

III. TRATAMIENTO DE LA INSUFICIENCIA RENAL EN EL ANCIANO

Relación entre control metabólico y disfunción endotelial en ratas diabéticas

C. F. Sánchez-Ferrer, J. Angulo, S. Vallejo*, C. Peiró, J. L. Llergo, A. Sánchez-Ferrer*, E. Cercas y L. Rodríguez-Mañas*

Departamento de Farmacología y Terapéutica. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. *Unidad de Investigación y Servicio de Geriátría. Hospital Universitario de Getafe. Madrid. Spain.

RESUMEN

Este trabajo se diseñó para analizar in vivo la influencia del control metabólico, medida por los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}), sobre la disfunción endotelial vascular en ratas diabéticas por estreptozotocina. Para ello, se estudiaron las respuestas vasoactivas de origen endotelial causadas por acetilcolina mediante la técnica de la rata anestesiada autoperfundida. Se utilizaron ratas no diabéticas como controles y cuatro grupos de ratas diabéticas con valores de HbA_{1c} de 5,5 a 7,4%, de 7,5 a 9,4%, de 9,5 a 12% y mayor del 12%, respectivamente. Administrada sobre un tono previo de noradrenalina, acetilcolina (0,25, 0,75, 2,5, 7,5 and 25 µg/kg) indujo en todos los grupos respuestas vasodilatadoras dosis-dependientes, que fueron similares en el las ratas no diabéticas y en las diabéticas con un buen control metabólico (HbA_{1c} de 5,5 a 7,4%), mientras que en ratas diabéticas con niveles de HbA_{1c} mayores de 7,5% se observó una menor respuesta vasodilatadora a acetilcolina. En ratas diabéticas sin tratamiento (HbA_{1c} > 12%), la relajación inducida por el donante de óxido nítrico nitroprusiato sódico fue asimismo menor. Nuestros resultados indican que la disfunción endotelial diabética está estrechamente relacionada con el control metabólico de la enfermedad. Es posible incluso establecer un umbral, a partir del cual se desarrolla deterioro endotelial, en porcentajes de HbA_{1c} superiores al 7,5%.

Palabras clave: **Diabetes. Disfunción endotelial. Control metabólico. Oxido nítrico. Arginina. Aniones superóxidos.**

METABOLIC CONTROL AND ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN DIABETIC RATS

SUMMARY

This work was designed to determine in vivo the influence of the metabolic control of streptozotocin-induced diabetic rats, measured by the levels of hemoglobin glycosylation in blood (HbA_{1c}), in developing vascular endothelial dysfunction. For this, the endothelium-derived vasoactive responses were studied using the technique of the anaesthetized autoperfused rat, analyzing the respon-

Correspondencia: Dr. Carlos F. Sánchez-Ferrer
Departamento de Farmacología y Terapéutica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid
Arzobispo Morcillo, 4
28029 Madrid

ses to acetylcholine in non-diabetic and diabetic rats with different degree of metabolic control (four groups with HbA_{1c} levels of 5.5-7.4%, 7.5-9.4%, 9.5-12%, and >12%, respectively). When administered over a noradrenaline-induced vasoconstrictor tone, acetylcholine (0.25, 0.75, 2.5, 7.5 and 25 µg/kg) induced in all rat groups dose-dependent vasodilatory responses, both reducing mean arterial pressure and perfusion pressure of the left hindlimb. These responses were similar in non-diabetic and in diabetic rats with good metabolic control (HbA_{1c} of 5.5-7.4%), while diabetic rats with levels of HbA_{1c} higher than 7.5% showed significantly lower vasodilatory responses to acetylcholine. In untreated diabetic rats, the relaxant responses evoked by the nitric oxide donor sodium nitroprusside were analogously impaired. The results indicate that the endothelial dysfunction associated to diabetes is closely related to the level of metabolic control of the disease. Therefore, it is possible to establish a threshold for developing endothelium impairment from percentages of HbA_{1c} higher than 7.5%.

