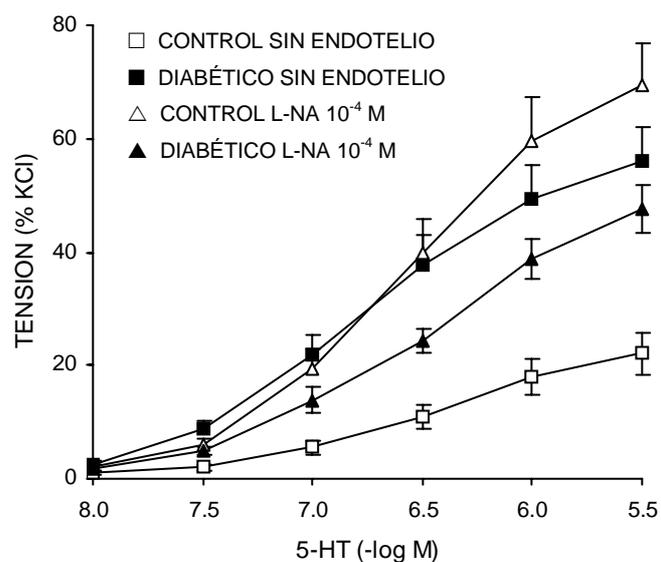


Figura 19: Curva concentración-respuesta de 5-hidroxitriptamina en segmentos de arteria renal procedentes de conejo control y conejo diabético, tras la eliminación mecánica del endotelio y tras la incubación con *N*^ϵ-nitro-L-arginina (L-NA, 10⁻⁴ M). Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima alcanzada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media ± EEM.

2.4. Efecto de la 5-HT tras la incubación con L-NA de los segmentos arteriales sin endotelio

En el grupo de animales control, la incubación de los segmentos desprovistos de endotelio con el inhibidor de la síntesis de NO, L-NA (10⁻⁴ M) provocó un aumento de la respuesta contráctil a la 5-HT. La CE₅₀ resultó significativamente más baja que en la situación control y el E_{max} fue significativamente mayor que el obtenido en la situación control y tras la eliminación del endotelio, pero fue significativamente menor que tras la incubación con L-NA únicamente (Figura 20, Tabla 4).

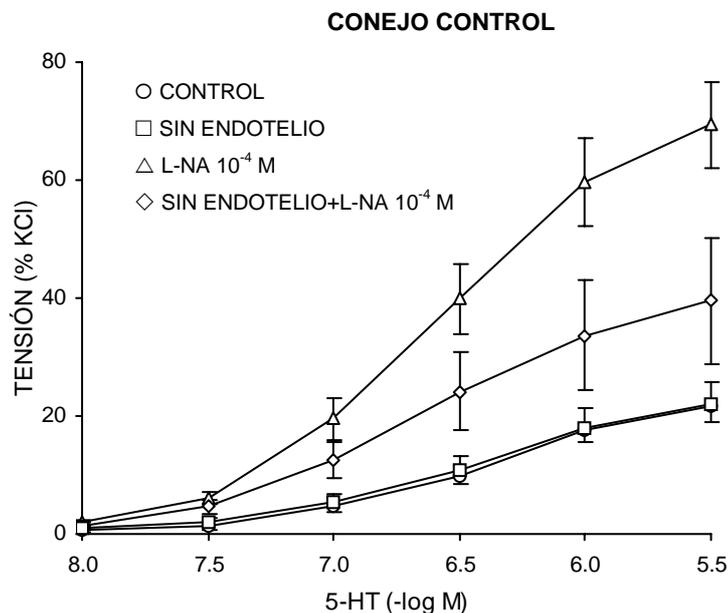


Figura 20: Curva concentración-respuesta de 5-hidroxitriptamina en segmentos de arteria renal procedentes de conejo control en las siguientes situaciones experimentales: control, eliminación mecánica del endotelio, incubación con N^G -nitro-L-arginina (L-NA, 10^{-4} M) y eliminación del endotelio más incubación con L-NA. 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.

En arterias procedentes de conejos diabéticos, la incubación de los segmentos legrados con L-NA (10^{-4} M) indujo un aumento significativo de la respuesta contráctil a la 5-HT respecto a la situación control, pero no se encontraron diferencias significativas respecto a la respuesta a la 5-HT de arterias sin endotelio o tras la incubación con L-NA (Figura 21, Tabla 4).

La respuesta contráctil a la 5-HT de los segmentos sin endotelio e incubados con L-NA no fue diferente entre ambos grupos de animales (Tabla 4).

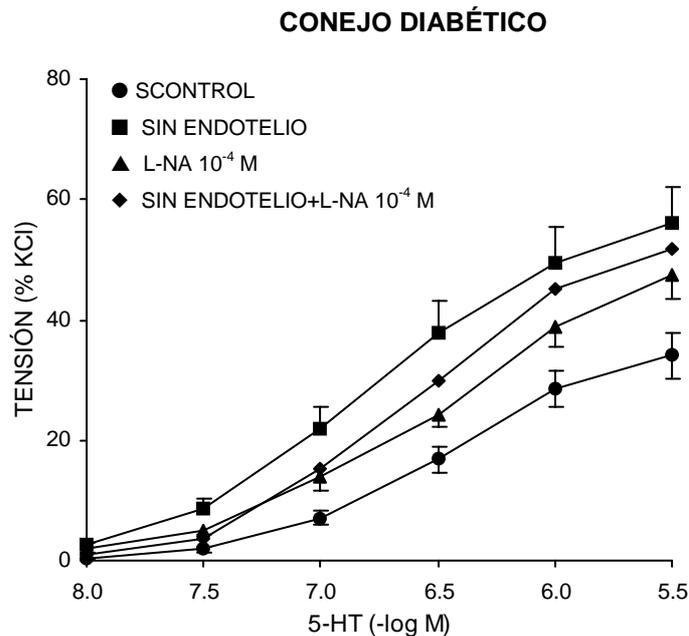


Figura 21: Curva concentración-respuesta de 5-hidroxitriptamina en segmentos de arteria renal procedentes de conejo diabético en las siguientes situaciones experimentales: control, eliminación mecánica del endotelio, incubación con *N*^ε-nitro-L-arginina (L-NA, 10⁻⁴ M) y eliminación del endotelio más incubación con L-NA. 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 ± EEM.

2.5. Efecto de la 5-HT tras la incubación con indometacina

Al analizar la respuesta a la 5-HT de los segmentos arteriales procedentes de conejos control tratados con el inhibidor de la enzima ciclooxigenasa, indometacina (10⁻⁵ M), se observó una disminución significativa del E_{max} sin producirse cambios en el valor de la CE₅₀ respecto del valor control. La contracción máxima de la arteria renal a la 5-HT en presencia de indometacina fue significativamente menor a la obtenida en segmentos desprovistos de endotelio y en los incubados con L-NA (Figura 22, Tabla 4).

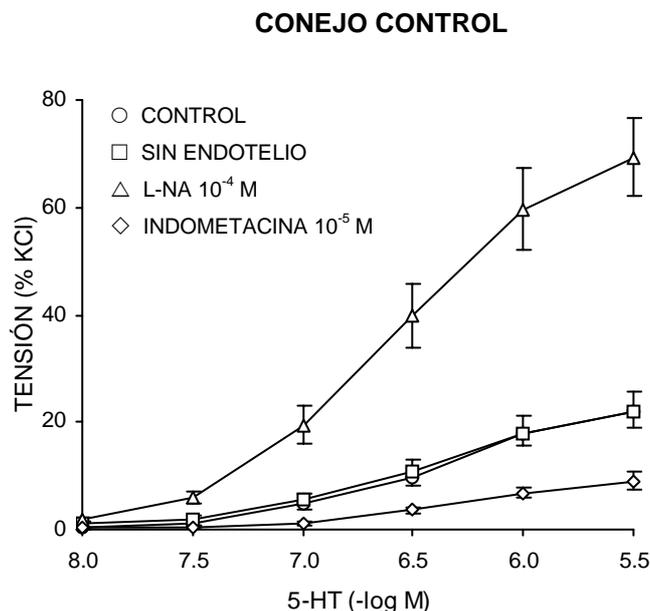


Figura 22: Curva concentración-respuesta de 5-hidroxitriptamina en segmentos de arteria renal procedentes de conejo control, en situación control, en segmentos sin endotelio, tras la incubación con *N*⁶-nitro-L-arginina (L-NA, 10⁻⁴ M) y en segmentos preincubados con indometacina 10⁻⁵M. Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima alcanzada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media ± EEM.

En arterias procedentes de conejos diabéticos, la incubación con indometacina (10⁻⁵ M) aumentó significativamente la máxima contracción inducida por 5-HT (Figura 23, Tabla 4).

Comparando las curvas obtenidas en segmentos arteriales de conejo control y conejo diabético incubados con indometacina observamos que el E_{max} fue significativamente mayor en el caso de las arterias procedentes de animal diabético y la CE_{50} significativamente menor (mayor potencia de la contracción) (Figura 24, Tabla 4).

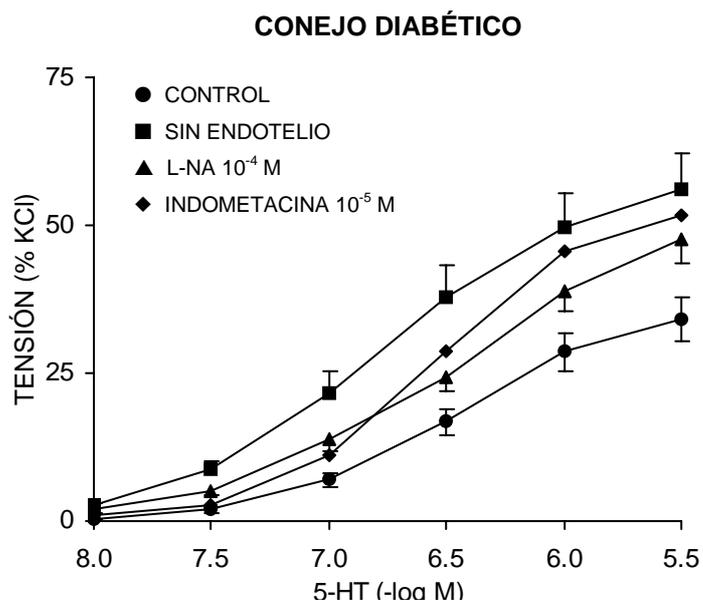


Figura 23: Curva concentración-respuesta de 5-hidroxitriptamina en segmentos de arteria renal procedentes de conejo diabético, en situación control, en segmentos sin endotelio, tras la incubación con *N*^ε-nitro-L-arginina (L-NA, 10⁻⁴ M) y en segmentos preincubados con indometacina 10⁻⁵ M. Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima alcanzada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media ± EEM.

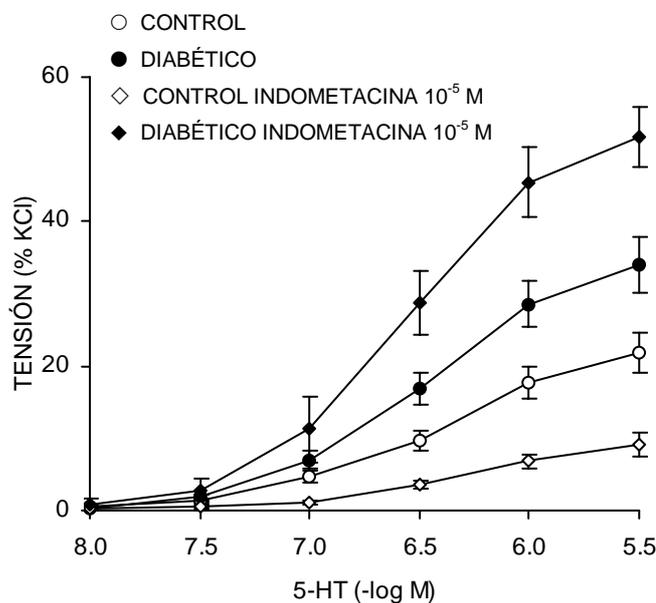


Figura 24: Curva concentración-respuesta de 5-hidroxitriptamina en segmentos de arteria renal procedentes de conejo control y conejo diabético, en situación control y tras la incubación con indometacina 10⁻⁵ M. Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima alcanzada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media ± EEM.

2.6. Efecto de la 5-HT tras la incubación conjunta con L-NA e indometacina

Las curvas obtenidas para la 5-HT de los segmentos arteriales de animales control, en presencia de L-NA e indometacina simultáneamente, tuvieron un E_{max} significativamente mayor que el obtenido en situación control, en arterias sin endotelio y en arterias tratadas con indometacina exclusivamente; sin embargo, el E_{max} resultó estadísticamente menor que el obtenido con arterias incubadas con L-NA. No hubo cambios significativos en el valor de la CE_{50} en ninguna de las situaciones experimentales citadas anteriormente (Figura 25, Tabla 4).

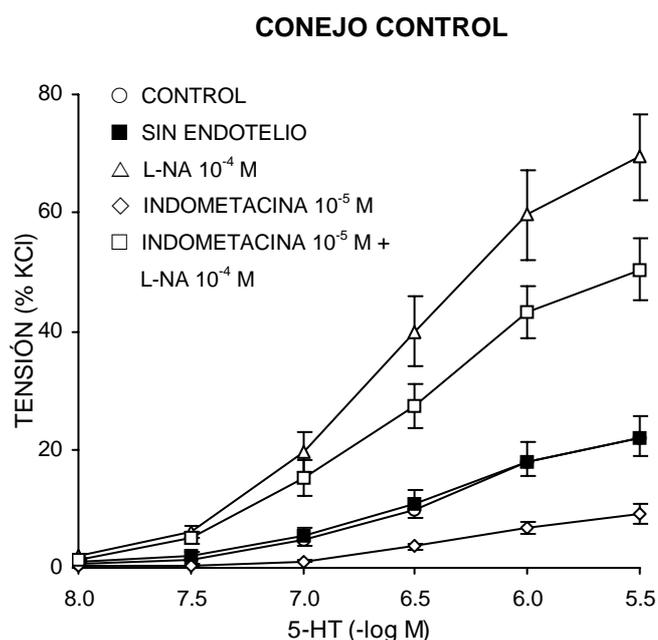


Figura 25: Curva concentración-respuesta de 5-hidroxitriptamina en segmentos de arteria renal procedentes de conejo control, en situación control, en segmentos sin endotelio, tras la incubación con N^G -nitro-L-arginina (L-NA, 10^{-4} M), en segmentos preincubados con indometacina 10^{-5} M y en segmentos preincubados con L-NA (10^{-4} M) e indometacina 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.

En los segmentos arteriales procedentes de animales diabéticos no se encontraron diferencias significativas ni en el E_{max} ni en la CE_{50} de la curva concentración respuesta para la 5-HT en presencia de L-NA e indometacina simultáneamente comparado con las otras situaciones experimentales (Figura 26, Tabla 4).

En presencia de los dos inhibidores juntos, no hubo diferencias significativas ni en el E_{max} ni en la CE_{50} de la curva concentración respuesta de 5-HT entre arterias procedentes de animal diabético y animal control (Figura 27, Tabla 4).

