

El papel del óxido nítrico en la patogénesis de la hipertensión arterial en la diabetes

ORLANDO L. CATANZARO*, ANTONIO E. DOMINGUEZ*, GABRIELA M. PRENDEZ*,
ADRIANA ZUCCOLLO*, CRISTINA ARRANZ*, MARIA DE LOS ANGELES COSTA*,
ANA M. BALASZCZUK*, CARLOS A. FELDSTEIN**

* Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, PROSIVAD, CONICET, Buenos Aires

** Programa Hipertensión Arterial, Hospital de Clínicas Jose de San Martín, PROSIVAD, CONICET, Buenos Aires

Trabajo recibido para su publicación: 6/93. Aceptado: 9/93

Dirección para separatas: Prof. Dr. Carlos A. Feldstein, Rivadavia 4243, 6º "B", (1205) Capital Federal, Argentina

El factor de relajación derivado del endotelio quizás sea idéntico al óxido nítrico y es liberado tanto en condiciones basales sin estimulación como en respuesta a diversos estímulos físicos y químicos. Ambos se consideran un importante vasodilatador endógeno que participa en la modulación del tono vascular. Investigaciones recientes mostraron que en la diabetes mellitus el músculo liso vascular es menos sensible al óxido nítrico que en controles sanos. Nuestra hipótesis fue que en la diabetes mellitus hay un deterioro progresivo en el balance de los factores vasorelajantes y vasoconstrictores producidos por el endotelio. Esto contribuiría al desarrollo de la hipertensión arterial, cuya incidencia es más elevada en la diabetes mellitus que en la población no diabética. Empleamos un modelo experimental normotensivo de diabetes mellitus, inducido por estreptozotocina en ratas Wistar hembras, de 1 y 2 semanas de duración. Se valoró si la inhibición de la síntesis de óxido nítrico inducida por la administración de dosis iguales del NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (1 mg/kg IV) provoca cambios similares en la presión arterial de ratas diabéticas y controles. Las ratas diabéticas de 1 y 2 semanas mostraron un aumento de la presión arterial diastólica mayor por efecto de la L-NAME (1 semana: 66 ± 4 mmHg a 84 ± 3 mmHg a los 60 minutos y 104 ± 5 mmHg a los 90 minutos; $n = 7$; 2 semanas: $69 \pm 3,5$ mmHg a 105 ± 5 mmHg, a los 60 minutos y $107 \pm 4,2$ mmHg a los 90 minutos; $n = 7$) que los controles (64 ± 3 mmHg a 77 ± 4 mmHg a los 60 minutos y $82 \pm 3,5$ mmHg a los 90 minutos; $n = 10$). El incremento de la presión arterial diastólica a los 60 minutos de la inyección de L-NAME fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en las ratas con diabetes mellitus de 2 semanas de duración que en las de 1 semana. Estos resultados nos permiten postular que en la diabetes mellitus hay un desequilibrio en la producción de factores moduladores del tono vascular por el endotelio que al parecer tiende a aumentar con la duración de la enfermedad y podría tener un papel en la etiopatogenia de la hipertensión arterial.

En la década pasada se hallaron abundantes evidencias de que en el endotelio se forman sustancias autocrinas y paracrinas que modifican el tono del músculo liso vascular.¹⁻¹² En 1980, Furchgott y Zawadzki descubren un factor de relajación derivado del endotelio (FRDE) generado en respuesta a la acetilcolina,¹ lo que abrió un nuevo campo de investigación sobre los factores vasoactivos sintetizados por el endotelio. Estos autores comprobaron que la acetilcolina produce vasodilatación *in vivo*, pero también es capaz de provocar vasoconstricción *in vitro*. Demostraron así que la acetilcolina produce relajación del músculo liso vascular si las células endoteliales están indemnes, pero con-

tracción si se remueve el endotelio. En 1987 Palmer y colaboradores⁸ comprobaron que el FRDE podría ser idéntico al óxido nítrico (ON) o a un compuesto nitroso lábil y que su síntesis se produce a partir del aminoácido L-arginina por acción de la arginino-oxidasa, enzima dependiente del NADPH y del Ca^{2+} .¹⁰ Hoy se reconoce que el ON se libera en respuesta a una amplia variedad de estímulos mecánicos y por efecto de autacoides o de hormonas.^{6,13-24} En las arterias con endotelio normal, las catecolaminas, la arginina-vasopresina, la histamina, la bradiquinina, la serotonina, el ADP y la trombina se acoplan a receptores específicos e inducen la liberación de ON.¹⁶