Key words: Diabetes. Endothelial dysfunction. Metabolic control. Nitric oxide. Arginine. Superoxide anions.

INTRODUCCION

El deterioro de la relajación vascular mediada por el endotelio está descrito en pacientes diabéticos^{1,2} y en modelos experimentales de esta enfermedad^{3,4}. Algunos estudios en humanos indican la posibilidad de una relación entre el control metabólico de la enfermedad y la aparición de vasculopatía diabética^{5,6}. En este sentido, se ha sugerido en modelos animales de diabetes la existencia de un nexo de unión entre control metabólico y función endotelial⁷, aunque este aspecto no ha sido específicamente abordado por ningún estudio.

Con estas premisas, el objeto del presente trabajo ha sido determinar *in vivo* la influencia del control metabólico, medido por los niveles sanguíneos de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}), en el desarrollo de la disfunción vascular diabética producida en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina. Para ello, mediante la técnica de la rata anestesiada autoperfundida, se estudiaron las respuestas vasoactivas de origen endotelial inducidas por acetilcolina (ACh) en rata diabéticas con distintos grados de control metabólico.

METODOS

Modelo experimental

Diabetes insulino-dependiente fue inducida en ratas Sprague-Dawley de 16 semanas de vida (400 a 450 g) mediante una única administración de estreptozotocina (60 mg kg⁻¹; i. p.). Tras una espera de 72 horas, se tomaron muestras de sangre en la cola de los animales y se midió la glucemia con un glucómetro Accutrend (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania).

La inducción de la diabetes se consideró un éxito cuando en estas condiciones la glucemia fue mayor de 200 mg dl⁻¹. Un grupo de animales fue inyectado con solución salina en las mismas condiciones para su utilización como grupo control.

Los animales fueron separados en cinco grupos diferentes, uno control (no diabéticas) y cuatro de ratas diabéticas, clasificados de acuerdo a su control metabólico (es decir, con distintos niveles de HbA_{1c}: 5,5 a 7,4%; 7,5 a 9,4%; 9,5 a 12% y >12%). Para obtener este amplio rango en el porcentaje de HbA_{1c}, un grupo de ratas diabéticas no recibió tratamiento alguno, mientras que en los otros tres se administraron diferentes cantidades de insulina mediante implantes subcutáneos de insulina bovina. Los implantes contenían ácido palmítico como excipiente y se introducían sin suturas bajo la piel dorsal de las ratas, ligeramente anestesiadas con ketamina (30 mg kg⁻¹). Los cálculos para la dosis se hicieron siguiendo las instrucciones del fabricante, que indica que la liberación de insulina es constante y proporcional, independientemente de que se administre más de un implante o una fracción del mismo. Los implantes tienen 7 mm de longitud y secretan 2 U de insulina por día, por lo que un implante fraccionado liberará una cantidad proporcional (1 mm de implante libera 0,286 U por día). Así pues, la cantidad media de insulina recibida por los distintos grupos de animales se calculó según el número de implantes o fracciones de implante administrados. La cantidad de insulina recibida por cada grupo siguiendo este proceso fue de 8,3 ± 0,3, 6,0 ± 0,7 y 4,2 ± 0,5 U kg⁻¹ día⁻¹ en los grupos con niveles de HbA_{1c} de 5,5 a 7,4%, 7,5 a 9,4% y 9,5 a 12%, respectivamente. Las ratas no diabéticas y las diabéticas sin tratar (HbA_{1c} >12%) recibieron implantes controles de ácido palmítico. Los experimentos

se realizaron ocho semanas tras la inducción de la diabetes, de acuerdo a lo previamente publicado⁷. En ese momento se midió la glucemia y los niveles de HbA_{1c}. La HbA_{1c} se midió por inmunturbidimetría⁸.