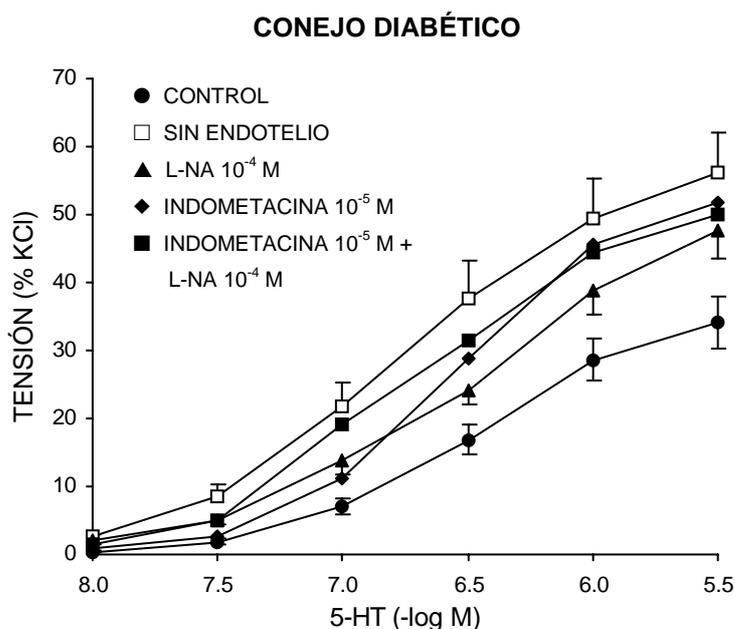


Figura 26: Curva concentración-respuesta de 5-hidroxitriptamina en segmentos de arteria renal procedentes de conejo diabético, en situación control, en segmentos sin endotelio, tras la incubación con *N*⁶-nitro-L-arginina (L-NA, 10^{-4} M), en segmentos preincubados con indometacina 10^{-5} M y en segmentos preincubados con L-NA (10^{-4} M) e indometacina 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.

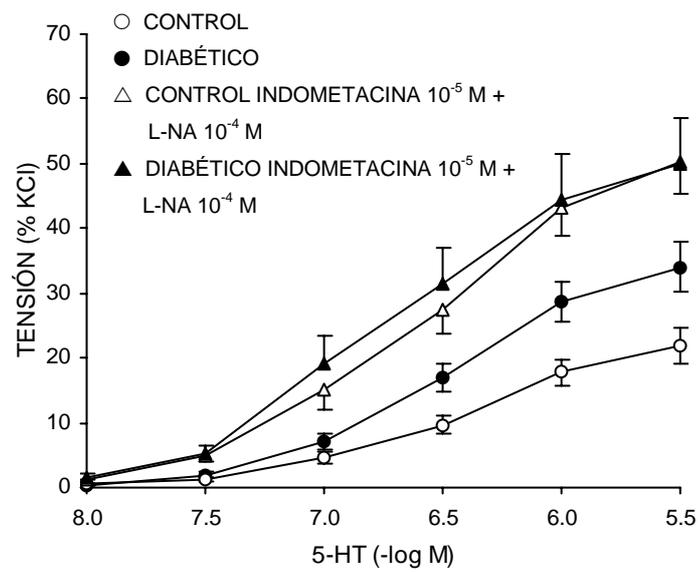


Figura 27: Curva concentración-respuesta de 5-hidroxitriptamina en segmentos de arteria renal procedentes de conejo control y conejo diabético, en situación control y en segmentos preincubados con *N*^G-nitro-L-arginina (L-NA, 10⁻⁴ M) e indometacina 10⁻⁵M. Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima alcanzada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media ± EEM.

TABLA 4: Valores de CE_{50} y efecto máximo (E_{max}) para las curvas concentración-respuesta a la 5-HT en arteria renal de conejo

Conejo control	EC₅₀ (M)	E_{max} (%)	n
Control	3.4 (3.1-3.7) x 10 ⁻⁷	22 ± 3	23
Legrado	2.7 (2.3-3.1) x 10 ⁻⁷	22 ± 4	21
L-NA 10 ⁻⁴ M	2.6 (2.2-2.9) x 10 ⁻⁷	69 ± 7 ^{a,b}	12
Legrado + L-NA 10 ⁻⁴ M	1.7 (1.4-2.2) x 10 ⁻⁷ ^a	39 ± 11 ^{a,b,c}	6
Indometacina 10 ⁻⁵ M	4.1 (3.6-4.6) x 10 ⁻⁷	9 ± 2 ^{a,b,c}	15
L-NA 10 ⁻⁴ M + Indometacina 10 ⁻⁵ M	2.6 (2.2-2.9) x 10 ⁻⁷	50 ± 5 ^{a,b,c,d}	10
Conejo diabético	EC₅₀ (M)	E_{max} (%)	n
Control	3.2 (2.9-3.5) x 10 ⁻⁷	34 ± 4 ^e	20
Legrado	1.9 (1.7-2.2) x 10 ⁻⁷ ^a	56 ± 6 ^{a,e}	19
L-NA 10 ⁻⁴ M	2.8 (2.5-3.1) x 10 ⁻⁷	48 ± 4 ^{a,e}	15
Legrado + L-NA 10 ⁻⁴ M	2.7 (2.5-2.9) x 10 ⁻⁷	52 ± 9 ^a	12
Indometacina 10 ⁻⁵ M	2.6 (2.1-3.2) x 10 ⁻⁷ ^e	52 ± 4 ^{a,e}	7
L-NA 10 ⁻⁴ M + Indometacina 10 ⁻⁵ M	1.9 (1.5-2.6) x 10 ⁻⁷	50 ± 7	9

Los valores de E_{max} se expresan como porcentaje de la contracción máxima producida tras la despolarización previa de los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media ± EEM.

Los valores de CE_{50} se expresan como media con su intervalo de confianza al 95%.

n: número de segmentos arteriales.

^a Significativamente diferente del correspondiente valor control, $P < 0.05$

^b Significativamente diferente del correspondiente valor legrado, $P < 0.05$

^c Significativamente diferente del correspondiente valor "L-NA 10⁻⁴ M", $P < 0.05$

^d Significativamente diferente del correspondiente valor "indometacina 10⁻⁵ M", $P < 0.05$

^e Significativamente diferente del correspondiente valor en conejos control, $P < 0.05$

3. INFLUENCIA DE LA DIABETES SOBRE LA RESPUESTA DE LA ARTERIA RENAL 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^{-11} - 3×10^{-8} M) produjo contracción, de magnitud dependiente de la concentración, de los segmentos de arteria renal de conejo, en ambos grupos de animales (Figura 28).

En los segmentos arteriales procedentes del grupo de animales control, la contracción máxima alcanzada fue de 8151 ± 521 mg ($99 \pm 5\%$ de la despolarización previa producida por KCl 50 mM), siendo el valor de la CE_{50} de $1.1 (0.9-1.3) \times 10^{-9}$ M. En los segmentos arteriales procedentes de conejos diabéticos, la ET-1 produjo una respuesta contráctil con un E_{max} de 8085 ± 478 ($93 \pm 5\%$) y una CE_{50} de $1.9 (1.6-2.2) \times 10^{-9}$ M.

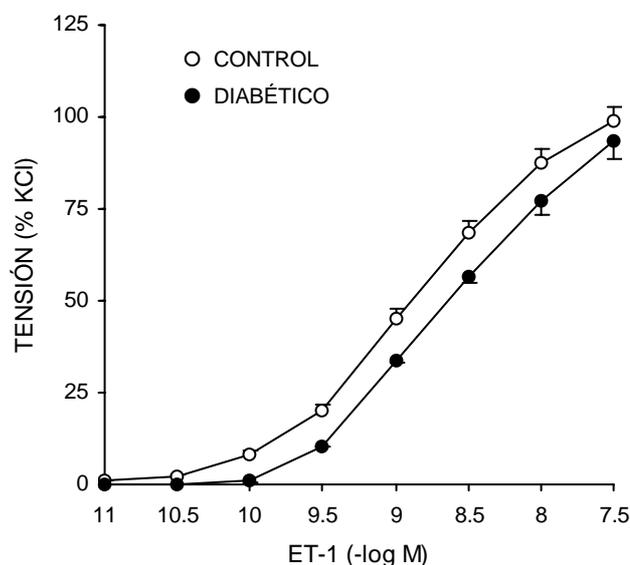


Figura 28: Curva concentración-respuesta de endotelina-1 en segmentos de arteria renal procedentes de conejo control y conejo diabético. Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima alcanzada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media \pm EEM.

No hubo diferencias significativas en el valor del E_{max} entre el grupo control y el diabético, sin embargo, la CE_{50} resultó significativamente mayor en los segmentos arteriales procedentes del grupo diabético, es decir, se observó una menor potencia en la respuesta contráctil inducida por la ET-1 (Figura 28, Tabla 5).

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

La ET-1 (10^{-11} - 3×10^{-8} M) produjo igualmente una respuesta contráctil, de magnitud dependiente de la concentración, en los segmentos arteriales sin endotelio procedentes de los dos grupos experimentales de animales (Figura 29).

En las arterias procedentes de conejos control, la eliminación del endotelio produjo un aumento significativo del E_{max} así como una disminución significativa de la CE_{50} (Figura 29, Tabla 5).

En los segmentos arteriales procedentes de conejos diabéticos la eliminación del endotelio sólo modificó la CE_{50} , provocando un aumento de la potencia de la respuesta contráctil de la arteria renal a la ET-1, sin producir modificaciones en el E_{max} .

Al comparar las curvas concentración-respuesta de ET-1 obtenidas en segmentos sin endotelio de conejos control y conejos diabéticos se observaron diferencias estadísticamente significativas en el E_{max} y en la CE_{50} : la diabetes produjo una disminución de la contracción máxima alcanzada así como una menor potencia en la respuesta contráctil de la arteria renal a la ET-1 (Figura 29, Tabla 5).

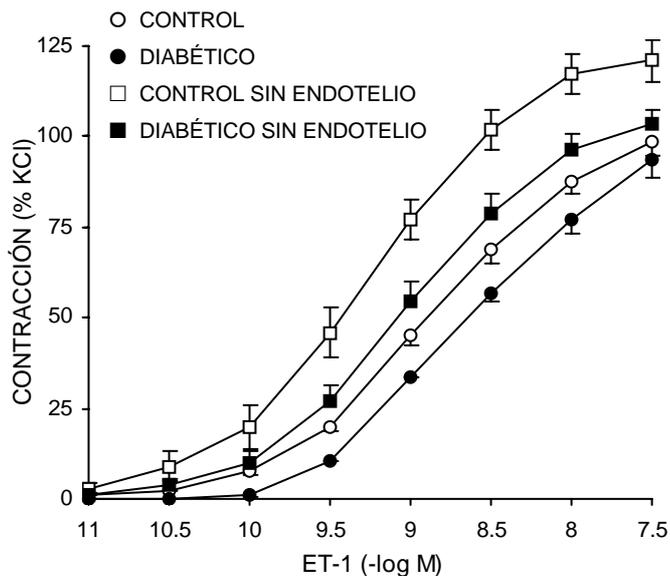


Figura 29: Curva concentración-respuesta de endotelina-1 en segmentos de arteria renal procedentes de conejo control y conejo diabético, en situación control y en segmentos sin endotelio. Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima alcanzada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media \pm EEM.

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

La incubación con el inhibidor de la síntesis de NO, L-NA (10^{-4} M), produjo un desplazamiento hacia la izquierda de la curva concentración-respuesta de ET-1 de la arteria renal, tanto en conejos control como en diabéticos (Figura 30, Tabla 5). No hubo diferencias significativas en el valor del E_{max} al comparar esta situación experimental con la situación control en ninguno de los dos grupos de animales.

En el grupo de animales diabéticos, la CE_{50} obtenida para la curva concentración-respuesta de ET-1 tras incubación con L-NA, fue mayor que la obtenida en los segmentos procedentes de animales control, es decir, la potencia de la contracción de la arteria renal de conejos diabéticos fue significativamente menor (Figura 30, Tabla 5).

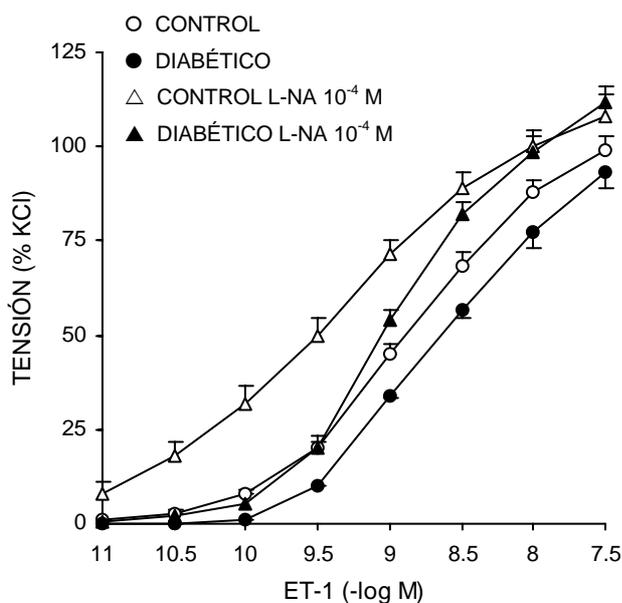


Figura 30: Curva concentración-respuesta de endotelina-1 en segmentos de arteria renal procedentes de conejo control y conejo diabético, en situación control y tras la incubación con *N*^G-nitro-L-arginina (L-NA 10⁻⁴ M). Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima alcanzada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media ± EEM.

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

En arterias procedentes de conejos control, la incubación con indometacina 10⁻⁵ M produjo un aumento significativo de la CE₅₀ de la curva concentración-respuesta a la ET-1 (menor potencia), sin modificar significativamente el valor del E_{max} (Figura 31, Tabla 5).

En arterias procedentes de conejos diabéticos, la incubación con indometacina (10⁻⁵ M) produjo un aumento del E_{max} y una disminución de la CE₅₀ con respecto a la situación control (Figura 31, Tabla 5).

Comparando 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 indometacina, observamos una

disminución significativa de la CE_{50} en arterias procedentes de animales diabéticos así como un E_{max} significativamente mayor (Figura 31, Tabla 5).

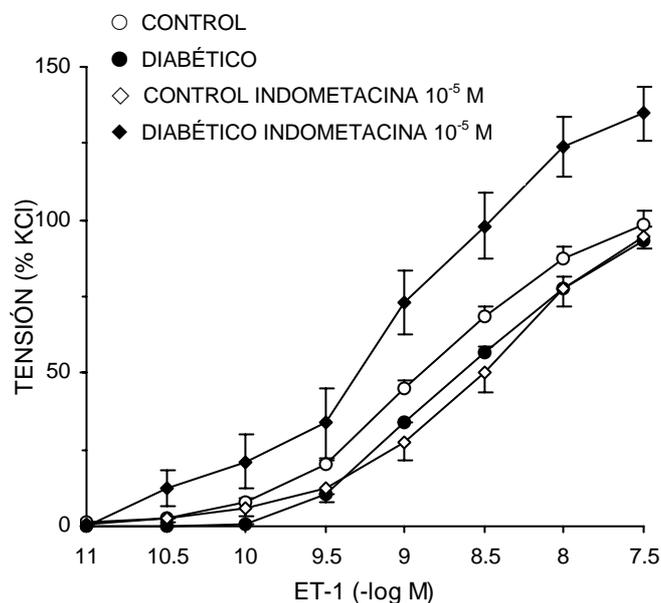


Figura 31: Curva concentración-respuesta de endotelina-1 en segmentos de arteria renal procedentes de conejo control y conejo diabético, en situación control y tras la incubación con indometacina 10^{-5} M. Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima alcanzada al despolarizar previamente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

3.5. Efecto de la ET-1 tras la incubación con indometacina de los segmentos arteriales sin endotelio

En el grupo de animales control, la incubación de los segmentos desprovistos de endotelio con el inhibidor de la ciclooxigenasa, indometacina (10^{-5} M) provocó un aumento de la respuesta contráctil de la arteria renal a la ET-1 que se vio reflejado por un aumento significativo del E_{max} (Tabla 5). La potencia contráctil de la ET-1 en segmentos arteriales sin endotelio e incubados con el inhibidor, fue significativamente menor que la obtenida en

las curvas realizadas en arterias sin endotelio pero en ausencia del inhibidor, sin cambios en el E_{max} (Figura 32, Tabla 5).