El ON es una molécula muy difusible, cuya vida media es de pocos segundos^{2,3} y actúa por medio de la activación de la guanilatociclasa soluble del citosol en diversas células y tejidos (músculo liso, macrófagos, epitelio renal y respiratorio, células adrenales, células gástricas y neuronas cerebelosas).⁴⁻⁶ Su efecto es producir un aumento en la concentración intracelular del 3',5'-monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). Se ha demostrado que el ON inhibe la agregación y adhesividad plaquetarias.^{6,25,26} Existe un efecto sinérgico de la PGI₂ y el ON en la inhibición de la agregación plaquetaria.²⁵ En los riñones, la activación de la síntesis de ON se asocia con un aumento del flujo sanguíneo, de la diuresis y la natriuresis, sin cambios en el filtrado glomerular.²⁷

Los efectos del ON son inhibidos por el azul de metileno.²⁸ El ON es inactivado por radicales superóxidos²⁰ y por la hemoglobina.^{17,28} La NG-monometil-L-arginina (L-NMMA) compite con el precursor del ON por la enzima específica, inhibiendo la generación del ON por el endotelio. La administración intravenosa de L-NMMA a conejos produce una hipertensión arterial dosis-dependiente.^{10,16,29} En las ratas, la L-NMMA inhibe la hipotensión y la vasodilatación renal inducidas por la acetilcolina.^{29,30}

La síntesis del ON está reducida en la hipertensión arterial,³¹⁻³⁵ en la aterosclerosis,³⁶⁻⁴⁰ en la vejez,⁴⁰⁻⁴² en la diabetes mellitus,⁴³⁻⁴⁷ en la lesión vascular por reperfusión^{48,49} y en el tratamiento crónico con ciclosporina.⁵⁰ La hipertensión arterial tiene mayor prevalencia en los sujetos con diabetes mellitus que en la población no diabética.^{51,52} Los pacientes diabéticos sufren de aterosclerosis y sus complicaciones con más frecuencia y precocidad que los no diabéticos.⁵³⁻⁵⁵ La disfunción del endotelio puede tener un papel importante en la patogenia de la angiopatía diabética.^{16,43-47}

El objetivo del presente estudio es establecer si la inhibición de la síntesis de ON provocada por la administración de dosis iguales del análogo de la L-arginina, el NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), produce cambios de similar magnitud en la presión arterial en ratas diabéticas y controles.

MATERIAL Y METODO

Se emplearon ratas Wistar hembras con un peso entre 200-250 g. Los animales fueron divididos en dos grupos: el grupo I incluyó 10 ratas normales; el grupo II consistió en 14 ratas en las que se indujo diabetes mellitus por la administración de una dosis única de estreptozotocina

(ETZ) (60 mg/kg, intraperitoneal). Bajo anestesia con etiluretano al 10% se canuló la vena yugular (para la administración de L-NAME) y la arteria ventral de la cola para la determinación directa de la presión arterial que se registró en un fisiógrafo. Los animales fueron alojados en jaulas metabólicas mantenidas a una temperatura entre 22 y 24°C, en una habitación con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas (luz desde las 7 a las 19 hs.), con libre acceso a comida y agua. Se recolectó la orina de 24 horas para medir diuresis y proteinuria⁵⁶ y se recogieron muestras de sangre para dosar la glucemia (por el método de la glucosa-oxidasa después de 8 horas de ayuno) a las 72 horas, al final de la primera y de la segunda semanas de la administración de ETZ, controlándose en dichos períodos el peso corporal.