Efectos de los fármacos en ratas anestesiadas autoperfundidas

En estos experimentos se utilizó una modificación de la técnica descrita por Medgett⁹. La diferencia principal fue que no se usaron ratas desmeduladas sino que los animales fueron anestesiados durante todo el experimento. Las ratas se anestesiaron con 40 mg kg⁻¹ de ketamina, 3,2 mg kg⁻¹ de diazepam y 0,16 mg kg⁻¹ de atropina (i.p.), con dosis suplementarias cuando fue preciso. Los animales recibieron ventilación mecánica con un respirador (New England Medical Instruments, Medway, Mass, USA) y su temperatura se mantuvo a 37° C con una mesa térmica (Cibertec RTC1, Madrid, España). Se canularon ambas carótidas y la presión arterial sistémica y la frecuencia cardíaca se registraron a partir de la carótida derecha mediante un transductor de presión (Spectramed P23XL, Oxnard, CA, USA), conectado a un polígrafo (Grass 7D, Quincy, Mass, USA). La circulación del miembro trasero izquierdo se perfundió de modo constante con 3,3 ml min⁻¹ kg⁻¹ de sangre tomada de la carótida izquierda e infundida por una cánula situada en la arteria femoral izquierda. La presión de perfusión del miembro trasero se registró con un transductor de presión situado en el circuito de forma distal a la bomba peristáltica (Gilson Minipuls 2, Villiers-le-Bel, Francia) utilizada para la perfusión. El volumen extracorpóreo fue de 1,1 ml, relleno con solución Krebs-Henseleit (KH) conteniendo heparina sódica (0,5 mg ml⁻¹). La preparación se estabilizó tras perfundirse durante 30 min.

Para estudiar las respuestas vasodilatadoras, se indujo un tono vasopresor infundiendo continuamente noradrenalina (2 µg min⁻¹ kg⁻¹) con una bomba (Harvard Apparatus, Millis, Mass, USA) por la arteria femoral izquierda. Cuando tanto la presión arterial media como la presión de perfusión en el miembro trasero izquierdo alcanzaron un tono estable, se administraron dosis sucesivamente mayores de ACh (0,25, 0,75, 2,5, 7,5 y 25 µg kg⁻¹). Cada dosis de ACh se disolvió en 0,2 ml de KH y se infundió de una embolada en la arteria femoral izquierda, de forma no acumulativa, es decir, la respuesta producida por cada dosis se obtuvo desde el tono vasopresor basal, habiendo desaparecido por completo el efecto de cualquier infusión previa de ACh. En algunos experimentos, se verificó la capacidad vasodilatadora de nitroprusiato sódico (NPS; 3, 10, 30 y 100 µg kg⁻¹) en ratas no diabéticas y en diabéticas sin tratamiento.

Materiales

La composición de la solución KH fue (mM): NaCl 115, CaCl₂ 25, KCl 4,6, KH₂PO₄ 1,2, MgSO₄·7H₂O 1,2, NaHCO₃ 25, glucosa 11,1 y Na₂EDTA 0,03. Los fármacos utilizados fueron hidrocloreuro de noradrenalina, cloruro de acetilcolina, nitroprusiato sódico, sulfato de atropina, hidrocloreuro de ketamina, diazepam (todos ellos de Sigma, St Louis, Mo, USA) y heparina sódica (Laboratorios Leo, Madrid, España). Los implantes controles y de insulina bovina se obtuvieron de Linplant (Scarborough, Ontario, Canadá). Las soluciones madre se realizaron en agua bidestilada, salvo la noradrenalina que se preparó en salino (0,9% NaCl)-ascórbico (0,01%).

Evaluación estadística

Los experimentos se hicieron de forma no pareada, las desviaciones de la media respecto a las curvas a ACh y NPS se analizaron estadísticamente mediante el análisis de la varianza para dos factores. En otros casos, se utilizó la *t* de Student (los valores de la *P* se ajustaron mediante la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples). Se consideró la significancia estadística con una *P* < 0,05.