La incubación con indometacina (10^{-5} M) de los segmentos arteriales sin endotelio de conejos diabéticos produjo una disminución en la potencia de la respuesta contráctil inducida por la ET-1 sin observarse cambios en el E_{max} (Tabla 5). Comparando con las curvas concentración-respuesta obtenidas con segmentos sin endotelio pero sin indometacina la potencia contráctil de la ET-1 fue significativamente menor (Figura 32, Tabla 5).

Al comparar las curvas concentración-respuesta de ET-1 en segmentos arteriales sin endotelio y preincubados con indometacina de conejos control y conejos diabéticos encontramos diferencias significativas tanto en el E_{max} como en la CE_{50} , evidenciándose una menor respuesta contráctil en la diabetes (Figura 32, Tabla 5).

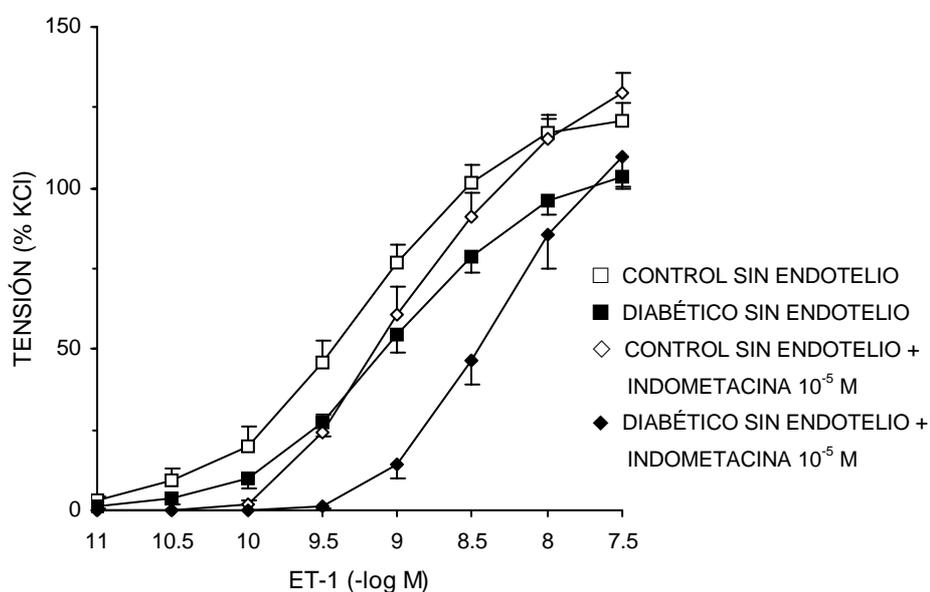


Figura 32: Curva concentración-respuesta de endotelina-1 en segmentos de arteria renal sin endotelio procedentes de conejo control y conejo diabético, en situación control y tras la incubación con indometacina 10^{-5} M. Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima alcanzada al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media \pm EEM.

TABLA 5: Valores de CE_{50} y efecto máximo (E_{max}) para las curvas concentración respuesta de la ET-1 en arteria renal de conejo

Conejo control	EC₅₀ (M)	E_{max} (%)	n
Control	1.1 (0.9-1.3) x 10 ⁻⁹	99 ± 5	22
Legrado	0.5 (0.4-0.6) x 10 ^{-9 a}	121 ± 6 ^a	16
L-NA 10 ⁻⁴ M	0.3 (0.2-0.4) x 10 ^{-9 a}	108 ± 6	13
Indometacina 10 ⁻⁵ M	2.3 (1.8-3.1) x 10 ^{-9 a}	95 ± 4	20
Legrado + Indometacina 10 ⁻⁵ M	1.2 (1.0-1.5) x 10 ^{-9 b}	130 ± 6 ^a	17
Conejo diabético	EC₅₀ (M)	E_{max} (%)	n
Control	1.9 (1.6-2.2) x 10 ^{-9 c}	93 ± 5	23
Legrado	0.9 (0.7-1.1) x 10 ^{-9 a,c}	103 ± 4 ^c	14
L-NA 10 ⁻⁴ M	1.0 (0.9-1.1) x 10 ^{-9 a,c}	112 ± 4	13
Indometacina 10 ⁻⁵ M	0.9 (0.6-1.2) x 10 ^{-9 a,c}	135 ± 9 ^{a,c}	13
Legrado + Indometacina 10 ⁻⁵ M	3.6 (3.2-4.1) x 10 ^{-9 a,b,c}	107 ± 10 ^c	9

Los valores de E_{max} se expresan como porcentaje de la contracción máxima producida tras la despolarización previa de los segmentos arteriales con KCl 50 mM y representan la media ± EEM.

Los valores de CE_{50} se expresan como media con su intervalo de confianza al 95%.

n: número de segmentos arteriales.

^a Significativamente diferente del correspondiente valor control, $P < 0.05$

^b Significativamente diferente del correspondiente valor legrado, $P < 0.05$

^c Significativamente diferente del correspondiente valor del grupo de conejos control, $P < 0.05$

DISCUSIÓN

1. MODELO EXPERIMENTAL

En el presente trabajo se ha utilizado un modelo de diabetes química inducida experimentalmente en el conejo mediante la inyección intravenosa de aloxano. Esta sustancia provoca en el animal un cuadro clínico similar a la diabetes, con hiperglucemia, hipercolesterolemia, glucosuria y altos niveles de hemoglobina glucosilada en eritrocitos (Agrawal *et al.*, 1987; Chan *et al.*, 2000).

El aloxano es capaz de inducir la diabetes porque daña las células β -pancreáticas mediante un mecanismo oxidativo, provocando una disfunción mitocondrial en estas células, y como consecuencia de la cual se produce un aumento de los niveles de Ca^{2+} libre intracelular (Boquist, 1984, 1989) que conducen a la muerte celular (Farber, 1981; Smuckler y James, 1984; Trump y Berezesk, 1985). Además, también se ha demostrado que el aloxano interacciona con el ADN produciendo un importante daño en las células β -pancreáticas (Sakurai y Ogiso, 1995).

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 desde las células beta, pudiendo aparecer alteraciones graves, e incluso la muerte del animal. Este hecho nos obligó a controlar estrechamente las cifras de glucemia del animal durante este periodo, añadiendo glucosa (10%) en el agua de bebida y administrando eventualmente soluciones de glucosa (5-10%) por vía parenteral. Una vez superado este periodo, la glucemia adquiere valores elevados, los cuales se mantienen durante las seis semanas que el animal permanece estabulado

hasta el momento de ser sacrificado. Durante esta fase, además de la hiperglucemia, el animal experimenta polidipsia, poliuria, polifagia y un incremento ponderal menor que los animales del grupo control, lo cual pone en evidencia el éxito de la inducción de la diabetes.

2. INFLUENCIA DE LA DIABETES SOBRE LA RESPUESTA DE LA ARTERIA RENAL A LA ACh Y LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN DICHA RESPUESTA

Nuestros resultados muestran que la diabetes experimental potencia la relajación endotelio-dependiente inducida por la ACh en la arteria renal de conejo.

Es un hecho generalmente aceptado en la literatura que la relajación dependiente de endotelio está dañada en diferentes lechos vasculares de diversas especies animales (Sobrevia y Mann, 1997; Chan *et al.*, 2000). Así, se ha descrito una disminución de la respuesta relajante a la ACh tras la diabetes, por ejemplo, en aorta (Félétou *et al.*, 1994), arteria cerebral media (Pellegrino *et al.*, 1994) y mesentérica de rata (Fukao *et al.*, 1997) y en arteria carótida de conejo (Miranda *et al.*, 2000a). Sin embargo, otros estudios describen un aumento de la relajación producida por la ACh (Altan *et al.*, 1989; Karasu y Altan, 1993; Omer *et al.*, 1999) o respuestas inalteradas frente a este fármaco tras la diabetes (Wakabayashi *et al.*, 1987; Mulhern y Docherty, 1989). Esta heterogeneidad de resultados se observa también en el caso de la relajación mediada por endotelio en respuesta a la histamina en animales diabéticos, donde se han descrito tanto aumentos de la relajación (White y

Carrier, 1986; Karasu y Altan, 1993), como disminuciones (Oyama *et al.*, 1986; Orié *et al.*, 1993) y no modificaciones (Fortes *et al.*, 1983).

La gran variedad en los resultados podría ser debida a la existencia de diferencias regionales y entre especies en la influencia de la diabetes sobre las respuestas vasculares a la Ach. Por otra parte, también parece razonable pensar que parte de la disparidad en los resultados obtenidos por los distintos autores podría atribuirse a diferencias metodológicas. Es importante destacar que no en todos los modelos experimentales la duración de la diabetes es la misma y que las alteraciones vasculares producidas por la diabetes parecen estar relacionadas con el tiempo transcurrido desde el inicio de la enfermedad (Pieper, 1999).

Aunque, como se ha descrito anteriormente, la mayor parte de los trabajos demuestran una disminución de las respuestas relajantes dependientes de endotelio en la diabetes, en el lecho vascular renal varios trabajos realizados en diferentes especies animales coinciden con nuestros resultados. Así, se ha observado que la diabetes produce un aumento de la respuesta relajante a la Ach en arteria renal de perros diabéticos (Gebremedhin *et al.*, 1989) y en riñones perfundidos de ratas diabéticas (Bhardwaj y Moore, 1988). Por tanto, se podría plantear la hipótesis de que el lecho vascular renal responde de manera diferente a la mayor parte de los lechos vasculares en la diabetes, con un aumento de la relajación endotelio-dependiente a la Ach. Este aumento de la relajación puede contribuir a la hiperperfusión e hiperfiltración renal observadas en la diabetes (Tolins *et al.*, 1993; Sugimoto *et al.*, 1998).

Desde que Furchgott y Zawadzki, en 1980, demostraron que la relajación inducida por la Ach es dependiente del endotelio, muchos trabajos han corroborado este hecho. Como cabía esperar, nuestros resultados también lo confirman. La eliminación mecánica del endotelio casi abolió la relajación inducida por Ach tanto en las arterias procedentes de conejos control como en las de conejos diabéticos, indicando la dependencia endotelial de la respuesta arterial.

Se ha demostrado que la vasodilatación inducida por la Ach se produce predominantemente a través de la estimulación de la NOS y la consiguiente formación de NO, el cual provoca la relajación del músculo liso vascular mediante la activación de la guanilato ciclasa soluble y el aumento en los niveles intracelulares de GMPc (Moncada et al., 1991). En el presente trabajo, la relajación inducida por Ach fue parcialmente inhibida cuando los segmentos arteriales se incubaron con L-NA, inhibidor de la NOS; esto sucedió tanto en situación control como en situación de diabetes, lo que demuestra que la relajación producida por la Ach es debida, al menos parcialmente, a la liberación de NO. Sin embargo, el hecho de que concentraciones elevadas de L-NA inhibieron la respuesta relajante a la Ach menos que la destrucción mecánica del endotelio, nos sugiere la participación de otros factores endoteliales que median esta respuesta vasodilatadora.

En algunos lechos vasculares, un componente de la relajación producida por la Ach es la PGI₂, prostaglandina con acción vasodilatadora derivada del ácido araquidónico por la vía de la ciclooxigenasa (Schilling et al., 1991). Para corroborar este hecho, en nuestro trabajo incubamos los

segmentos arteriales con indometacina, un inhibidor de la ciclooxigenasa (Moncada y Vane, 1979). Se produjo una inhibición parcial de la relajación producida por la Ach en ambos grupos de animales, pero al igual que con la L-NA, la inhibición de la respuesta relajante a la Ach producida por la indometacina fue menor que la producida por el legrado arterial. Estos resultados demuestran la participación de derivados del ácido araquidónico, en la respuesta relajante de la arteria renal de conejo a la Ach.

Cuando estudiamos el efecto aditivo de L-NA e indometacina observamos una inhibición parcial de la respuesta relajante a la Ach, que también resultó menor que la producida por la destrucción mecánica del endotelio en el caso de animales control. Estos resultados nos sugieren la existencia de un tercer factor endotelial que participa en la relajación producida por la Ach en este lecho vascular.

No todas las relajaciones dependientes del endotelio pueden ser atribuidas al NO o a la PGI₂ (Félétou y Vanhoutte, 1996). Uno de los posibles mediadores que junto a los anteriores podría participar en las respuestas relajantes dependientes del endotelio es el EDHF (Vanhoutte, 1989). Aunque la naturaleza exacta del EDHF no ha sido todavía bien establecida, se ha observado que, en ciertas situaciones, el endotelio libera un EDHF que provoca la relajación de las células del músculo liso vascular mediante la apertura de canales de potasio y la consiguiente hiperpolarización de la membrana celular (Van de Voorde *et al.*, 1992). Algunos autores sugieren que la Ach puede provocar la síntesis de un factor hiperpolarizante en algunos lechos vasculares (Garland y McPherson, 1992), ya que se ha demostrado

que es capaz de inducir hiperpolarización, dependiente del endotelio, del músculo liso vascular (Félétou y Vanhoutte, 1988).

Como se ha comentado anteriormente, la incubación de los segmentos arteriales con L-NA, indometacina e indometacina más L-NA, produjo una inhibición parcial de la relajación inducida por Ach. Sin embargo, la relajación fue casi abolida cuando las arterias renales fueron despolarizadas con KCl 30 mM e incubadas con L-NA más indometacina en ambos grupos de animales. Estos resultados sugieren que en la arteria renal de conejo, tanto en controles como en diabéticos, la relajación inducida por Ach está mediada por, al menos, tres factores endoteliales: el NO, algún prostanóide derivado de la ciclooxigenasa, probablemente PGI₂, y el EDHF. Estos hallazgos están en la misma línea que otros trabajos llevados a cabo en el lecho vascular renal de diferentes especies (Hayashi *et al.*, 1994; Kagota *et al.*, 2000).

Por otra parte, nuestros resultados muestran que la inhibición de la respuesta a la Ach inducida por L-NA fue mayor en la arteria renal de conejo diabético que en conejo control, lo que sugiere que en la arteria renal la participación de NO en la relajación inducida por Ach es mayor en la diabetes que en situación control. Esto podría explicar el aumento de la potencia relajante de la Ach en la diabetes. Resultados similares han sido descritos en arteria renal de ratas diabéticas (Dai *et al.*, 1993).