La L-NAME se administró en dosis de 1 mg/kg por vía intravenosa, en bolo (en 10 minutos). Se determinó la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) a los 60 y 90 minutos de la inyección de L-NAME. En 7 ratas diabéticas, la inyección se efectuó al término de la primera semana y en las otras 7 al finalizar la segunda.

ESTUDIO ESTADISTICO

Los resultados se expresan como media \pm ES. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de "t" de Student para datos no pareados y pareados, y la prueba no paramétrica de Wilcoxon. Se consideraron significativos los valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

En la tabla 1 se hallan los valores de peso corporal, glucemia, diuresis y proteinuria de ratas controles y diabéticas de 1 y 2 semanas. En ambos grupos de ratas diabéticas el peso corporal disminuyó significativamente ($p < 0,001$), con aumento de la glucemia ($p < 0,001$), diuresis ($p < 0,001$) y proteinuria ($p < 0,01$).

En la figura 1 se observan los niveles de PAS basal en ratas controles y diabéticas (de 1 y 2 semanas) y a los 60 y 90 minutos de la inyección intravenosa de L-NAME. En los animales controles la PAS basal de 127 ± 3 mmHg aumentó a 144 ± 6 mmHg (13%) y a 140 ± 6 mmHg (10%) a los 60 y 90 minutos de la administración de L-NAME. En las ratas diabéticas de 1 semana, la PAS basal fue significativamente más alta que en los controles y en las ratas diabéticas de 2 semanas (en ambos casos, $p < 0,05$). La PAS basal en ratas diabéticas de 1 semana de 142 ± 7 mmHg aumentó a los 60 minutos de la inyección de L-NAME a 185 ± 9 mmHg (30%)

y a los 90 minutos a 178 ± 5 mmHg (25%). En las ratas diabéticas de 2 semanas, la PAS basal fue de 127 ± 7 mmHg; a los 60 minutos de la inyección de L-NAME la PAS aumentó a 135 ± 3 mmHg (6%) y a los 90 minutos fue de 155 ± 6 mmHg (22%).

En la figura 2 se aprecian los niveles correspondientes de PAD. No hubo diferencias significativas en los niveles basales de la PAD entre las ratas controles y las diabéticas de 1 y 2 semanas. En los animales controles, la PAD basal se incrementó de 64 ± 3 mmHg a 77 ± 4 mmHg (21%) y a $82 \pm 3,5$ mmHg (28%) 60 y 90 minutos después de la administración de L-NAME. En las ratas diabéticas de 1 semana, la PAD basal fue de 66 ± 4 mmHg, aumentando a 84 ± 3 mmHg (28%) a los 60 minutos y a 104 ± 5 mmHg (57%) a los 90 minutos de la administración de L-NAME. En las ratas diabéticas de 2 semanas, la PAD basal fue de $69 \pm 3,5$ mmHg y se elevó a 105 ± 5 mmHg (53%) y a $107 \pm 4,2$ mmHg (55%) a los 60 y 90 minutos, respectivamente, de la administración de L-NAME. El incremento de la PAD observado a los 60 minutos fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en las ratas diabéticas de 2 semanas que en las de 1 semana.

DISCUSION

Los estudios efectuados hasta el presente sugieren con firmeza que el FRDE/ON es un vasodilatador endógeno importante, que participa en

Tabla 1
Cambios en el peso corporal, glucemia, diuresis y proteinuria

	Controles	Diabéticas, 1 semana	Diabéticas, 2 semanas
Peso corporal (g)	292 ± 5	$239 \pm 8^*$	$214 \pm 9^*$
Glucemia (mg/dl)	$95,3 \pm 5$	$335 \pm 20^*$	$350 \pm 16^*$
Diuresis (ml/min)	$4,33 \pm 0,41$	$13,5 \pm 1,49^*$	$12,3 \pm 0,73^*$
Proteinuria (mg/24 horas)	$8,83 \pm 1,26$	$25 \pm 5,6^{**}$	$30,8 \pm 2,67^{**}$