Aspectos éticos

Este trabajo se hizo de acuerdo a la normativa europea. El estudio se aprobó por el comité de investigación del centro.

RESULTADOS

Características de las ratas diabéticas por inducción con estreptozotocina

Según lo descrito en métodos, se establecieron cinco grupos de animales, uno de ratas controles no diabéticas y cuatro de ratas diabéticas con diferentes grados de control metabólico, de acuerdo a sus niveles de HbA_{1c}. Algunos parámetros de esos grupos están en la tabla 1, incluyendo las características hemodinámicas en condiciones basales, en ausencia de cualquier fármaco. La presión arterial media fue similar en todos los grupos, pero las presiones alcanzadas en el miembro inferior izquierdo, perfundido con un flujo constante, estuvieron elevadas de forma significativa en aquellos grupos de ratas diabéticas con niveles de HbA_{1c} mayores de 7,5%. También se observó en esos grupos un descenso de la frecuencia cardíaca (tabla I).

Respuestas vasoactivas inducidas por ACh y NPS

La administración de noradrenalina (2 µg min⁻¹ kg⁻¹) produjo el aumento tanto de la presión arterial

Tabla I. Parámetros generales de las ratas no diabéticas y de las diabéticas por estreptozotocina divididos en grupos en función de los niveles sanguíneos de HbA_{1c}

	Diabéticas				
	No diabéticas n = 7	HbA _{1c} 5,5-7,4% n = 9	HbA _{1c} 7,5-9,4% n = 8	HbA _{1c} 9,5-12% n = 8	HbA _{1c} > 12% n = 8
Peso, g	466,8 ± 22,3	461,3 ± 17,1	375,3 ± 24,1*	381,4 ± 20,9*	244,6 ± 9,9*
Glucemia, mg dl ⁻¹	158,3 ± 7,6	280,6 ± 24,9*	455,2 ± 32,3*	466,6 ± 20,8*	497,6 ± 20,6*
HbA _{1c} , %	4,03 ± 0,31	6,68 ± 0,20*	8,79 ± 0,08*	10,36 ± 0,20*	13,45 ± 0,25*
Presión arterial media, mm Hg	122,7 ± 5,9	124,0 ± 4,2	128,7 ± 4,8	129,0 ± 2,9	127,5 ± 1,7
Frecuencia cardíaca, latidos min ⁻¹	369,2 ± 12,0	364,4 ± 11,4	317,5 ± 11,8*	317,7 ± 9,9*	307,6 ± 11,4*
Presión basal del miembro inferior izquierdo, mm Hg	80,8 ± 2,8	76,7 ± 5,0	102,1 ± 7,3*	107,0 ± 10,2*	100,5 ± 4,5*

Los resultados representan la media ± error estándar; n es el número de ratas empleadas en las mediciones.
*P < 0,05 frente al valor del grupo de ratas no diabéticas.

media como de la presión de perfusión del miembro inferior izquierdo, siendo las respuestas observadas similares en el grupo control y en los diferentes grupos de ratas diabéticas (tabla II). Sobre esta respuesta vasopresora, la administración de ACh indujo respuestas vasodilatadores dependientes de la dosis, que originaban caídas transitorias de la presión arterial media y de la presión de perfusión del miembro inferior izquierdo en todos los grupos de ratas estudiados. Expresando la máxima relajación en cada caso a 25 µg kg⁻¹ de ACh frente al porcentaje de HbA_{1c} en sangre (fig. 1), se observó que la mayoría de los animales con valores de HbA_{1c} superiores a 7,5% mostraban respuestas a ACh menores que las de animales con valores de HbA_{1c} inferiores a 7,5% (fig. 1). Cuando las ratas se agruparon como se ha descrito previamente,

Tabla II. Aumentos de la presión arterial media y de la presión de perfusión del miembro inferior izquierdo producidos por la administración de noradrenalina (2 µg min⁻¹ Kg⁻²) en ratas no diabéticas y en ratas diabéticas con distintos niveles de HbA_{1c}