En la literatura se ha descrito aumento de la actividad endógena del NO en riñones de ratas diabéticas (Tolins *et al.*, 1993) que podría deberse tanto a un aumento de la síntesis de NO (Sugimoto *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 1999) como a una mayor sensibilidad del músculo liso vascular al NO (Yamada *et al.*, 1995). En nuestro estudio, la segunda hipótesis puede ser descartada ya que la relajación inducida por nitroprusiato sódico, un dador de NO, fue similar en arteria renal de conejo diabético y de conejo control, lo que indica que la sensibilidad del músculo liso al NO no está alterada en la arteria renal de conejo diabético. Estos resultados confirman los obtenidos por otros autores en arteria renal (García *et al.*, 1999) y en otros lechos vasculares (Avogaro *et al.*, 1997; Utkan *et al.*, 1998; Sheykhzade *et al.*, 2000). Sin embargo, también se ha publicado que existen respuestas vasculares atenuadas a nitrovasodilatadores en pacientes diabéticos (Watts *et al.*, 1996).

El aumento de la producción de NO en la diabetes ha sido descrito en diferentes trabajos. En células endoteliales de aorta humana, la exposición prolongada a concentraciones elevadas de glucosa aumentó la expresión del gen eNOS y la liberación de NO, indicando que tanto la producción basal de NO como la estimulada están aumentadas en células tratadas con altas concentraciones de glucosa (Cosentino y Lücher, 1998). En ratas diabéticas se ha observado un aumento de la síntesis de NO, producido por la enzima eNOS, en arteriola aferente y en el glomérulo (Sugimoto *et al.*, 1998). También ha sido descrito en la diabetes, un aumento de la expresión de las isoformas endotelial y neuronal de la NOS en la médula externa (Shin *et al.*, 2000), y aumento de la expresión de las tres isoformas de la NOS, inducible,

neuronal y endotelial, en el cortex renal (Choi *et al.*, 1999). Otro trabajo también muestra un aumento de la eNOS en el endotelio de arterias preglomerulares y en el glomérulo de ratas diabéticas, pero no evidencia inducción de la iNOS (Veelken *et al.*, 2000). Por otra parte, otros trabajos muestran que en la diabetes se produce un aumento de los niveles de metabolitos estables del NO, tanto en plasma como en orina, lo que lleva a sugerir que en la diabetes se produce un aumento de la producción de NO (Choi *et al.*, 1999; Shin *et al.*, 2000). Todo esto sugiere que el aumento de la actividad del NO podría ser responsable de la excesiva vasodilatación renal observada en la diabetes, lo que conduciría al aumento de la permeabilidad y filtración glomerular y en última instancia a la nefropatía diabética (Sugimoto *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 1999; Veelken *et al.*, 2000).

Nuestros resultados muestran que en presencia de indometacina, la mayor potencia relajante de la Ach observada en la diabetes desaparece, lo que sugiere que en la diabetes se produce un aumento en la participación de la PGI₂ en la respuesta relajante inducida por la Ach. Esta mayor participación de la PGI₂ podría contribuir al aumento de la potencia relajante de la Ach observada en la diabetes. Esto es consistente con el aumento de la mediación por prostaglandinas endógenas del incremento del flujo sanguíneo gástrico y mesentérico observado en ratas diabéticas (Goldin *et al.*, 1996) y con el aumento de la liberación de un prostanóide vasodilatador en arterias coronarias durante la diabetes (Koltai *et al.*, 1997). También se ha publicado que la producción renal de prostaciclina está aumentada en ratas diabéticas (Okumura *et al.*, 1999).

Por otro lado, los experimentos realizados usando los dos inhibidores conjuntamente, L-NA e indometacina, mostraron que la inhibición de la relajación inducida por Ach resultó mayor en arteria renal de conejo diabético que en arteria renal de conejo control. Esto sugiere una mayor participación de NO y PGI₂ en la diabetes, y podría contribuir a la mayor potencia relajante de la Ach observada en la arteria renal de conejos diabéticos. Nuestros resultados también indican que la participación del EDHF en la relajación de la arteria renal a Ach es menor en conejo diabético que en conejo control. Esto concuerda con otros estudios que demuestran alteraciones en la vasodilatación mediada por EDHF en ratas diabéticas (Fukao *et al.*, 1997; Makino *et al.*, 2000). Esta disminución podría constituir un mecanismo compensatorio para minimizar los efectos del aumento de la producción de NO y PGI₂.

En resumen, nuestros resultados referentes a la Ach muestran que la diabetes potencia la respuesta relajante, mediada por endotelio, de la arteria renal de conejo a la Ach. En los animales control la respuesta relajante a la Ach está mediada por NO, por un prostanoide derivado de la ciclooxigenasa, probablemente prostaciclina, y por el EDHF. La diabetes modifica la participación de los factores que modulan dicha respuesta, aumentando la actividad moduladora de NO y PGI₂, lo cual podría explicar la mayor potencia relajante de la Ach en la diabetes.

3. INFLUENCIA DE LA DIABETES SOBRE LA RESPUESTA DE LA ARTERIA RENAL A LA 5-HT Y LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN DICHA RESPUESTA

La 5-HT produjo contracción de la arteria renal de conejo, tanto en el grupo de animales control como en el de diabéticos, siendo esta contracción significativamente mayor en las arterias procedentes del grupo diabético. Estos resultados se encuentran en la misma línea que los obtenidos por otros autores en diferentes lechos vasculares. Así, la diabetes produce un aumento de la actividad vasopresora de la 5-HT en la circulación pulmonar de conejo (Abebe *et al.*, 1990; Chang y Stevens, 1992; Félétou *et al.*, 1994; El Kashef, 1996) y un incremento de la sensibilidad de la arteria basilar de rata a la 5-HT (Van Buren *et al.*, 1998). Además, en arteria carótida de conejo, usando el mismo modelo experimental, la diabetes potencia la acción contráctil de la 5-HT (Miranda *et al.*, 2000b). En contraste, otros estudios describen disminuciones de la respuesta contráctil a la 5-HT en arteria aorta de ratas diabéticas (James *et al.*, 1994; James y Hodgson, 1997).

En el presente trabajo también hemos estudiado el posible papel modulador del endotelio en la respuesta contráctil de la arteria renal a la 5-HT. En arterias de conejos control, la eliminación mecánica del endotelio no modificó significativamente la curva concentración-respuesta a la 5-HT. Este resultado está en concordancia con estudios que muestran que la respuesta contráctil a la 5-HT en arteria ciliar anterior bovina (Buckley *et al.*, 1998) y arteria deferencial humana (Medina *et al.*, 1996) no se vio afectada por la eliminación del endotelio. Sin embargo, se ha observado que el endotelio

contrarresta parcialmente la respuesta contráctil a la 5-HT en la arteria cerebral media de cabra (Miranda *et al.*, 1993), vena safena de conejo (Valentín *et al.*, 1996), arteria uterina humana (Karlsson *et al.*, 1998) y arteria carótida de conejo (Miranda *et al.*, 2000b). El resultado de este trabajo podría sugerir que el endotelio no modula la respuesta contráctil de la arteria renal a la 5-HT o, más probablemente, que existe un equilibrio entre los vasodilatadores y vasoconstrictores liberados por el endotelio.

Por otro lado, en segmentos arteriales de animales diabéticos, la eliminación del endotelio indujo un incremento de la contracción producida por 5-HT. Este resultado muestra que el endotelio inhibe la contracción de las arterias renales inducida por la 5-HT en conejos diabéticos. Resultados similares se han encontrado en arteria carótida de conejo en donde la diabetes incrementó la actividad inhibidora del endotelio sobre la contracción inducida por 5-HT (Miranda *et al.*, 2000b). Otros autores también han descrito que la diabetes incrementa las relajaciones mediadas por el endotelio inducidas por histamina (White y Carrier, 1986; Karasu y Altan, 1993) y acetilcolina (Bhardwaj y Moore, 1988; Altan *et al.*, 1989; Karasu y Altan, 1993; Omer *et al.*, 1999).

El hecho de que, en ausencia de mecanismos de regulación endotelial, la contracción inducida por 5-HT en arterias de conejo diabético fuera mayor que la obtenida en arterias de conejo control, sugiere la existencia de una hiperreactividad de las células del músculo liso de la arteria renal a esta amina en la diabetes. Esta situación podría estar parcialmente contrarrestada por el aumento de la modulación inhibidora del endotelio.

Con el fin de estudiar si la modulación endotelial se produce, al menos en parte, a través de la liberación de NO se realizaron experimentos en los que se inhibió su síntesis antes de realizar las curvas concentración-respuesta para la 5-HT. La incubación de arterias renales, tanto de conejos control como diabéticos, con el inhibidor de la NOS constitutiva, L-NA, incrementó significativamente la respuesta contráctil de los segmentos arteriales a la 5-HT. Esto indica que en presencia de 5-HT, el endotelio libera NO que parcialmente contrarresta la respuesta contráctil a esta amina. Esto está en la misma línea que los datos obtenidos en arteria cerebral (Miranda *et al.*, 1993), pulmonar (Shi *et al.*, 1998) y carótida (Miranda *et al.*, 2000b).

La contracción máxima inducida por 5-HT en presencia de L-NA fue significativamente menor en arterias de conejos diabéticos que en las procedentes de conejos control, lo que sugiere un menor papel modulador del NO en la respuesta de la arteria renal a la 5-HT en la diabetes. En apartados anteriores hemos descrito que la respuesta arterial inducida por el nitroprusiato sódico, un dador de NO, fue similar en arteria renal de conejo control y de conejo diabético, indicando que la sensibilidad de las células del músculo liso de arterias renales al NO no está alterada en nuestros conejos diabéticos. Por lo tanto, la menor modulación realizada por el NO en la diabetes probablemente se produzca por una menor producción de NO en la arteria renal en respuesta a la 5-HT en la diabetes.

En las arterias de conejos control, la contracción inducida por 5-HT en arterias legradas preincubadas con L-NA fue significativamente mayor que la obtenida en arterias legradas en ausencia del inhibidor. Esto sugiere la

existencia de una fuente extraendotelial (neuronal) de NO que se liberaría conjuntamente con el NO endotelial en respuesta a la 5-HT, de forma similar a la descrita en la respuesta de la arteria cerebral media de cabra a la 5-HT (Miranda *et al.*, 1996) y a la ET-1 (Alabadí *et al.*, 1997). Se ha descrito en arterias carótidas y cerebrales la existencia de nervios vasodilatadores perivasculares que sintetizan y liberan NO a partir de la nNOS (Tomimoto *et al.*, 1994; Ignacio *et al.*, 1997). El NO derivado de la nNOS juega un papel en el control de la hemodinámica renal y sistémica en la rata (Komers *et al.*, 2000a,b). Por tanto, esta fuente neuronal perivascular de NO podría ser la responsable de los mecanismos de modulación de la respuesta de la arteria renal de conejo a la 5-HT independientes del endotelio. En el caso de arterias procedentes de conejos diabéticos no se encontraron diferencias significativas en la contracción inducida por 5-HT entre arterias legradas y arterias legradas y preincubadas con L-NA, lo cual sugiere que se produce una disminución de la aportación de NO extraendotelial en la diabetes. Esta disminución podría ser responsable, al menos parcialmente, de la hiperreactividad de la arteria renal a la 5-HT en la diabetes.

La alteración de la vasodilatación renal mediada por NO es responsable del incremento de la vasoconstricción renal producida por la adenosina en ratas diabéticas (Pflueger *et al.*, 1999). Además, la diabetes se ha asociado con una reducción de la actividad de la nNOS en los vasos de la retina (Roufail *et al.*, 1998), músculo esquelético (Perreault *et al.*, 2000) y arterias mesentéricas (Ferrer *et al.*, 2000) de ratas diabéticas. Por el contrario, también se ha sugerido que un incremento de la actividad de la

nNOS podría desempeñar un papel en la patogénesis de los cambios hemodinámicos renales en la rata diabética (Komers *et al.*, 2000a,b).

En conejos control, la contracción máxima inducida por 5-HT en arterias no legradas tratadas con L-NA, fue significativamente mayor que la obtenida en arterias legradas preincubadas con el inhibidor. Este resultado sugiere que, en animales control, el endotelio modula la respuesta arterial renal a la 5-HT a través de la liberación de NO y un vasoconstrictor. De esta forma, cuando la síntesis de NO ha sido inhibida pero no la del vasoconstrictor (arterias no legradas incubadas con L-NA), la tensión máxima alcanzada fue mayor que la contracción obtenida en arterias legradas tratadas con L-NA, en las que el NO y el vasoconstrictor han sido eliminados. Además, la indometacina disminuyó significativamente la contracción inducida por 5-HT, lo cual sugiere la naturaleza prostanoide del vasoconstrictor endotelial (TxA₂). Un resultado similar se ha descrito en arteria umbilical humana (De Moraes *et al.*, 1997; Mathias *et al.*, 1997), vena pulmonar de cobaya (Shi *et al.*, 1998) y arteria carótida de conejo (Miranda *et al.*, 2000b).

En contraste con los resultados obtenidos en arterias de conejo control, en arterias renales legradas de conejo diabético incubadas con L-NA, la contracción inducida por 5-HT no fue significativamente diferente de la obtenida con cada uno de los dos tratamientos (eliminación del endotelio e incubación con L-NA) por separado. Esto sugiere que la diabetes altera la participación del prostanoide vasoconstrictor endotelial.

Por último, la incubación de segmentos arteriales de conejos diabéticos con indometacina incrementó la respuesta contráctil a la 5-HT, lo cual sugiere

que los derivados del ácido araquidónico endotelial por la vía de la ciclooxigenasa, en arterias de animales diabéticos, tienen una influencia vasodilatadora (probablemente PGI₂). Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por otros autores que describen una disminución de la actividad de prostanoide vasoconstrictores (Makino y Kamata 1998; Miranda *et al.*, 2000a,b) y un aumento en la actividad de prostanoide vasodilatadores (Okumura *et al.*, 2000) en la diabetes. Podríamos especular que, en las condiciones experimentales del presente estudio, la ausencia del prostanoide vasoconstrictor sería la expresión de un mecanismo compensador dirigido a reducir las consecuencias negativas de la hiperreactividad de la arteria renal a la 5-HT y de la alteración de la actividad reguladora del NO.

En resumen, la diabetes aumenta la contractilidad de la arteria renal a la 5-HT. En los animales control la respuesta contráctil a la 5-HT está regulada por la liberación de NO endotelial y extraendotelial y por un prostanoide vasoconstrictor. La diabetes modifica los factores que modulan esta respuesta, alterando la liberación de NO extraendotelial y la del prostanoide vasoconstrictor.

4. INFLUENCIA DE LA DIABETES SOBRE LA RESPUESTA DE LA ARTERIA RENAL A LA ET-1 Y LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN DICHA RESPUESTA

En el presente trabajo, la ET-1 produjo una contracción de la arteria renal de conejo de mayor magnitud y mucho más potente que la producida por la 5-HT en ambos grupos de animales. Esta elevada potencia vasoconstrictora de la ET-1 ya ha sido descrita con anterioridad en diferentes trabajos y lechos vasculares (Randall *et al.*, 1989; Sakata *et al.*, 1989; Topouzis *et al.*, 1991; Alabadí *et al.*, 1997).