* $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

la modulación del tono vascular basal. Se ha comprobado en animales de experimentación y en seres humanos que en la diabetes mellitus hay una falla en las respuestas vasculares frente a los agonistas de la relajación endotelio-dependiente.^{43-47, 57-59} Tesfamariam y colaboradores^{44,45} comprobaron que la relajación vascular endotelio-dependiente en conejos diabéticos fue menor que en los controles. Calver y colaboradores⁵⁷ analizaron la respuesta vasodilatadora mediada por el ON en diabéticos insulino-dependientes en comparación con la observada en controles sanos. Comprobaron que la noradrenalina y la L-NMMA provocaron reducciones de similar magnitud en el flujo sanguíneo del antebrazo en los individuos sanos. Sin embargo, en los diabéticos la L-NMMA fue significativamente menos efectiva que la noradrenalina. La respuesta a la

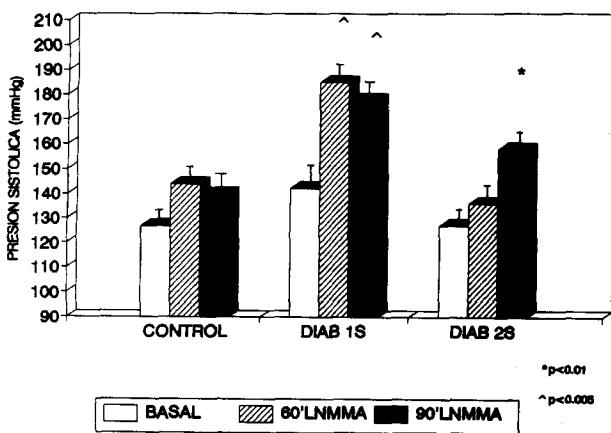


Fig. 1. Gráfico en barras que muestra la presión arterial sistólica (PAS) en ratas controles, diabéticas de 1 semana (DIAB 1S) y diabéticas de 2 semanas (DIAB 2S): antes y a los 60 y 90 minutos de la inyección intravenosa de L-NAME. Los valores son media \pm ES. * $p < 0,01$; $\wedge p < 0,005$, en comparación con las condiciones basales. □ basal; ▨ 60 minutos después de la inyección de L-NAME; ■ 90 minutos después de la inyección de L-NAME.

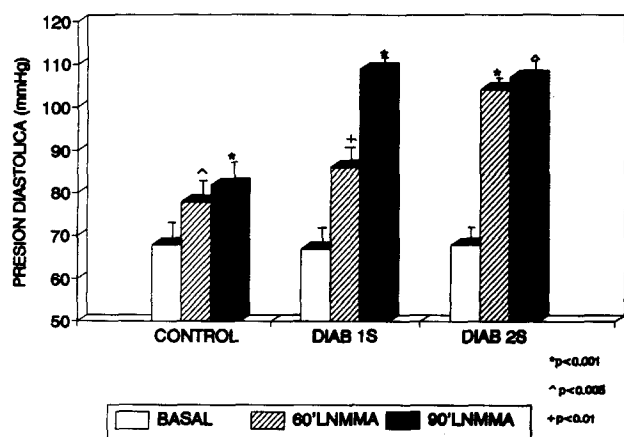


Fig. 2. Gráfico en barras que muestra la presión arterial diastólica (PAD) en ratas controles, diabéticas de 1 semana (DIAB 1S) y diabéticas de 2 semanas (DIAB 2S): antes y a los 60 y 90 minutos de la inyección de L-NAME. Los valores son media \pm ES. + $p < 0,01$; $\wedge p < 0,005$; * $p < 0,01$, en comparación con las respectivas condiciones basales. □ basal; ▨ 60 minutos después de la inyección de L-NAME; ■ 90 minutos después de la inyección de L-NAME.