	Presión arterial media mmHg	Presión de perfusión del miembro inferior izquierdo, mmHg
No diabéticas; n = 7	116,5 ± 5,5	194,0 ± 12,5
HbA _{1c} 5,5-7,4%; n = 9	121,2 ± 8,1	199,7 ± 12,1
HbA _{1c} 7,5-9,4%; n = 8	112,6 ± 11,1	206,2 ± 8,0
HbA _{1c} 9,5-12%; n = 8	120,7 ± 9,6	199,2 ± 10,4
HbA _{1c} >12%; n = 8	112,8 ± 11,2	208,7 ± 6,2

Los resultados se expresan como media ± error estándar. n es el número de animales empleados en las mediciones.

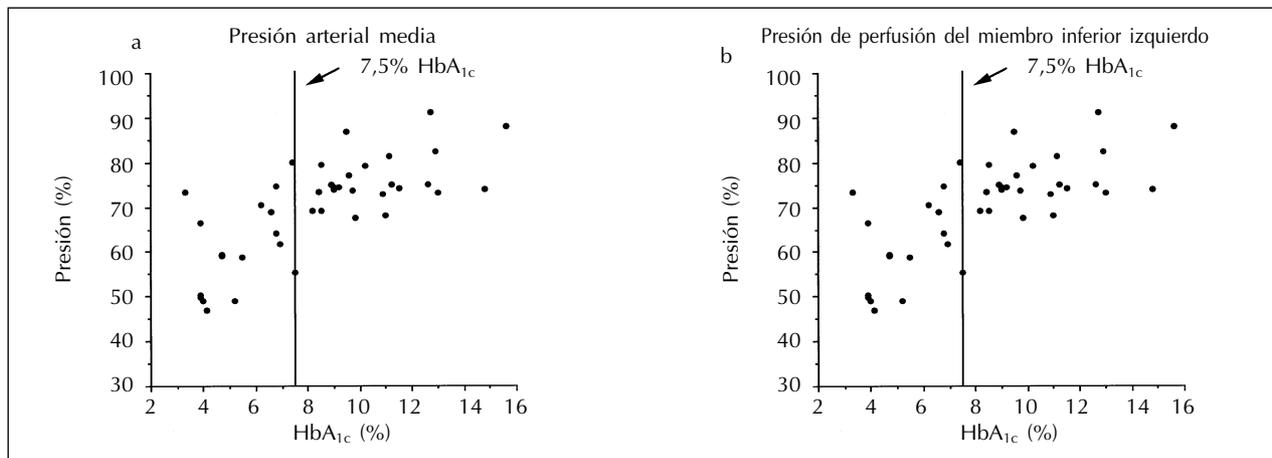


Fig. 1.—Respuestas vasoactivas individuales inducidas por 25 µg kg⁻¹ acetilcolina sobre **a** la presión arterial media y **b** la presión de perfusión del miembro inferior izquierdo perfundido con un flujo constante de 3,3 ml min⁻¹ kg⁻¹ de ratas no diabéticas y en diabéticas por estreptozotocina con diferentes grados de control metabólico, expresado en función de los niveles de HbA_{1c}. Los datos se representan como porcentaje de la presión previa alcanzada por una infusión de noradrenalina.

observamos que la vasodilatación a ACh fue similar en animales no diabéticos y en aquellos diabéticos con mejor control metabólico (niveles de HbA_{1c} de 5,5-7,4%). Por el contrario, en aquellas ratas con niveles de HbA_{1c} de 7,5-9,4%, 9,5-12%, or > 12%, las respuestas producidas por ACh tanto sobre la presión arterial media como sobre la presión de perfusión en el miembro inferior izquierdo se redujeron de forma significativa y creciente (fig. 2). Los efectos de NPS (donante de NO) se comprobaron también en ratas diabéticas no tratadas (HbA_{1c} > 12%). Este compuesto redujo de forma concentración-dependiente la presión arterial media y la presión de perfusión en el

miembro inferior izquierdo, efecto que fue significativamente menor en las ratas diabéticas (fig. 3).