Nuestros resultados muestran que la diabetes disminuye la potencia vasoconstrictora de la ET-1 en la arteria renal de conejo. Se han encontrado respuestas disminuidas a la ET-1 en aorta (Fulton *et al.*, 1991; Utkan *et al.*, 1998), carótida (Guillon *et al.*, 1998) y en el lecho mesentérico arterial de ratas diabéticas (Makino y Kamata, 1998b) así como en pequeños vasos de resistencia humanos (Rizzoni *et al.*, 2001). En pacientes diabéticos se han observado respuestas vasoconstrictoras disminuidas tras la administración de una infusión de ET-1 (Cardillo *et al.*, 2002); sin embargo, en estos mismos pacientes, la actividad de la ET-1 endógena en la regulación del tono vascular de los vasos de resistencia estuvo aumentada (Cardillo *et al.*, 2002). En otros trabajos realizados en ratas se ha observado un aumento en la respuesta a la ET-1 en aorta (Hopfner *et al.*, 1999) y en el lecho renal y mesentérico (Kiff *et al.*, 1991) mientras que no se han encontrado diferencias en la arteria basilar (Mayhan, 1998) tras la diabetes. Además, en trabajos realizados en nuestro laboratorio hemos observado que la diabetes aumenta la respuesta contráctil

a la ET-1 de las arterias basilar (Alabadí *et al.*, en prensa) y carótida (Lloréns *et al.*, 2004) de conejo, lo cual parece indicar que existe una especificidad territorial de los cambios inducidos por la diabetes en el territorio vascular. Otra posible explicación para estas discrepancias sería que la liberación y acción de la ET-1 dependa del tiempo de evolución de la diabetes como ocurre con otras sustancias (Morff, 1990; Yoshino *et al.*, 1992; Pieper y Siebeneich, 1998). Un trabajo realizado con ratas diabéticas demuestra que en fases tempranas de la diabetes hay una disminución de los niveles plasmáticos de ET-1 asociado a una hiperreactividad vascular al péptido, mientras que, en estados más avanzados de la enfermedad se produce una elevación plasmática de la ET-1 paralela a una respuesta vascular atenuada a la misma (Hopfner *et al.*, 1999). Sin embargo, nuestros resultados no pueden explicarse por estas diferencias en el efecto de la ET-1 dependientes del tiempo de evolución de la diabetes ya que tanto los resultados de la presente tesis doctoral como los obtenidos en arteria carótida (Lloréns *et al.*, 2004) y basilar (Alabadí *et al.*, en prensa) en nuestro propio laboratorio, se refieren a animales diabéticos de seis semanas de evolución en todos los casos. Es interesante resaltar la peculiaridad del lecho vascular renal, ya que de nuevo, en la respuesta a la ET-1 se comporta de forma diferente a otros territorios (disminución de la respuesta en arteria renal frente al aumento observado en arterias carótida y basilar) como ya se ha comentado en el caso de la Ach. Todos estos resultados tomados conjuntamente, es decir, aumento de la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio a la Ach y disminución de la potente respuesta vasoconstrictora a la ET-1 pueden

contribuir a la hiperperfusión e hiperfiltración renal observadas en la diabetes (Tolins *et al.*, 1993; Sugimoto *et al.*, 1998)

En el presente trabajo hemos estudiado el papel modulador del endotelio en la respuesta contráctil de la arteria renal a la ET-1. La eliminación del endotelio en los segmentos arteriales procedentes de conejo control produjo un aumento en la respuesta de la arteria renal a la ET-1; esto nos indica que el endotelio modula la respuesta a la ET-1, contrarrestando parcialmente la vasoconstricción producida por el péptido. Coincidiendo con estos resultados, se ha observado una modulación endotelial de la respuesta vasoconstrictora producida por la ET-1 en arteria cerebral media de cabra (Alabadí *et al.*, 1997), en arterias cerebrales de gato (Saito *et al.*, 1989; Kauser *et al.*, 1990), en aorta (Eglen *et al.*, 1989; Sakata *et al.*, 1989; Topouzis *et al.*, 1991) y en arteria mesentérica de rata (Randall *et al.*, 1989) y en arteria basilar (Alabadí *et al.*, en prensa) y carótida (Lloréns *et al.*, 2004) de conejo. Sin embargo, el endotelio no modula la respuesta vasoconstrictora inducida por la ET-1 en arterias cerebrales de perro (Saito *et al.*, 1991), humanas (Hardebo *et al.*, 1989; Martín de Aguilera *et al.*, 1990), arterias coronarias porcinas (Kasuya *et al.*, 1989) ni en aorta de conejo (Ohlstein *et al.*, 1989).

En arterias de animal diabético, la eliminación del endotelio potenció la respuesta contráctil de la arteria renal a la ET-1 pero, a diferencia de lo sucedido en segmentos arteriales de animales control, no se produjeron cambios en la contracción máxima alcanzada. Estos resultados parecen indicar que existe una alteración en la función moduladora del endotelio sobre

la respuesta vascular a la ET-1 y son similares a los obtenidos en arteria basilar (Alabadí *et al.*, en prensa) y carótida (Lloréns *et al.*, 2004) de conejo diabético. Sin embargo, el hecho de que en segmentos sin endotelio se mantenga la menor potencia de la ET-1 en la diabetes nos sugiere que esta disminución de la respuesta contráctil no se pueda explicar únicamente por factores endoteliales.

En nuestro estudio hemos investigado la participación del NO en la actividad moduladora endotelial de la respuesta contráctil de la arteria renal a la ET-1. La incubación de los segmentos arteriales de conejo control con el inhibidor de la NOS, L-NA, produjo una potenciación de la respuesta contráctil a la ET-1, lo cual nos indica que el NO amortigua la acción vasoconstrictora de la ET-1 en la arteria renal. Resultados similares se han obtenido en arteria cerebral media de cabra, donde se observa un aumento en la contracción inducida por la ET-1 al incubar con L-NA (Alabadí *et al.*, 1997). Sin embargo, no se ha encontrado modulación nitrérgica de la respuesta vascular a la ET-1 en arteria basilar de rata (Mayhan, 1998). En estudios *in vivo* se ha observado que la ET-1 induce la liberación de NO endotelial en vasos de resistencia humanos (Cardillo *et al.*, 2000). Además, en el lecho renal de la rata, se ha demostrado que el agonista de los receptores ET_B, BQ-3020, también estimula la liberación de NO endotelial (Kakoki *et al.*, 1999). Vemos pues que en las células endoteliales existe una importante relación entre el NO y la ET-1. De hecho, algunos autores muestran la existencia de un sistema de retroalimentación recíproco entre la producción de NO y ET-1 en las células endoteliales (Warner *et al.*, 1992). El NO liberado por las células

endoteliales inhibe permanentemente la síntesis (Kourembanas *et al.*, 1993; Boulanger y Lüscher 1990) y los efectos vasoconstrictores (Lüscher *et al.*, 1990; Ito *et al.*, 1991; Lerman *et al.*, 1992; Goligorsky *et al.*, 1994) de la ET-1, la cual a su vez estimula la producción de NO.

En arterias procedentes de conejos diabéticos observamos que la L-NA también produjo una potenciación de la respuesta contráctil de la arteria renal a la ET-1 sugiriendo la existencia de una modulación nitrérgica similar a la vista en el grupo de conejos control. Estos resultados coinciden con lo observado en arteria basilar de conejo donde la L-NA potenció la respuesta a la ET-1 (Alabadí *et al.*, en prensa); sin embargo en arteria carótida de conejo (Lloréns *et al.*, 2004) la L-NA no modificó la respuesta arterial a la ET-1. Estas diferencias encontradas en los distintos lechos vasculares del conejo utilizando el mismo modelo experimental confirman de nuevo la existencia de especificidad territorial de los cambios inducidos por la diabetes en el lecho vascular.

En arterias preincubadas con L-NA, la menor potencia de la ET-1 en arterias de animal diabético en comparación con la observada en animal control nos sugiere que esta diferencia es independiente de mecanismos moduladores nitrérgicos.

En el presente trabajo hemos estudiado también la posible participación de metabolitos derivados del ácido araquidónico por la vía de la ciclooxigenasa en la modulación de la respuesta contráctil de la arteria renal a la ET-1. La incubación de los segmentos arteriales procedentes de conejo control con el inhibidor de la ciclooxigenasa, indometacina, produjo una

inhibición de la respuesta contráctil con un desplazamiento hacia la derecha de la curva concentración-respuesta a la ET-1. Este resultado nos indica la participación de un vasoconstrictor prostanoide derivado de la vía de la ciclooxigenasa, probablemente el TxA₂, en dicha respuesta. En cultivos celulares de músculo liso vascular de rata y de conejo, la ET-1 estimula el metabolismo del ácido araquidónico, liberando TxA₂ y prostaglandinas que podrían modular la respuesta contráctil de este péptido (Takayasu *et al.*, 1989). De hecho en algunos lechos vasculares, como el hepático de rata (Kurihara *et al.*, 1992), la arteria basilar canina (Shirahase *et al.*, 1991) y la aorta de ratas hipertensas (Taddei y Vanhoutte, 1993), se ha demostrado que el TxA₂ derivado del endotelio contribuye a la contracción inducida por la ET-1. Recientemente hemos publicado que la indometacina inhibe la respuesta contráctil de la arteria carótida de conejo a la ET-1 (Lloréns *et al.*, 2004) pero sin embargo no modifica dicha respuesta en la arteria basilar (Alabadí *et al.*, en prensa).

En arterias procedentes de animal diabético la inhibición de la síntesis de prostanoides con indometacina, produjo un desplazamiento hacia la izquierda y un aumento del E_{max} de la curva concentración-respuesta, lo cual nos sugiere la existencia de un predominio de prostanoides vasodilatadores en la regulación de la respuesta de la arteria renal a la ET-1 en la diabetes. Estos resultados evidencian que existe una alteración en el perfil de prostanoides que modulan la respuesta de la arteria renal a la ET-1 en la diabetes. A pesar de la ya comentada especificidad territorial de los cambios inducidos por la diabetes, encontramos que en este punto, la alteración

producida por la diabetes en el perfil de los prostanoïdes que modulan la respuesta de la arteria renal es similar en los tres fármacos estudiados: predominio de prostanoïde vasoconstrictor en situación control (casos de 5-HT y ET-1) y predominio de prostanoïde vasodilatador (5-HT y ET-1) o bien aumento de su participación (Ach) en la diabetes. Recientemente se ha descrito el importante papel que juegan los prostanoïdes derivados de la COX-2 en la patogénesis de los cambios hemodinámicos renales que se producen en la diabetes (Komers *et al.*, 2001). Además, concentraciones elevadas de glucosa producen un incremento de la expresión de la COX-2 y de la PGI₂-sintasa lo que se asocia con un cambio en el balance de eicosanoïdes vasodilatadores y vasoconstrictores producidos por las células endoteliales (Cosentino *et al.*, 2003). Otros estudios muestran que la diabetes disminuye la formación de prostanoïdes vasoconstrictores en el lecho arterial mesentérico de rata en respuesta a la metoxamina (Makino y Kamata, 1998a) y en arteria carótida de conejo en respuesta a la Ach (Miranda *et al.*, 2000a) y a la 5-HT (Miranda *et al.*, 2000b).

En otros lechos vasculares el balance de prostanoïdes vasodilatadores/vasoconstrictores moduladores de la respuesta a la ET-1 varía de modo distinto al hallado en el presente trabajo. En la diabetes, la indometacina produce una mayor inhibición de la respuesta contráctil a la ET-1 en la arteria carótida de conejo (Lloréns *et al.*, 2004). Estos datos sustentan la especificidad territorial de los cambios en los mecanismos moduladores de la respuesta arterial a la ET-1 mencionados anteriormente y demuestran que las alteraciones en la reactividad vascular inducidas por la diabetes pueden

variar dependiendo de la especie, lecho vascular y estímulo estudiados. Un reciente estudio demuestra la existencia de diferencias regionales y por sexo en los cambios inducidos por la diabetes sobre la reactividad del músculo liso vascular (Sanz *et al.*, 2003).

Es interesante resaltar que, en presencia de indometacina, la potencia de la ET-1 en la arteria renal fue significativamente mayor en arterias de animal diabético que en arterias de animal control. Esto nos sugiere que el cambio en el perfil de prostanoïdes que modulan la respuesta de la arteria renal a la ET-1 puede explicar, al menos en parte, la disminución de la potencia contráctil de la ET-1 observada en este trabajo. También podría ser la expresión de la puesta en marcha de un mecanismo endotelial compensador para amortiguar una hiperreactividad a la ET-1. Este último argumento estaría en concordancia con nuestros hallazgos en otros lechos vasculares donde la diabetes induce una hiperreactividad arterial a la ET-1 (Lloréns *et al.*, 2004; Alabadí *et al.*, en prensa).

Para tratar de esclarecer el origen endotelial o muscular de los prostanoïdes reguladores de la respuesta de la arteria renal a la ET-1, se realizaron curvas concentración-respuesta de ET-1 en arterias sin endotelio e incubadas con indometacina. En animales control, la indometacina produjo un desplazamiento a la derecha de la curva concentración-respuesta a la ET-1 en arterias sin endotelio, lo cual sugiere la existencia de un prostanoïde vasoconstrictor de origen muscular, a diferencia de lo recientemente hallado en arteria carótida de conejo donde se demostró el origen endotelial de los prostanoïdes moduladores de la respuesta arterial a la ET-1 (Lloréns *et al.*,

2004). La existencia de un prostanoide vasoconstrictor de origen muscular se ha descrito en diversos estudios. El músculo liso de la aorta de rata libera prostaglandinas vasoconstrictoras derivadas de la COX-2 en respuesta a fármacos agonistas de los receptores α -adrenérgicos (Connolly *et al.*, 1998). La ET-1 estimula la expresión de la COX-2 y la producción de PGE₂ en las células mesangiales (Hughes *et al.*, 1995) y en macrófagos (Shimada *et al.*, 1998).

La incubación de los segmentos arteriales legrados de animales diabéticos con indometacina produjo también un desplazamiento a la derecha de la curva en relación con la respuesta obtenida en segmentos sin endotelio en ausencia del inhibidor lo cual indica que la diabetes no altera la actividad del prostanoide vasoconstrictor de origen muscular.

La respuesta contráctil a la ET-1 obtenida en arterias legradas incubadas con indometacina procedentes de conejo diabético fue menor a la obtenida en animal control. Esto sugiere que, en ausencia de mecanismos endoteliales y de prostanoideos moduladores, existe una menor reactividad de la arteria renal a la ET-1 en la diabetes. Es posible que la disminución de la actividad contráctil de la ET-1 en la diabetes, que hemos observado en la arteria renal de conejo, sea debida a alteraciones de la sensibilidad y/o número de receptores ET_A localizados en el músculo liso vascular, como han sugerido algunos autores (Cozza *et al.*, 1990; Hopfner *et al.*, 1999; Cardillo *et al.*, 2002).

En resumen, la diabetes disminuye la potencia contráctil de la ET-1 en la arteria renal. En los animales control la respuesta contráctil a la ET-1 está modulada por la liberación de NO endotelial y de un prostanoide vasoconstrictor de origen muscular. La diabetes modifica la participación de los factores que modulan dicha respuesta: se mantiene la producción del prostanoide vasoconstrictor muscular, no se evidencian cambios en la actividad moduladora del NO, pero aparece un predominio de un prostanoide vasodilatador endotelial (PGI₂) regulando esta respuesta.