L-NMMA y al nitroprusiato también fue significativamente menor en los diabéticos que en los controles sanos. Estos autores concluyeron que el músculo liso vascular de los diabéticos es menos sensible al efecto del ON que el de las personas sanas. Kamata y colaboradores⁵⁸ observaron una reducción de la respuesta a la acetilcolina en preparados *in vitro* de aorta de ratas diabéticas. Gupta y colaboradores⁵⁹ comprobaron en la aorta de conejos con hiperglucemia una disminución de la actividad de la ATPasa $\text{Na}^+ - \text{K}^+$, la cual es revertida totalmente por el agregado de L-arginina al medio. Dichos autores sostuvieron que las alteraciones en la liberación basal de ON contribuyen a la falla en la relajación vascular causada por la hiperglucemia y la diabetes.

En ratas con hiperglucemia se observó un aumento en la actividad de la proteína cinasa C en el músculo liso arteriolar, que puede contribuir a los cambios funcionales y de la arquitectura vascular que se observan en la diabetes mellitus.⁶⁰ El incremento en la actividad de la proteína cinasa C se ha asociado con neovascularización, alteraciones en la síntesis del colágeno y de la modulación del reciclaje hormonal y de los receptores de los factores de crecimiento.⁶⁰ De esa forma, en la diabetes mellitus las alteraciones en el tono vascular y los cambios en la estructura arterial pueden ser parte de un círculo vicioso que se perpetúa y en el cual la lesión endotelial tiene un papel fundamental. Por otra parte, se ha demostrado en los pacientes con diabetes mellitus no insulino dependiente⁶⁰ una regulación deficiente de la liberación de insulina por efecto de la arginina. Sobre la base de estos hallazgos, se ha postulado que la diabetes podría representar la expresión de un defecto en la vía oxidativa de la L-arginina.

El presente estudio aporta evidencias sobre la importancia que tienen las alteraciones en la síntesis del ON en los trastornos de la modulación de la presión arterial que se observan en la diabetes mellitus experimental. Nuestra hipótesis fue que en la diabetes mellitus existe un deterioro progresivo de la relación de los factores moduladores del tono vascular producidos por el endotelio, lo que contribuiría a explicar la mayor incidencia de hipertensión arterial. Empleamos un modelo experimental normotensivo de diabetes mellitus como es el inducido por la ETZ.^{61, 62} En nuestra investigación, frente a dosis equimolares de L-NAME el aumento observado de la presión arterial (tanto de la PAS como de la PAD) fue significativamente mayor en las ratas diabéticas de 1 semana que

en los controles. Esta respuesta anormal al inhibidor de la síntesis de ON pone en evidencia el trastorno en el equilibrio de los factores vasorrelajantes y vasoconstrictores producido en el endotelio de ratas diabéticas. Más aún, la comprobación de un incremento mayor de la PAD en las ratas diabéticas de 2 semanas con relación al observado en los animales con diabetes de 1 semana a los 60 minutos de la inyección de L-NAME, permite sugerir que ese desequilibrio entre los factores moduladores del tono vascular sintetizados por el endotelio es progresivo. Se ha comprobado *in vitro* que el ON derivado del endotelio inhibe la liberación basal y estimulada del péptido endotelina, que posee intensa actividad vasoconstrictora.⁶³ A su vez, en dosis bajas la endotelina induce liberación de FRDE o de prostaciclina por las células endoteliales⁶⁴ y por lo tanto promueve vasodilatación.

De los resultados del presente estudio se puede postular, como conclusión, que en la etiopatogenia de la hipertensión arterial en la diabetes mellitus desempeña un papel importante la instalación de un desequilibrio de carácter progresivo entre los factores moduladores del tono vascular derivados del endotelio.