DISCUSION

La rata anestesiada autoperfundida permite registrar simultáneamente la presión arterial media y la presión de perfusión en el miembro inferior izquierdo⁹. Utilizando esta preparación, la ACh indujo respuestas vasodilatadoras, expresadas como descensos de ambos parámetros. Estos resultados concuerdan con datos previos, en los que ACh baja la presión arterial en ratas

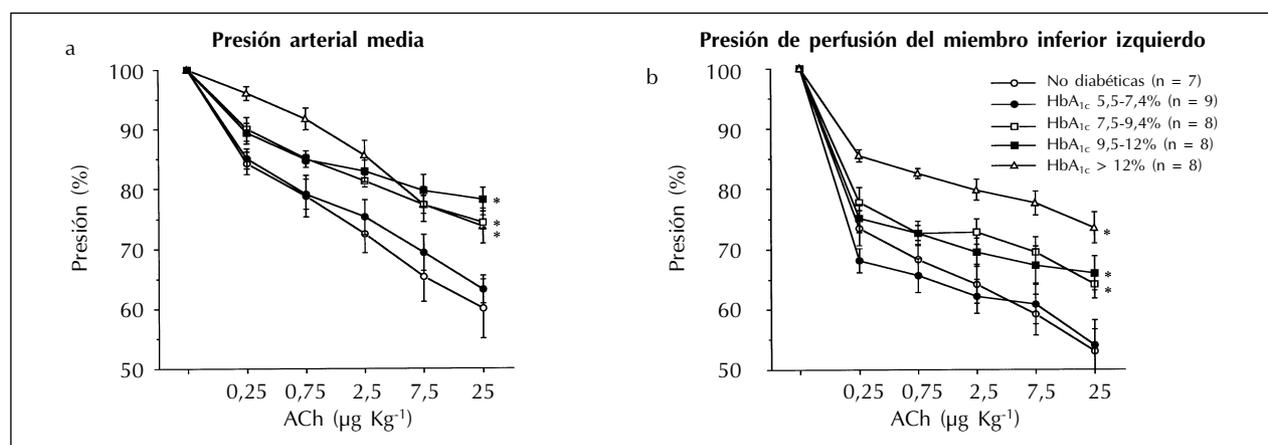


Fig. 2.—Respuestas vasoactivas inducidas por acetilcolina (ACh) sobre **a** la presión arterial media y **b** la presión de perfusión del miembro inferior izquierdo perfundido con un flujo constante de 3,3 ml min⁻¹ kg⁻¹ de ratas no diabéticas y en diabéticas por estreptozotocina con diferentes grados de control metabólico, expresado en función de los niveles de HbA_{1c}. Los datos se representan como media ± error estándar del porcentaje de presión previa alcanzada por una infusión de noradrenalina. El número de animales empleados en cada caso figura en paréntesis. *P < 0.05 (ANOVA) frente a la curva a ACh en ratas no diabéticas.