CONCLUSIONES

1. La diabetes altera la respuesta de la arteria renal de conejo a las tres sustancias vasoactivas estudiadas: Ach, 5-HT y ET-1, alterando además el equilibrio existente entre los diferentes mecanismos moduladores de la respuesta de la arteria renal a los diferentes estímulos.
2. La diabetes potencia la respuesta relajante de la arteria renal de conejo a la Ach. En animales control la relajación inducida por Ach está mediada por NO, por un prostanoides derivado de la ciclooxigenasa, probablemente PGI₂, y por el EDHF. La diabetes aumenta la actividad moduladora de NO y PGI₂, lo cual podría explicar la mayor potencia relajante de la Ach en la diabetes.
3. La diabetes aumenta la contractilidad de la arteria renal a la 5-HT. En los animales control la respuesta contráctil a la 5-HT está regulada por la liberación de NO endotelial y extraendotelial y por un prostanoides vasoconstrictor. La diabetes modifica los factores que modulan esta respuesta, alterando la liberación de NO extraendotelial y la del prostanoides vasoconstrictor.
4. La diabetes disminuye la potencia contráctil de la ET-1 en la arteria renal. En los animales control la respuesta contráctil a la ET-1 está modulada por la liberación de NO endotelial y de un prostanoides vasoconstrictor de origen muscular. La diabetes modifica la

participación de los factores que modulan dicha respuesta: se mantiene la producción del prostanoide vasoconstrictor muscular, no se evidencian cambios en la actividad moduladora del NO pero aparece un predominio de un prostanoide vasodilatador endotelial regulando esta respuesta.

5. La arteria renal tiene un comportamiento diferente al de otros lechos vasculares en la diabetes: hay una potenciación de la respuesta vasodilatadora inducida por la Ach y una disminución de la potencia vasoconstrictora de la ET-1. Estos cambios en la reactividad vascular renal, junto con los cambios observados en la modulación de las respuestas vasculares, especialmente el predominio de los prostanoide vasodilatadores, pueden favorecer la hiperperfusión renal que se observa en la diabetes, y por tanto la aparición de la nefropatía diabética, una de las complicaciones más graves que aparecen en el enfermo diabético.

BIBLIOGRAFÍA

- Aageneas O, Moe H, (1961). Light and electron microscopy study of skin capillaries of diabetics. *Diabetes* 10: 253-259.
- Abebe W, Harris KH, McLeod, KM, (1990) Enhanced contractile responses of arteries from diabetic rats to α_1 -adrenergic stimulation in the absence and presence of extracellular calcium. *J Cardiovasc Pharmacol.* 16: 239-248.
- Agrawal DK, Bhimji S, McNeill JH, (1987). Effect of chronic experimental diabetes on vascular smooth muscle function in rabbit carotid artery. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 9: 584-593.
- Akmal M, (2001). Hemodialysis in diabetic patients. *Am J Kidney Dis. Suppl.* 1: S195-S199.
- Alabadí JA, Miranda FJ, Lloréns S, Centeno JM, Marrachelli VG, Alborch E. (2004). Mechanisms underlying diabetes enhancement of endothelin-1-induced contraction in rabbit artery. *Eur J Pharmacol*, en prensa.
- Alabadí JA, Torregrosa G, Miranda FJ, Salom JB, Centeno JM, 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.
- Alberti KGMM, Zimmet PZ, WHO, (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation. *Diabetic Med* 5:539-53
- Alipui C, Tenner TE. Jr, Ramos K, (1991) Rabbit aortic smooth muscle cell culture: a model for the pharmacological study of diabetes-induced alterations in cell proliferation. *J Pharmacol Methods* 26: 211-222.

- Altan VM, Karasu Ç, Özüari A, (1989) The effects of type-1 and type-2 diabetes on endothelium-dependent relaxation in rat aorta. *Pharmacol Biochem Behav* 33: 519-522.
- American Diabetes Association, (1997). Report of the expert comite on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care* 20:1183-97
- Avogaro A, Piarulli F, Valerio A, Miola M, Calveri M, Pavan P, Vicin P, Cobelli C, Tiengo A, Calo L, Del Prato S, (1997). Forearm nitric oxide balance, vascular relaxation, and glucose metabolism in NIDDM patients. *Diabetes* 46: 1040-1046.
- Bailey CC, (1949) Alloxan diabetes. *Vit Horm* 7: 365-382.
- Barret-Connor, E, (1985). Is insulin-dependent diabetes mellitus caused by coxsackie virus B infection? A review of the epidemiologic evidence. *Rev Infect Dis* 7: 207-215.
- Bell RH, Hye RJ, (1983). Animal models of diabetes mellitus: physiology and pathology. *J Surg Res* 35: 433-460.
- Bolton, TB, (1979). Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol Rev* 85: 606-719.
- Boquist L, (1984). Alloxan effects on mitochondria in vitro: correlation between endogenous adenine nucleotides and efflux of Ca²⁺. *Biochem Int* 9: 637-641.
- Boquist L, (1989). Alloxan diabetogenicity: determinants of potentiation, protection and β -cell selectivity. *Diabetes & Metab.* 15: 23-29.
- Bornfeldt KE, Arnqvist HJ, Capron L, (1992). In vivo proliferation of rat vascular smooth muscle in relation to diabetes mellitus insulin-like growth factor I and insulin. *Diabetologia* 35: 104-108.

- Boston PC, Hodgson WC, (1997). Changes in the reactivity towards 5-hydroxytryptamine in the renal vasculature of the diabetic spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* 15: 769-774.
- Boulanger G, Lüscher TF, (1990). Release of endothelin from the porcine aorta: inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest* 85: 587-590.
- Brian JR, Kennedy RH, (1993). Modulation of cerebral arterial tone by endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 264: H1245-H1250.
- Brownlee M, Cerami A, (1981). The biochemistry of the complications of diabetes mellitus. *Annu Rev Biochem* 50: 385-432.
- Brownlee M, Vlassara H, Klooney A, Ulrich P, Cerami A, (1986). Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science* 232: 1629-1632.
- Bucala R, Tracey KJ, Cerami A, (1991). Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest* 87: 432-438.
- Buckley CH, Hadoke PW, O'Brien CJ, (1998). Role of the endothelium in modulating functional responses of isolated bovine anterior ciliary arteries to vasoconstrictor agonists. *Br J Ophthalmol* 82: 826-829.
- Cameron NE, Dines KC, Cotter MA, (1994). The potential contribution of endothelin-1 to neurovascular abnormalities in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 37: 1209-1215.
- Cardell LO, Uddman R, Edvisson L, (1994). Endothelins: a role in cerebral disease? *Cephalalgia* 14: 259-265.

- Cardillo C, Campia U, Bryant MB, Panza JA, (2002). Increased activity of endogenous endothelin in patients with type II diabetes mellitus. *Circulation* 106: 1783-1787.
- Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO III, Panza JA, (2000). Interactions between nitric oxide and endothelin in the regulation of vascular tone of human resistance vessels in vivo. *Hypertension* 35: 1237-1241.
- Carmena R, Ascaso JF, (1993). Complicaciones vasculares de la diabetes. *Medicine* 6: 1432-1441.
- Casteels R, Wuytack F, Himpens B, Raeymaekers L, (1986). Regulatory systems for the cytoplasmic calcium concentration in smooth muscle. *Biomed Biochem Acta* 45: S147-S152.
- Cester N, Rabini RA, Salvolini E, (1996). Activation of endothelial cells during insulin-dependent diabetes mellitus: a biochemical and morphological study. *Eur J Clin Invest* 26: 569-573.
- Cohen R, Weisbrod RM, (1988). Endothelium inhibits norepinephrine from adrenergic nerves of rabbit carotid artery. *Am J Physiol* 254: H871-H878.
- Colwell JA, Winocour PD, Lopes-Virella M, Halushka PV, (1983). New concepts about the pathogenesis of atherosclerosis in diabetes mellitus. *Am J Med* 75: 67-79.
- Collier A, Leach JP, McLellan A, Jardine A, Morton JJ, Small M, (1992). Plasma endothelin like immunoreactivity levels in IDDM patients with microalbuminuria. *Diabetes Care* 15: 1038-1040.

- Connolly C, McCormick PA, Docherty JR, (1998). Effects of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide on vascular contractions in endothelium-denuded aorta. *Eur J Pharmacol* 35: 53-58.
- Conselleria de Sanitat, Direcció General de Salut Pública: Registro de enfermos renales de la Comunidad Valenciana. Datos del informe del año 2001.
- Cosentino F, Eto M, De Paolis P, Van der Loo B, Bachschmid M, (2003). High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells. Role of protein kinase C y reactive oxygen species. *Circulation* 107: 1017-1023.
- Cosentino F, Lücher TF, (1998). Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *J Cardiovasc Pharmacol* 32 (suppl 3): S54-S61.
- Cozza EN, Vila MC, Gomez-Sanchez CE (1990). Endothelin-1 receptors in C-6 cells: homologous down-regulation and modulation by protein kinase C. *Mol Cell Endocrinol* 70: 155-164.
- Craighead JE, (1975). The role of viruses in the pathogenesis of pancreatic disease and diabetes mellitus. *Prog Med Virol* 19: 161-214.
- Craven PA, Studer RK, Derubertis FR, (1994). Impaired nitric-oxide-dependent cyclic guanosine monophosphate generation in glomeruli from diabetic rats. *J Clin Invest* 93: 311-320.
- Crepaldi G, Nosadini R, (1988). Diabetic cardiomyopathy: is it a real entity? *Diabetes Metab Rev* 4: 273-288.
- Chan NN, Vallance P, Colhoun M (2000). Nitric oxide and vascular responses in Type I diabetes. *Diabetologia* 43: 137-147.

- Chang KS, Stevens WC, (1992). Endothelium-dependent increase in vascular sensitivity to phenylephrine in long-term streptozotocin diabetic rat aorta. *Br J Pharmacol* 107: 983-990.
- Choi KC, Lee SC, Kim SW, Kim NH, Lee JU, Kang YJ, (1999). Role of nitric oxide in the pathogenesis of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Intern Med* 14: 32-41.
- Dai FX, 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.
- De la Rubia G, Oliver FJ, Inoguchi T, King GL, (1992). Induction of resistance to endothelin-1's biochemical actions by elevated glucose levels in retinal pericytes. *Diabetes* 41: 1533-1539.
- De Moraes S, Cavalcante MT, Carvalho JC, Mathias RS, (1997). Endogenous thromboxane A₂ does not contribute to the contractile response of human umbilical artery strips to 5-hydroxytryptamine. *Gen Pharmacol* 29: 783-787.
- Derubertis FR, Craven PA (1994). Activation of protein kinase C in glomerular cells in diabetes. Mechanisms and potential links to the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Diabetes* 43, 1-8.
- Diederich D, (1997). Nitric oxide in diabetic nephropathy. En: *Nitric oxide and the kidney*, editado por M.S. Gologorski and S.S. Gross. New York: Chapman and Hall. 349-367.
- Documento de consenso sobre pautas de detección y tratamiento de la nefropatía diabética en España, (1997). Sociedades Españolas de:

- Diabetes, Endocrinología, Medicina Familiar y Comunitaria, Nefrología. Nefrología 17: 467-474.
- Dunn JS, Sheenan HL, McLetchie NGB, (1943). Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. Lancet i: 484-487.
- Eglen RM, Michel AD, Sharif NA, Swank SR, Whiting RL, (1989). The pharmacological properties of the peptide endothelin. Br J Pharmacol 97: 1297-1307.
- El Kashef H, (1996). Hyperglycemia increased the responsiveness of isolated rabbit's pulmonary arterial rings to serotonin. Pharmacology 53: 151-159.
- Elliot TG, Cockcroft JR, Groop PH, Viberti GC, Ritter JM, (1993). Inhibition of nitric oxide synthesis in forearm vasculature of insulin-dependent diabetic patients: blunted vasoconstriction in patients with microalbuminuria. Clin Sci (Colch) 85 : 687-693.
- Esmatjes A, (1999). La nefropatía diabética. Dimensión del problema en España. Av Diabetol 15 (supl 1): 10-2.
- Faraci FM, Brian JE, (1994). Nitric oxide and the cerebral circulation. Stroke 25: 692-703.
- Farber JL, (1981). The role of calcium in cell death. Life Sci 29: 1289-1295.
- Féléto M, Vanhoutte PM, (1988). Endothelium dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. Br J Pharmacol 93: 515-524.
- Féléto M, Vanhoutte PM, (1996). Endothelium-derived hyperpolarizing factor. Clin Exp Pharmacol Physiol 23: 1082-1090.
- Féléto M, Moreau N, Duhault J, (1994). Vascular responsiveness in young, diabetic, and aging hyperinsulinemic rats. Life Sci 54: 1801-1813.

- Ferrer M, Marín J, Balfagón G, (2000). Diabetes alters neuronal nitric oxide release from rat mesenteric arteries. Role of protein kinase C. *Life Sci* 66: 337-345.
- Fortes ZB, García Leme J, Scivoletto R, (1983). Vascular reactivity in diabetes mellitus: role of the endothelial cells. *Br J Pharmacol* 79: 771-781.
- Frank HJ, Levin ER, Hu RM, Pedram A, (1993). Insulin stimulates endothelin binding and action on cultured vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 133: 1092-1097.
- Fukao M, Hattori Y, Kanno M, Sakuna 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.
- Fulton DJR, Hodgson WC, Sikorski BW, King RG (1991). Attenuated responses to endothelin-1, KCl, and CaCl₂, but not noradrenaline, of aorta from rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Br J Pharmacol* 104:928-932.
- Furchgott RF, Zawadzki JV, (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376.
- Garcia VM, Ochoa JE, Elias MM, (1999). Effect of early stage of experimental diabetes on vascular functions in isolated perfused kidneys. *J Auton Pharmacol* 19: 97-103.