SUMMARY

Endothelium-derived relaxing factor is probably identical to nitric oxide and is released by the vascular endothelium both in the basal unstimulated state and in response to a large number of agonists, as well as the mechanical stimulus of shear stress. Previous studies strongly suggest that endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide is an important endogenous vasodilator that participates in modulation of basal vascular tone. Recent investigations have shown that in diabetes mellitus vascular responses to agonists of endothelium-dependent relaxations are impaired. Our hypothesis was that in diabetes mellitus there is a progressive deterioration in the endothelium-derived relaxing and contracting factors balance. We use a normotensive rat model of diabetes mellitus induced by streptozocin (STZ: 60 mg/kg i.p.). We evaluated pressor effects of intravenous injection of nitric oxide synthesis inhibitor, NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 1 mg/kg) in rats with 1 week or 2 weeks of diabetes and in control rats. Diabetic rats had a significantly greater diastolic blood pressure increase to L-NAME (1 week diabetic rats: 66 ± 4 mmHg to 84 ± 3 mmHg, at 60 minutes, and 104 ± 5 mmHg at 90 minutes; $n = 7$; 2 weeks diabetic rats: 69 ± 3.5 mmHg to 105 ± 5 at 60 minutes, and 107 ± 4.2 mmHg at 90 minutes; $n = 7$) than control rats (64 ± 3 mmHg to 77 ± 4 mmHg at 60 minutes, and 82 ± 3.5 mmHg at 90 minutes; $n = 10$). The increase of

diastolic arterial pressure at 60 minutes after L-NAME injection was significantly greater in 2 weeks diabetic rats than in 1 week diabetic rats ($p < 0.05$). These data suggest that in diabetes mellitus there is an imbalance in favor of endothelium-mediated contraction of the vascular smooth muscle that apparently increase with the duration of the disease.