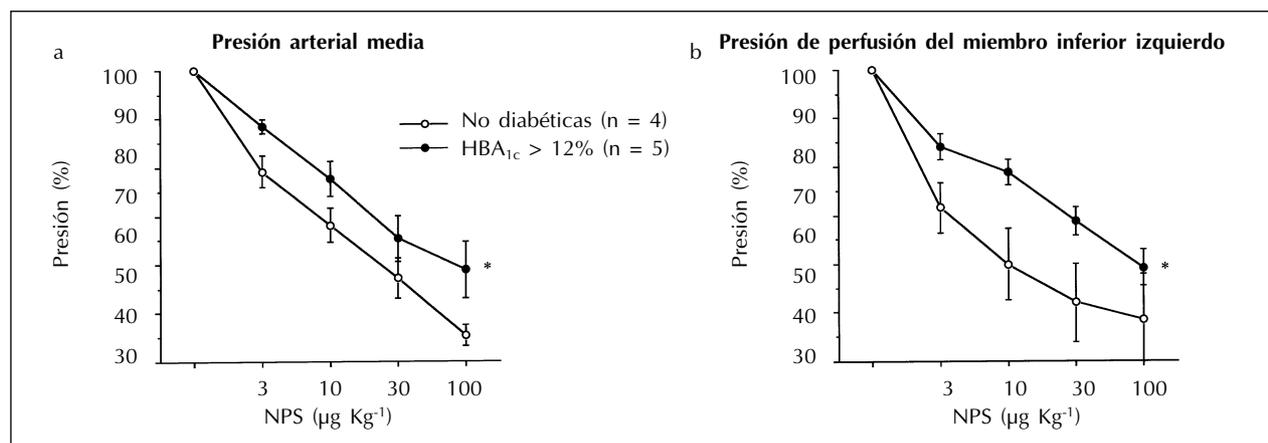


Fig. 3.—Respuestas vasoactivas inducidas por nitroprusiato sódico (NPS) sobre **a** la presión arterial media y **b** la presión de perfusión del miembro inferior izquierdo perfundido con un flujo constante de 3,3 ml min⁻¹ kg⁻¹ de ratas no diabéticas y en diabéticas por estreptozotocina sin tratamiento (HbA_{1c} > 12%). Los datos se representan como media ± error estándar del porcentaje de presión previa alcanzada por una infusión de noradrenalina. El número de animales empleados en cada caso figura en paréntesis. *P < 0.05 (ANOVA) frente a la curva a NPS en ratas no diabéticas.

anestesiadas¹⁰. En preparaciones similares, la ACh también descende la presión de perfusión de zonas específicas, siendo estas respuestas vasodilatadoras dependientes de la presencia del endotelio^{10,11}. Se ha descrito, además, que los cambios en la presión de perfusión reflejan las respuestas vasoactivas arteriolares¹², por lo que este método es válido para analizar la disfunción endotelial diabética en vasos de resistencia.

La existencia de disfunción endotelial asociada a la diabetes ha sido demostrada en varios estudios¹⁻³. También se ha descrito una menor respuesta a donantes de NO en pacientes diabéticos¹. En el modelo de diabetes experimental utilizado en este trabajo, diabetes inducida por estreptozotocina, la interferencia con las relajaciones endotelio-dependientes se ha descrito tanto en segmentos vasculares aislados^{8,13} como en animales perfundidos¹⁴, lo que indica que las alteraciones endoteliales ocurren tanto en vasos de conductancia como de resistencia.

En concordancia con estos datos previos, las respuestas vasodilatadoras mediadas por ACh se redujeron en las ratas diabéticas, en los dos parámetros determinados. Además, la relajación inducida por NPS, un donante de NO independiente de endotelio¹⁵, también fue menor. Curiosamente, el grado de disfunción endotelial estuvo claramente relacionado con el control metabólico de la diabetes, estimado por los niveles de HbA_{1c}. Así, cuando se consiguió un buen control metabólico, con valores de HbA_{1c} cercanos a los de ratas no diabéticas, no hubo cambios en las respuestas vasodilatadoras. Esto coincide con datos previos obtenidos en vasos de ratas diabéticas por estreptozotocina tras ocho a doce semanas de tratamiento con insulina¹⁶ o con trasplante de islotes pancreáticos⁷. En estos trabajos, la mejora de la función endotelial es posterior a la mejora del control metabólico, evaluado por los valores de HbA_{1c}^{7,16}. Además, nuestros resultados sugieren la existencia de un umbral para el desarrollo de disfunción endotelial diabética. El grado de control metabólico desde el cual se manifiesta el daño endotelial se estableció en una HbA_{1c} mayor de 7,5%; en este sentido, es interesante resaltar que, aunque la presión arterial media no se modificó entre los diferentes grupos de ratas diabéticas y no diabéticas, la presión de perfusión basal en el miembro inferior izquierdo se incrementó de forma significativa en aquellos animales diabéticos con niveles patológicos de HbA_{1c}, lo que parece indicar un aumento de las resistencias vasculares periféricas.