- García MJ, McNamara P, Gordon T, Kannell WB, (1974). Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population: sixteen year follow-up study. *Diabetes* 23: 105-111.
- Garg UC, Hassid A, (1989). Nitric oxide generating vasodilators and 8-bromocyclic guanosine monophosphate inhibits mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 83: 1774-1776.
- Garland CJ, McPherson GA, (1992). Evidence that nitric oxide does not mediate hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in the small mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 105: 429-435.
- Gebremedhin D, Koltai MZ, Pogatsa G, Magyar K, Hadhazy P, (1989). Altered responsiveness of diabetic dog renal arteries to acetylcholine and phenylephrine: role of endothelium. *Pharmacology* 38:177-184.
- Goldin E, Casadevall M, Mourelle M, Cirera I, Elizalde JI, Panes J, Casamitjana R, Guth P, Pique J, Teres J, (1996). Role of prostaglandins and nitric oxide in gastrointestinal hyperemia of diabetic rats. *Am J Physiol* 270: G684-G690.
- Goligorsky M, Sukahara HT, Magazine H, Andersen TT, Malik AB, Bahou WF, (1994). Termination of endothelin signalling: role of nitric oxide. *J Cell Physiol* 158: 485-494.
- Guillon JM, Thiry C, Roach AG, Caverio I, (1998). Preferential reduction in vascular responses to endothelin-1 in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Cardiovasc Pharmacol* 31 (suppl.1): S133-S137

- Gupta S, Sussman I, McArthur CS, Tornheim K, Cohen RA, Ruderman NB, (1992). Endothelium-dependent inhibition of Na⁺-K⁺ ATPase activity in rabbit aorta by hyperglycemia. Possible role of endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest* 90: 727-732.
- Haak T, Jungmann E, Felber A, Hillman U., Usadel KH, (1992). Increased plasma endothelin concentrations in diabetic patients with hypertension. *Am J Hypertens* 5:161-166.
- Hadcock S, Richardson M, Winocour PD, Hatton MW, (1991). Intimal alterations in rabbit aortas during the first 6 months of alloxan-induced diabetes. *Arterioscler Thromb* 11: 517-529.
- Haller H, (1997). Endothelial Function. General Considerations. *Drugs* 53: 1-10.
- Hamlin CR, Kohn RR, Luschin J, (1975). Apparent accelerated aging of human collagen in diabetes mellitus. *Diabetes* 24: 902-904.
- Hanasaki K, Nakano T, Arita H, (1990). Receptor mediated mitogenic effect of thromboxane A₂ in vascular smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* 40: 2535-2542.
- Hardebo JE, Kahrström J, Owman C, Salford LG, (1989). Endothelin is a potent constrictor of human intracranial arteries and veins. *Blood Vessels* 26: 249-253.
- Hassid A, Williams C, (1983). Vasoconstrictor-evoked prostaglandin synthesis in cultured vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 245: C278-C282.
- Hattori Y, Kasai K, Nakamura T, Emoto T, Shimoda S, (1991). Effect of glucose and insulin on immunoreactive endothelin-1 release from cultured porcine aortic endothelial cells. *Metabolism* 40: 165-169.

- Hayashi K, Loutzenhiser R, Epstein M, Suzuki H, Saruta T, (1994). Multiple factors contribute to acetylcholine-induced renal afferent arteriolar vasodilatation during myogenic and norepinephrine- and KCl-induced vasoconstriction. Studies in isolated perfused hydronephrotic Kidney. *Circ Res* 75: 821-828.
- Hogan M, Cerami A, Bucala R, (1992). Advanced glycosylation end products block the antiproliferative effect of nitric oxide: role of vascular and renal complications of diabetes mellitus. *J Clin Invest* 90: 1110-1115.
- Hopfner RL, Hasnadka RV, Wilson TW, McNeill JR, Gopalakrishnan V, (1998a). Insulin increases endothelin-1-evoked $[Ca^{+2}]_i$ responses by increased ET_A receptor expression in rat aortic smooth muscle cells. *Diabetes* 47:937-944.
- Hopfner RL, Misurski D, Wilson TW, McNeill JR, Gopalakrishnan V, (1998b). Insuline and vanadate restore decreased plasma endothelin concentrations and exaggerated vascular responses to normal in the streptozotocin diabetic rat. *Diabetologia* 41:1233-1240.
- Hopfner RL, McNeill JR, 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.
- Hughes AK, Padilla E, Kutchera WA, Michael JR, Kohan DE, (1995). Endothelin-1 induction of cyclooxygenase-2 expression in rat mesangial cells. *Kidney Int* 47: 53-61.

- Ignacio CS, Curling PE, Childres WF, Brian RM Jr, (1997). Nitric oxide-synthesizing perivascular nerves in the rat middle cerebral artery. *Am J Physiol* 273: R661-R668.
- Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Woods KS, (1987). Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacological and chemical properties that are identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* 61: 866-879.
- Ingle DJ, (1948). The production of experimental glycosuria in the rat. *Recent Prog Horm Res* 2: 229-253.
- Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T, (1989). The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci* 86: 2863-2867.
- Ito S, Juncos LA, Nushiro N, Johnson CS, Carretero OA, (1991). Endothelium-derived relaxing factor modulates endothelin action in afferent arterioles. *Hypertension* 17: 1052-1056.
- James GM, Hodgson WC, Davies EA, Haynes JM, (1994). Attenuated 5-hydroxytryptamine receptor-mediated responses in aorta from streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pharmacol* 111: 370-376.
- James GM, Hodgson WC, (1997). A role for protein kinase C in attenuated response to 5-hydroxytryptamine in aortas from streptozotocin-diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 322: 55-58.

- James GM, Hodgson WC, Davis EA, Haynes JM, (1994). Attenuated 5-hydroxytryptamine receptor-mediated responses in aortae from streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Pharmacol* 111: 370-376.
- Jarret RJ, (1989). Cardiovascular disease and hypertension in diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 5: 547-558.
- Jiang H, Stephens NL, (1994). Calcium and smooth muscle contraction. *Mol Cel Biochem* 135:1-9.
- Kagota S, Yamaguchi Y, Nakamura K, Kunitomo M, (1999). Characterization of nitric oxide- and prostaglandin-independent relaxation in response to acetylcholine in rabbit renal artery. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26:790-796.
- 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.
- Kamata K, Yamashita K, (1999). Insulin resistance and impaired endothelium-dependent renal vasodilatation in fructose-fed hypertensive rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 103: 195-210.
- Karasu Ç, Altan VM, (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.
- Karlsson C, Bodelsson G, Bodelsson M, Stjernquist M, (1998). Endothelium-derived prostanoids reduce 5-hydroxytryptamine-induced contraction in the human uterine artery. *Hum Reprod* 13: 1947-1951.

- Kastrup J, (1988). The diabetic arteriole: the impact of diabetic microangiopathy on microcirculatory control. *Dan Med Bull* 35: 334-345.
- Kasuya Y, Takuwa Y, Yanagisawa M, Kimura S, Goto K, Masaki T, (1989). Endothelin-1 induces vasoconstriction through two functionally distinct pathways in porcine coronary artery: contribution of phosphoinositide turnover. *Biochem Biophys Res Commun* 161: 1049-1055.
- Katušić ZS, Cosentino F, (1994). Nitric oxide synthase: from molecular biology to cerebrovascular physiology. *News Physiol Sci* 9: 64-67.
- Kauser K, Rubanyi M, Harder DR, (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, (1992). Increased plasma endothelin in NIDDM patients with retinopathy. *Diabetes care* 15: 1396-1397.
- Kennedy L, Baynes JW, (1984). Non-enzymatic glycosylation and chronic complications of diabetes: an overview. *Diabetologia* 26: 93-98.
- Kiff RJ, Gardiner SM, Compton AM, 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.
- Knowles RG, Moncada S, (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* 298: 249-258.
- Koh E, Morimoto S, Jiang B, Inoue T, Nabata T, Kitano S, Yasuda O, Fukuo K, Ogihara T, (1993). Effects of benoprost sodium, a stable analogue of

- prostacyclin, on hyperplasia, hypertrophy and glycosaminoglycan synthesis in rat aortic smooth muscle cells. *Artery* 20: 242-252.
- Koltai MZ, Hadhazy P, Posa I, Kocsis E, Winkler G, Rösen P, Pogatsa G, (1997). Characteristics of coronary endothelial dysfunction in experimental diabetes. *Cardiovas Res* 34: 157-163.
- Komers R, Lindsley JN, Oyama TT, (2001). Immunohistochemical and functional correlations of renal cyclooxygenase-2 in experimental diabetes. *J Clin Invest* 107: 889-898.
- Komers R, Lindsley JN, Oyama TT, Allison KM, Anderson S, (2000a). Role of neuronal nitric oxide synthase (NOS1) in the pathogenesis of renal hemodynamic changes in diabetes. *Am J Physiol* 279: F573-F583.
- Komers R, Oyama TT, Chapman JG, Allison KM, Anderson S, (2000b). Effects of systemic inhibition of neuronal nitric oxide synthase in diabetic rats. *Hypertension* 35: 655-661.
- Kone BC, Baylis C, (1997). Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney. *Am J Physiol* 272: F561-F578.
- Koschinsky T, Bunting CE, Schippert B, Gries FA, (1979). Increased growth of human fibroblasts and arterial smooth muscle cells from diabetic patients related to diabetic serum factors and cell origin. *Atherosclerosis* 33: 245-252.
- Kourembanas S, McQuillan LP, Leung GK, Faller DV, (1993). Nitric oxide regulates the expression of vasoconstrictors on growth factors by vascular endothelium under both normoxia and hipoxia. *J Clin Invest* 92: 99-104.

-
- 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.
- Ledet T, (1981). Diabetic macroangiopathy and growth hormone. *Diabetes* 30 (suppl. 2): 1380-1385.
- Lee YH, Shin SJ, Tsai JH, (1994). Increased urinary endothelin-1 like immunoreactivity in NIDDM patients with albuminuria. *Diabetes care* 17:450-456.
- Legan E, (1989). Effects of streptozotocin-induced hyperglycemia on agonist stimulated phosphatidylinositol turnover in rat aorta. *Life Sci* 45: 371-378.
- Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, Heublein DM, Sandberg SM, Burnett JC Jr, (1991). Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med* 325: 997-1001.
- Lerman A, Sandok EK, Hildebrand FL, Burnett JC Jr, (1992). Inhibition of endothelium-derived relaxing factor enhances endothelin-mediated vasoconstriction. *Circulation* 85: 1894-1898.
- Lerman A, Webster MW, Chesebro JH, Edwards WD, Wei C, Fuster V, Burnett JC Jr, (1993). Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in hypercholesterolemic pigs. *Circulation* 88: 2923-2928.
- Lin SJ, Hong CY, Chang MS, Chiang BN, Chien S, (1993). Increased aortic endothelial death and enhanced transendothelial macromolecular transport in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 36: 926-930.

- Lüscher TF, Yang Z, Tschudi M, Von Segesser L, Stulz P, Boulanger C, Siebenmann R, Turina M, Bühler FR, (1990). Interaction between endothelin-1 and endothelium-derived relaxing factor in human arteries and veins. *Circ Res* 66: 1088-1094.
- Lloréns S, Miranda FJ, Alabadí JA, Marrachelli VG, Alborch E, (2004). Different role of endothelin ET_A and ET_B receptors and endothelial modulators in diabetes-induced hyperreactivity of the rabbit carotid artery to endothelin-1. *Eur J Pharmacol* 486 :43-51.
- Makino A, Kamata K, (1998b). Elevated plasma endothelin-1 concentration in streptozotocin-induced diabetic rats and responsiveness of the mesenteric arterial bed to endothelin-1. *Br J Pharmacol* 123:1065-1072.
- Makino A, Oda S, Kamata K, (2001). Mechanisms underlying increased release of endothelin-1 from aorta in diabetic rat. *Peptides* 22 639-45.
- Makino A, Ohuchi K, Kamata K. Mechanisms underlying the attenuation of endothelium-dependent vasodilatation in the mesenteric arterial bed of streptozotocin-induced diabetic rat . *Br J Pharmacol*, 2000, 130: 549-556.
- Makino A, Kamata K, (1998a). 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.
- Malik RA, Tesfaye S, Thompson SD, Veves A, Sharma AK, Boulton AJ, Ward JD, (1993). Endoneurial localitation of microvascular damage in human diabetic neuropathy. *Diabetologia* 36, 454-459.

- Martín de Aguilera E, Irurzun A, Vila JM, Aldasoro M, Galeote MS, Lluch S, (1990). Role of endothelium and calcium channels in endothelin-induced contraction of human cerebral arteries. *Br J Pharmacol.* 99: 439-440.
- Masaki T, (1995). Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35: 235-255.
- Mata M, Antoñanzas F, Tafalla M, Sanz P, (2002). El coste de la diabetes tipo 2 en España. El estudio CODE-2. *Gac Sanit* 16; 6: 511-20.
- Mathew V, Cannan CR, Miller VM, Barber DA, Hasdai D, Schwarz RS, Holmes DR, Lerman A, (1997). Enhanced endothelin-mediated coronary vasoconstriction and attenuated basal nitric oxide activity in experimental hypercholesterolemia. *Circulation* 96: 1930-1936.
- Mathias RS, Carvalho JC, Cavalcante MT, De Moraes S, (1997). Effects of simulated myocardial ischemic conditions on the responses of isolated human umbilical artery strips to 5-hydroxytryptamine and prostaglandin F₂ alpha. *Gen Pharmacol* 29: 483-487.
- Matikainen E, Leinonen H, Juntunen J, (1982). Capillary morphology and muscle blood flow in diabetic neuropathy. *Eur Neurol* 21: 22-28.
- Mayhan WG, Irvine SD, Sharpe GM, (1999). Constrictor responses of resistance arterioles during diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 44: 147-156.
- Mayhan WG, (1998). Constrictor responses of the rat basilar artery during diabetes mellitus. *Brain Res* 783 (2): 326-331.

- Medina P, Chuan P, Noguera R, Vila JM, Aldasoro M, Lluch S, (1996).
Reactivity of human deferential artery to constrictor and dilator substances.
J Androl 17: 733-739.
- Miranda FJ, Alabadí JA, Lloréns S, Ruiz de Apodaca RF, Centeno JM, Alborch E, (2000^a). Influence of experimental diabetes on regulatory mechanisms of vascular response of rabbit carotid artery to acetylcholine. Life Sci 66: 2071-2080.
- Miranda FJ, Alabadí JA, Lloréns S, Ruiz de Apodaca RF, Centeno JM, Alborch E, (2000^b). Diabetes-induced changes in endothelial mechanisms implicated in rabbit carotid arterial response to 5-hydroxytryptamine. Eur J Pharmacol. 401, 397-402.
- Miranda FJ, Alabadí JA, Torregrosa G, Salom JB, Jover T, Barberá MD, Alborch E, (1996). Modulatory role of endothelial and nonendothelial nitric oxide in 5-hydroxytryptamine-induced contraction in cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage. Neurosurgery 39: 998-1004.
- Miranda FJ, Torregrosa G, Salom JB, Alabadí JA, Jover T, Barberá MD, Alborch E, (1993). Endothelial modulation of 5-hydroxytryptamine-induced contraction in goat cerebral arteries. Gen Pharmacol 24: 649-653.
- Miyauchi T, Masaki T, (1999). Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. Annu Rev Physiol 61: 391-415.
- Miyauchi T, Goto k, (1998). Molecular Pharmacology and pathophysiological significance of endothelin. Trends Pharmacol Sci 20:210-7

- Moncada S, Higgs A, Furchgott R, (1997). XIV International Union of Pharmacology Nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacol. Rev.* 49: 137-142.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA, (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142.
- Moncada S, Vane JR, (1979). Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂, and prostacyclin. *Pharmacol Rev* 30: 293-331.
- Morff RJ, (1990). Microvascular reactivity to norepinephrine at different arteriolar concentrations and durations of streptozocin-induced diabetes. *Diabetes* 39: 354-360.
- Mulhern M, Docherty JR, (1989). Effects of experimental diabetes responsiveness of rat aorta. *Br J Pharmacol* 97: 1007-1012.
- Murphy LJ, Ghahary A, Chakrabarti S, (1990). Insulin regulation of IGF-I expression in rat aorta. *Diabetes* 39: 657-662.
- Myers PR, Minor RL, Guerra R, Bates JN, Harrison DG, (1990). Vasorelaxant properties of the endothelium derived relaxant factors more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide. *Nature* 345: 161-164.
- Nicosia RF, Nicosia SV, Smith M, (1994). Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis in vitro. *Am J Pathol* 145: 1023-1029.
- Nishizuka Y, (1988). The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334: 661-665.