BIBLIOGRAFIA

- Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature (Lond)* 1980; 299: 373-376.
- Griffith TM, Edwards DH, Lewis MJ, Newby AC, Henderson AH: The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. *Nature* 1984; 306: 645-647.
- Rubanyi GM, Lorenz RR, Vanhoutte PM: Bioassay of endothelium-derived relaxing factor (s): Inactivation by catecholamines. *Am J Physiol* 1985; 249: H95-H101.
- Holzmann S: Endothelium-induced relaxation by acetylcholine associated with larger rises in cGMP in coronary arterial strips. *J Cyclic Nucleotide Res* 1982; 8: 409-419.
- Ignarro LJ, Burke TM, Wood KS, Wolin MS, Kadowitz PJ: Association between cyclic GMP accumulation and acetylcholine-elicited relaxation of bovine intrapulmonary artery. *J Pharmacol Exp Ther* 1984; 228: 682-690.
- Rapoport RM, Murad F: Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res* 1983; 52: 352-357.
- Ignarro LJ, Byrns R, Wood KS: Pharmacological and biochemical properties of EDRF is closely related to nitric oxide radical (abstract). *Circ Res* 1986; 74 (Suppl II): II-287.
- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature (Lond)* 1987; 327: 524-526.
- Ignarro LJ, Byrns R, Buga GM, Wood KS, Chaudhuri G: Pharmacologic evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: Use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; 244: 181-189.
- Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature (Lond)* 1988; 333: 664-666.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332: 411-415.
- Yanagisawa M, Masaki T: Molecular biology and biochemistry of the endothelins. *Trends Pharmacol Sci* 1989; 10: 374-379.
- Holtz J, Fostermann U, Pohl U, Giesler M, Bassenge E: Flow-dependent, endothelium-mediated dilatation of epicardial coronary arteries in conscious dogs: Effects of cyclooxygenase inhibition. *J Cardiovasc Pharmacol* 1984; 6: 1161-1169.
- Pohl V, Busse R, Kuan E, Bassenge E: Pulsatile perfusion stimulates the release of endothelial autacoids. *J Appl Cardiol* 1986; 1: 215-235.
- Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM: Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986; 250: H1145-H1149.
- Shepherd JT, Katusic Z: Endothelium-derived vasoactive factors. I: Endothelium-dependent relaxation. *Hypertension* 1991; 18 (Suppl III): 76-85.
- Marshall JJ, Kontos HA: Endothelium-derived relaxing factors. A perspective from in vivo data. *Hypertension* 1990; 16: 371-386.
- Yang Z, Diederich D, Siebenmann R: Endothelium-derived relaxing factor and protection against contraction induced by histamine and serotonin in human internal mammary artery and the saphenous vein. *Circulation* 1989; 9: 157-163.
- Kontos HA, Wei EP, Marshall JJ: In vivo bioassay of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1988; 255: H1259-H1262.
- Gryglewski RJ, Palmer RMJ, Moncada S: Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986; 320: 454-456.
- Malinski T, Taha Z, Wu Y, Mc Clain S, Bohr DF: Nitric oxide (NO) release from endothelial and vascular smooth muscle cells and macrophages is reduced in genetic hypertension (abstract). *Am J Hypertens* 1993; 6: 77 A.
- Malinski T, Taha Z: Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor. *Nature* 1992; 358: 676-678.
- Ignarro LJ, Byrns RE, Wood KS: Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity to nitric oxide radical. In Vanhoutte PM (ed): Vasodilatation: Vascular smooth muscle, peptides, autonomic nerves and endothelium. Raven Press Publishers, New York, 1988; pp 427-435.
- Collins P, Griffith TM, Henderson AH, Lewis MJ: Endothelium-derived relaxing factor alters calcium fluxes in rabbit aorta: A cyclic guanosine monophosphate-mediated effect. *J Physiol (Lond)* 1986; 381: 427-437.
- Radowski MW, Palmer RMJ, Moncada S: The antiaggregation properties of vascular endothelium: Interaction between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1987; 92: 639-646.
- Azuma H, Ishikawa M, Sekizaki S: Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation. *Br J Pharmacol* 1986; 88: 411-415.
- Lüscher TF, Bock HA: The endothelial L-arginine/nitric oxide pathway and the renal circulation. *Klin-Wochenschr* 1991; 69: 603-609.
- Martin W, Villani GM, Jothianandan D, Furchgott RF: Selective blockade of endothelium-dependent and glycerol trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 1984; 232: 708-716.
- Rees DD, Palmer RMJ, Moncada S: Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 3375-3378.
- Tolins JP, Palmer RMJ, Moncada S, Raji L: Role of endothelium-derived relaxing factor in regulation of renal hemodynamic responses. *Am J Physiol* 1990; 258: H655-H662.
- Lüscher TF, Raji L, Vanhoutte PM: Endothelium-dependent vascular responses in normotensive and hypertensive Dahl rats. *Hypertension* 1987; 9: 157-163.
- Lockette WG, Othshua Y, Carretero OA: Endothelium-dependent relaxation in hypertension. *Hypertension* 1986; 9 (Suppl II): L61-L66.
- Jameson M, Lüscher TF, Skopec J, Diederich A, Diederich D: Impaired endothelium-dependent relaxation in mesenteric resistance arteries of prehypertensive SHR rats (abstract). *Kidney Int* 1990; 37: 387.
- Boegehold MA: Reduced influence of nitric oxide on arteriolar tone in hypertensive Dahl rats. *Hypertension* 1992; 19: 290-295.
- King AJ, Mercer P, Troy JL, Brenner BM: Endothelium-derived relaxing factor and the vascular reply to systemic hypertension. *J Am Soc Nephrol* 1991; 2: 1072-1077.
- Ross R, Harker L: Hyperlipidemia and atherosclerosis: Chronic hyperlipidemia initiates and maintains lesions by endothelial cell desquamation and lipid accumulation. *Science* 1976; 193: 1094-1100.
- Andrews HE, Bruckdorfer KR, Dunn RC, Jacobs M: Low-density lipoproteins inhibit endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta. *Nature* 1987; 327: 237-239.
- Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis-an update. *N Engl J Med* 1986; 314: 711-718.
- Bossaller C, Habib GB, Yamamoto H, Williams C, Wells S, Henry PD: Impaired muscarinic endothelium-dependent