En conclusión, nuestros resultados indican que la disfunción endotelial asociada a la diabetes está estrechamente relacionada con el control metabólico de la enfermedad. Además, es posible establecer un umbral para el deterioro endotelial desde porcentajes de HbA_{1c} superiores a 7,5%.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por la CICYT (SAF 96-0142 y 98-0010) y Bayer España, S.A. Agradecemos a M^a Carmen Fernández-Criado y a José M. Badajoz-Martínez por el cuidado de los animales.

BIBLIOGRAFIA

1. 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* 90: 2548-2554, 1992.
2. Johnstone MT, Creager SJ, Scales KM, Cusco JA, Lee BK, Creager MA: Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 88: 2510-2516, 1993.
3. Fortes ZB, Leme JG, Scivoletto R: Vascular reactivity in diabetes mellitus: role of the endothelial cells. *Br J Pharmacol* 79: 771-781, 1983.
4. Durante W, Sen AK, Sunahara FA. Impairment of endothelium-dependent relaxation in aortae from spontaneously diabetic rats. *Br J Pharmacol* 94: 463-468, 1988.
5. Diabetes Control and Complications Trial Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329: 977-986, 1993.
6. Viberti G: A glycemic threshold for diabetic complications? *N Engl J Med* 332: 1293-1294, 1995.
7. Pieper GM, Jordan M, Adams MB, Roza AM: Syngeneic pancreatic islet transplantation reverses endothelial dysfunction in experimental diabetes. *Diabetes* 44: 1106-1115, 1995.
8. Karl J, Burns G, Engel WD, Finke A, Kratzer M, Rollinger W, Schickaneder E, Seidel C: Development and standardization of a new immunoturbidimetric HbA_{1c} assay. *Clin Lab* 39: 991-996, 1993.
9. Medgett IE: Effect of neuronal uptake blockade on the amplifying effect of serotonin on sympathetic vasoconstriction in rat autoperfused hindlimb. *J Cardiovasc Pharmacol* 10 (Supl. 3): S65-S68, 1987.
10. Merrick BA, Holcslaw TL: Peripheral vascular effects of atropine and methylatropine in the rat autoperfused hindlimbs preparation. *J Pharmacol Exp Ther* 218: 771-778, 1981.
11. Brouwers-Ceiler DL, Nelissen-Vrancken HJMG, Smits JFM: Effect of nitric oxide synthase inhibition on the acetylcholine response in the perfused hind limb of rats. *Eur J Pharmacol* 307: 65-68, 1996.
12. Prewitt RL, Reilly CK, Wang DH: Pressure-flow curves reflect arteriolar responses in perfused rat hindquarters. *Hypertension* 23: 223-228, 1994.
13. Hattori Y, Kawasaki H, Abe K, Kanno M: Superoxide dismutase recovers altered endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. *Am J Physiol* 261: H1086-H1094, 1991.
14. Kiff RJ, Gardiner SM, Compton AM, Bennet T: Selective impairment of hindquarters vasodilator responses to bradykinin in conscious Wistar rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Br J Pharmacol* 103: 1357-1362, 1991.
15. Feelisch M: The biochemical pathway of nitric oxide formation from nitrovasodilators: appropriate choice of exogenous NO donors and aspects of preparation and handling of aqueous NO solutions. *J Cardiovasc Pharmacol* 17 (Supl. 3): S25-S33, 1991.
16. Rodríguez-Mañas L, Angulo J, Peiró C, Llergo JL, Sánchez-Ferrer A, López-Dóriga P, Sánchez-Ferrer CF: Endothelial dysfunction and metabolic control in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Pharmacol* 123: 1495-1502, 1998.