- Ohishi K, Carmines PK, (1995). Superoxide dismutase restores the influence of nitric oxide on renal arterioles in diabetes mellitus. *J Am Soc Nephrol* 5: 1559-1566.
- Ohlstein EH, Horohonich S, Hay DWP, (1989). Cellular mechanisms of endothelin in rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 250: 548-555.
- 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.
- Oliver FJ, De la Rubia G, Feener EP, Lee, ME, Loeken MR, Shiba T, Quertermous T, King GL, (1991). Stimulation of endothelin-1 gene expression by insulin in endothelial cells. *J Biol Chem* 266: 23251-23256.
- Omer S, Shan J, Varma DR, Mulay S, (1999). Augmentation of diabetes-associated renal hyperfiltration and nitric oxide production by pregnancy in rats. *J Endocrinol* 161: 15-23.
- Orie NN, Aloamaka CP, Iyawe VI, (1993). Duration-dependent attenuation of acetylcholine- but not histamine-induced relaxation of the rat aorta in diabetes mellitus. *Gen Pharmacol* 24: 329-332.
- Oyama Y, Kawasaki H, Hattori Y, Kanno M, (1986). Attenuation of endothelium-dependent relaxation in aorta from diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 131: 75-78.
- Öztürk Y, Altan VM, Yildizoglu-Ari N, (1996). Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle function. *Pharmacol Rev* 48: 69-112.

- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S, (1987). Nitric oxide accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526.
- Pellegrino DA, Koenig HM, Wang Q, Albrecht RF, (1994). Protein kinase C suppresses receptor-mediated pial arteriolar relaxation in the diabetic rats. *Neuroreport* 5: 417-420.
- Perfetto F, Tarquini R, Tapparini L, Tarquini B, (1998). Influence of non-insulin dependent diabetes mellitus on plasma endothelin-1 levels in patients with advanced atherosclerosis. *J Diabetes Complications* 12: 187-192.
- Perreault M, Dombrowski L, Marette A, (2000). Mechanism of impaired nitric oxide synthase activity in skeletal muscle of streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia* 43: 427-437.
- Pflueger AC, Osswald H, Knox FG, (1999). Adenosine-induced renal vasoconstriction in diabetes mellitus rats: role of nitric oxide. *Am. J. Physiol.* 276: F340-F346.
- Pieper GM, Siebeneich W, (1998). Early augmentation of nitric oxide mediated endothelium dependent relaxation in streptozotocin diabetic rat aorta. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol* 358 (suppl.1): 18-33, abstract
- Pieper GM, (1999). Enhanced, unaltered and impaired nitric oxide mediated endothelium-dependent relaxation in experimental diabetes mellitus: importance of disease duration. *Diabetologia* 42: 204-213.
- Rabelink TJ, Bakris GL. (1998). The renin- angiotensin system in diabetic nephropathy: the endothelial connection. *Miner Electrolyte Metab* 24: 381-388.

- Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV, (1963). Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother. Rep.* 29: 91-98.
- Randall MD, Douglas SA, Hiley CR, (1989). Vascular activities of endothelin-1 and some alanyl substituted analogues in resistance beds of the rat. *Br J Pharmacol* 98: 685-699.
- Rizzoni D, Porteri E, Guelfi D, (2001). Structural alterations in subcutaneous small arteries of normotensive and hypertensive patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 103:1238-1244.
- Rosenberg CR, Modrak JB, Hassing JM, Al-Turk WA, Sthos SH, (1979). Glycosylated collagen. *Biochem Biophys Res Commun* 91: 498-501.
- Rosenstock J, Challis P, Strowig S, Raskin P, (1988). Improved diabetes control reduces skeletal muscle capillary basement membrane width in insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 4: 167-175.
- Roufail E, Soulis T, Boel E, Cooper ME, Rees S, (1998). Depletion of nitric oxide synthase-containing neurons in the diabetic retina: reversal by aminoguanidine. *Diabetologia* 41: 1419-1425.
- Rubio JA, Alvarez J,(1998). Costes económicos de la diabetes mellitus: revisión crítica y valoración coste-eficacia de las estrategias propuestas para su reducción. *Aten Primaria* 22: 239-58
- Saito A, Shiba R, Yanagisawa M, Kimura S, Yamada K, Mima T, Shigeno T, Goto K, (1991). Endothelins: vasoconstrictor effects and localization in canine cerebral arteries. *Br J Pharmacol* 103: 1129-1135.

- Sakata K, Ozaki H, Kwon SC, 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.
- Sakurai K, Ogiso T, (1995). Effect of ferritin on lambda-DNA strand breaks in the reaction system of alloxan plus NADPH-cytochrome P450 reductase: ferritins role in diabetogenic action of alloxan. *Biol & Pharm Bull* 18: 262-266.
- Salom JB, Torregrosa G, Alborch E, (1995). Endothelins and the cerebral circulation. *Cerebrovasc. Brain Metab Rev* 7: 131-152.
- Santilli SM, Fiegel VD, Knighton DR, (1993). Alloxan diabetes alters the rabbit transendothelial wall oxygen gradient. *J Vasc Surg* 18: 227-233.
- Santilli SM, Fiegel VD, Aldridge DE, Knighton DR, (1992). The effect of diabetes on the proliferation of aortic endothelial cells. *Ann Vasc Surg* 6: 503-510.
- Sanz E, Fernández N, Monge L, Martínez MA, Climent B, Diéguez G, García-Villalón AL, (2003). Effects of diabetes on the vascular response to nitric oxide and constrictor prostanoids: gender and regional differences. *Life Sci* 72, 1537-1547.
- Schilling L, Parsons AA, Mackert JRL, Wahl M, (1991). Is K⁺ channel activation, EDRF, or cyclooxygenase products involved in acetylcholine-induced relaxation of rabbit isolated basilar artery? *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 11 (suppl.2): S256.
- Seo B, Oemar BS, Siebenmann R, Von Segesser L, Lüscher TF, (1994). Both ET_A and ET_B receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels. *Circulation* 89: 1203-1208.

-
- Sheykhzade M, Dalsgaard GT, Johansen T, Nyborg NCB (2000). The effect of long-term streptozotocin-induced diabetes on contractile and relaxation responses of coronary arteries: selective attenuation of CGRP-induced relaxations. *Br J Pharmacol* 129:1212-1218.
- Shi W, Wang CG, Dandurand RJ, Eidelman DH, Michel RP, (1998). Differential responses of pulmonary arteries and veins to histamine and 5-HT in lung explants of guinea-pigs. *Br J Pharmacol* 123: 1525-1532.
- Shimada K, Yonetani Y, Kita T, Suzumura A, Takayanagi T, Nakashima T. (1998). Cyclooxygenase-2 expression by endothelin-1-stimulated mouse resident peritoneal macrophages in vitro. *Eur J Pharmacol* 356: 73-80.
- Shin SJ, Lai FJ, Wen JD, Hsiao PJ, Hsieh MC, Tzeng TF, Chen HC, Guh JY, Tsai JH, (2000). Neuronal and endothelial nitric oxide synthase expression in outer medulla of streptozotocin-induced diabetic rat kidney. *Diabetologia* 43: 649-659.
- Shin SJ, Lee Y, Lin JSR, Tan MS, Lai YH, Tsai JH (1995). Decrease of renal endothelin-1 content and gene expression in diabetic rats with moderate hyperglycemia *Nephron* 70:486-93.
- Shirahase H, Fujiwara M, Usui H, Kurahashi K, (1987). A possible role of thromboxane A₂ in endothelium in maintaining resting tone and producing contractile response to acetylcholine and arachidonic acid in canine cerebral arteries. *Blood Vessels* 24: 117-119.
- 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.

- Shirotani M, Yui Y, Hattori R, Kawai C, (1991). U-61, 431F, a stable prostacyclin analogue, inhibits proliferation of bovine vascular smooth muscle cells with little antiproliferative effect on endothelial cells. *Prostaglandins* 41: 97-110.
- Sikorski BW, James GM, Glance SD, Hodgson WC, King RG, (1993). Effect of endothelium on diabetes-induced changes in constrictor responses mediated by 5-Hydroxytryptamine in rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol* 22: 423-430.
- Smuckler EA, James JL, (1984). Irreversible cell injury. *Pharmacol Rev* 36 (suppl. 2): 77S-91S.
- Sobrevia L, Mann GE (1997). Dysfunction of the endothelial nitric oxide signalling pathway in diabetes and hyperglycaemia. *Exp Physiol* 82:423-452.
- Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Went-Worth D, (1993). The multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group: Diabetes, other risk factors and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* 16: 434-444.
- Strandness DE, Priest RE, Gibbons GE, (1964). Combined clinical and pathological study of diabetic and non-diabetic peripheral arterial disease. *Diabetes* 13: 366-372.
- Sugimoto H, Shikata K, Matsuda M, Kushiro M, Hayashi Y, Hiragushi K, Wada J, Makino H, (1998). Increased expression of endothelial cell nitric oxide synthase (ecNOS) in afferent and glomerular endothelial cells is involved in glomerular hyperfiltration of diabetic nephropathy. *Diabetologia* 41: 1426-1434.

- Taddei S, Vanhoutte PM, (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.
- Takuwa Y, (1993). Endothelin in vascular and endocrine systems: Biological activities and its mechanisms of action. *Endocrine J* 40: 489-506.
- Tammesild PJ, Hodgson WC, King RG, (1992). Increased sensitivity to endothelin-1 in isolated Krebs perfused kidneys of streptozotocin diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 19: 261-265.
- Tolins JP, Shultz PJ, Raij L, Brown DM, Mauer SM, (1993). Abnormal renal hemodynamic response to reduced renal perfusion pressure in diabetic rats: role of NO. *Am J Physiol* 265: F886-F895.
- Tomimoto H, Nishimura M, Suenaga T, Nakamura S, Akiguchi I, Wakita H, Kimura J, Mayer B, (1994). Distribution of nitric oxide synthase in the human cerebral blood vessels and brain tissues. *J Cereb Blood Flow Metab* 14: 930-938.
- Topouzis S, Huggins JP, Pelton JT, Miller RC, (1991). Modulation by endothelium of the responses induced by endothelin-1 in canine cerebral arteries. *Br J Pharmacol* 102: 545-549.
- Trump B, Berezesk YK, (1985). The role of calcium in cell injury and repair: a hypothesis. *Surv Synth Pathol Res.* 4: 248-256.
- Utkan T, Sarioglu Y, Yildirim S, (1998). Impaired contraction and relaxation in the aorta of streptozotocin-diabetic rats. *Pharmacology*; 56 (4): 207-215.

- Valentin JP, Bonnafous R, John GW, (1996). Influence of the endothelium and nitric oxide on the contractile responses evoked by 5-HT_{1D} receptor agonists in the rabbit isolated saphenous vein. *Br J Pharmacol* 119: 35-42.
- Van Buren T, Vleeming W, Krutzen MM, Van de Kuil T, Gispen WH, De Wildt DJ, (1998). Vascular responses of isolated mesenteric resistance and basilar arteries from short- and long-term diabetic rats. *Naunyn Schmied Arch Pharmacol* 358: 663-670.
- Van de Voorde J, Vanheel B, Leusen I, (1992). Endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization in aorta from control and renal hypertensive rats. *Circ Res* 70: 1-8.
- Vanhoutte PM, (1989). Endothelium and control of vascular function. *Hypertension* 13: 658-667.
- Veelken R, Hilgers KF, Hartner A, Haas A, Böhmer KP, Sterzel B, (2000). Nitric oxide synthase isoforms and glomerular hyperfiltration in early diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 11:71-79.
- Vermes I, Spooren PF, Kalsbeek-Batenburg EM, Haanen C (1993). In addition to von Willebrand factor and urinary albumin excretion, plasma endothelin is an indicator of endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Diabetologia* 36: 472-473
- Wahl M, Schilling L, (1993). Regulation of cerebral blood flow: A brief review. *Acta Neurochir* 59: 3-10.
- Wakabayashi I, Hatake K, Kimura N, Kakishita E, Nagai K, (1987). Modulation of vascular tonus by endothelium in experimental diabetes. *Life Sci* 40: 643-648.

- Wang YX, Brooks DP, Edward RM, (1993). Attenuated glomerular cGMP production and renal vasodilation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am J Physiol* 264 (Regulatory Integrative Comp Physiol 33): R952-R956.
- Warner TD, Schmidt HHHW, Murad F, (1992). Interactions of endothelins and EDRF in bovine native endothelial cells: selective effects of endothelin-3. *Am J Physiol* 262: H1600-H1605.
- Watts GF, O'Brien SF, Silvester W, Millar JA, (1996). Impaired endothelium-dependent and -independent dilatation of forearm resistance arteries in men with diet-treated non-insulin-dependent diabetes: role of dyslipidaemia. *Clin Sci* 91: 567-573.
- Weaver DC, McDaniel ML, Naber SP, Barry D, Lacy PE, (1978). Alloxan stimulation and inhibition from isolated rat islets of Langerhans. *Diabetes* 27: 1205-1214.
- White RO, Carrier GO, (1986). Supersensitivity and endothelium dependency of histamine-induced relaxation in mesenteric arteries isolated from diabetic rats. *Pharmacology* 33: 34-38.
- WHO Study Group Diabetes mellitus: Diabetes mellitus. Fact Sheet nº 138 april 2002. World Health Organization, Geneva.
- WHO Study Group Diabetes mellitus: Global burden of diabetes. Press release WHO/63 september 1998. World Health Organization, Geneva.
- WHO Study Group Diabetes mellitus: The costs of diabetes. Fact Sheet nº 236 november 1999. World Health Organization, Geneva.
- Wong KK, Tzeng SF, (1992). Norepinephrine-induced contractile responses in isolated rat aortae from different duration of diabetes. *Artery* 19: 1-13.

- Wu SQ, Tang F (1998). Impaired paracrine effect on endothelin-1 on vascular smooth muscle in streptozotocin diabetic rats. *Cardiovasc Res* 39: 651-656.
- Yagihashi N, Nishida N, Geuk Seo H, Taniguchi N, Yagihashi S. (1996). Expression of nitric oxide synthase in macula densa in streptozotocin diabetic rats. *Diabetologia* 39: 793-799.
- 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.
- Yamauchi T, Ohnaka K, Takayanagi R, Umeda F, Nawata H, (1990). Enhanced secretion of endothelin-1 by elevated glucose levels from cultured bovine aortic endothelial cells. *FEBS Lett* 267: 16-18.
- 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.
- Yasuda H, Dyck PJ (1987). Abnormalities of endoneurial microvessels and sural nerve pathology in diabetic neuropathy. *Neurology* 37, 20-28.
- Yoshimoto S, Ishizaki Y, Kurihara H, Sasaki T, Yoshizumi M, Yanagisawa M, Yazaki Y, Masaki T, Takakura K, Murota S, (1990). Cerebral microvessel endothelium is producing endothelin. *Brain Res* 508: 283-285.
- Yoshino G, Matsushita M, Maeda E, Naka Y, Nagata K, Morita M, Matsuba K, Kazumi T, Kasuga M (1992). Effect of long-term insulin deficiency and

insulin treatment on the composition of triglyceride rich lipoproteins and triglyceride turnover in rats. *Atherosclerosis* 92: 243-250.