- relaxation and cyclic guanosine 5'-monophosphate formation in atherosclerotic human coronary artery and rabbit aorta. *J Clin Invest* 1987; 79: 170-174.
40. Lüscher TF, Dohi Y, Tanner FC, Boulanger: Endothelium-dependent control of vascular tone: effects of age, hypertension and lipids. *Basic Res Cardiol* 1991; 86 (Suppl 2): 143-158.
 41. Koga T, Takata Y, Kobayashi K, Taskishita S, Yamashita Y, Fujishima M: Age and hypertension promote endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the rat. *Hypertension* 1989; 14: 542-548.
 42. Dohi Y, Thiel MA, Bühler FR, Lüscher TF: Activation of endothelial L-arginine pathway in resistance arteries: Effect of age and hypertension. *Hypertension* 1990; 15: 170-179.
 43. Meraji S, Jayakody L, Senaratne MPJ, Thompson ABR, Kappagoda T: Endothelium-dependent relaxation in aorta of BB rat. *Diabetes* 1987; 36: 978-981.
 44. Tesfamariam B, Jakubowski JA, Cohen RA: Contraction of diabetic rat aorta caused by endothelium-derived PGH_2 and TxA_2 . *Am J Physiol* 1989; 257: H1327-H1333.
 45. Tesfamariam B, Brown ML, Deykin D, Cohen RA: Elevated glucose promotes generation of endothelium-derived vasoconstrictor prostanoids in rabbit aorta. *J Clin Invest* 1990; 85: 929-932.
 46. Mayhan WG: Impairment of endothelium-dependent dilation of cerebral arterioles during diabetes mellitus. *Am J Physiol* 1989; 256: H621-H625.
 47. Ceriello A, Giugliano D, Quatraro A, Lefebvre PJ: Antioxidants show an antihypertensive effect in diabetic and hypertensive subjects. *Clin Sci* 1991; 81: 739-742.
 48. Wei EP, Kontos HA: Oxygen radicals in cerebral ischemia (abstract). *Physiologist* 1987; 30: 122.
 49. Mayhan WG, Amundsen SM, Faraci FM, Heistad DD: Responses of cerebral arteries ischemia and reperfusion in cats. *Am J Physiol* 1988; 255: H879-H884.
 50. Kon V, Sugiura M, Inagami T: Role of endothelin in cyclosporine-induced glomerular dysfunction. *Kidney Int* 1990; 37: 1487-1491.
 51. Fuller J, Eldford J, Goldblatt P, Adelstein AM: Diabetes mortality: new light on an underestimated public health problem. *Diabetologia* 1983; 24: 336-341.
 52. Drury P: Diabetes and arterial hypertension. *Diabetologia* 1983; 24: 1-19.
 53. Christlieb AR: The hypertensions of diabetes. *Diabetes Care* 1982; 5: 50-54.
 54. Jarret RJ, Mc Carthy P, Keen H: The Bedford Survey: ten year mortality rates in newly diagnosed diabetics, borderline diabetics and normoglycaemic controls and risk indices for coronary heart disease in borderline diabetics. *Diabetologia* 1982; 22: 78-84.
 55. Feldstein CA, Arpa A: La hipertensión arterial como factor de riesgo en las complicaciones cardiovasculares de la diabetes mellitus. *Rev Clin Esp* 1992; 190: 243-248.
 56. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 267-275.
 57. Calver A, Collier J, Vallance P: Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 1992; 90 (6): 2548-2554.
 58. Kamata K, Miyata N, Kasuya I: Impairment of endothelium-dependent relaxation and changes in levels of cGMP in aorta from STZ-induced diabetic rats. *Br J Pharmacol* 1989; 97: 614-618.
 59. Gupta S, Sussman I, Mc Arthur CS, Tornheim K, Cohen RA, Ruderman NB: Endothelium-dependent inhibition of Na^+/K^+ ATPase activity in rabbit aorta by hyperglycemia. Possible role of endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest* 1992; 90 (3): 727-732.
 60. Lee TS, Saltsman KA, Ohashi H, King GL: Activation of protein kinase C by elevation of glucose concentration: Proposal for mechanism in the development of diabetic vascular complications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 5141-5145.
 61. Kusaka M, Kishi K, Sokabe H: Does so-called streptozocin hypertension exist in rats? *Hypertension* 1987; 10: 517-521.
 62. Todd ME, Song MY, Mc Neill JH: Coexistence of diabetes and hypertension results in unique structural alterations in the renal artery in rats beyond that found with diabetes alone. *Diabetes Res Clin Pract* 1993; 19 (2): 115-126.
 63. Boulanger C, Luscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest* 1990; 85: 587-590.
 64. De Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P: Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 83: 9797-9800.