

La disfunción endotelial en la angiopatía diabética. El factor de crecimiento del endotelio vascular

J.L. ESCOLAR^a, A. CILVETTI^b, J.L. PINZÓN^c,
G. RAMÍREZ^d y J. RUIZ ESCALANTE^e

Servicios de ^aMedicina Interna, ^bOftalmología, ^cEndocrinología, ^dHematología y ^eRadiología. Hospital Universitario Virgen de la Victoria. Málaga.

La angiopatía es una complicación muy frecuente en los diabéticos. El daño endotelial multicausal origina tanto la micro como la macroangiopatía. La disfunción del endotelio sería la primera fase de la secuencia patogénica. Existe una serie de marcadores bioquímicos, morfológicos y funcionales que permiten su detección en estadios iniciales. Aunque en la retinopatía diabética ha sido ampliamente analizado el papel del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), parece que también puede tener una intervención en otras complicaciones vasculares, como son la nefropatía, la neuropatía y la macroangiopatía. Recientemente se han comenzado a ensayar tratamientos que modulan la acción de ese factor; sin embargo, las consecuencias que podrían derivarse sobre algunos territorios, como el coronario y el retiniano, pueden ser contrapuestas.

ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN DIABETIC ANGIOPATHY. VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR

Vascular complications are the main causes of morbidity and mortality in patients with diabetes. Several lines of evidence suggest that endothelial damage and angiogenic factors, could play a key role in the development of both micro- and macroangiopathy. Great progress has been achieved in elucidating the fundamental processes underlying the pathogenesis of these complications. Several markers are used to estimate the risk of endothelial dysfunction. The angiogenic response accounts for much of the diabetic retinopathy and may, in addition, serve a significant role in nephropathy and neuropathy. In contrast, recent data suggest that vascular collateralization resulting from ischemia-induced growth factor release in tissues compromised by macrovascular disease may be important in reducing clinical symptoms and tissue damage. Thus, two apparently diametrically opposed pathogenetic paradigms are arising, which complicate the actual understanding of these phenomena, generating a perplexing paradox, which necessitates careful consideration of the potential risks, benefits, and interactions arising from the probable future use of therapeutic approaches with growth factor agonists and antagonists.

Key words: Endothelial dysfunction. Macroangiopathy. Microangiopathy. Diabetes mellitus. Vascular endothelial growth factor.

La lesión vascular constituye la base de las mayores complicaciones en la diabetes mellitus, que representan las principales causas de morbimortalidad en este tipo de pacientes. Su abordaje clínico ofrece hoy día muchas dificultades. Numerosos datos avalan la evidencia de que el daño endotelial podría tener un papel principal en el desarrollo tanto de la macroangiopatía, enmarcada por la aterosclerosis y sus consecuencias vasculares, como de la microangiopatía, cuyos máximos exponentes son la retinopatía y la nefropatía. La presencia de microangiopatía agrava la evolución de la macroangiopatía y viceversa¹.

EL DAÑO ENDOTELIAL

Es una forma general de reaccionar de la pared vascular frente a la agresión, propiciada por una serie de noxas de muy variada naturaleza y de acción muy prolongada en el tiempo. Entre ellas cabe destacar las me-

Palabras clave: Disfunción endotelial. Macroangiopatía. Microangiopatía. Diabetes mellitus. Factor de crecimiento del endotelio vascular.

Correspondencia: Dr. J.L. Escolar Castellón.
Departamento de Medicina. Facultad de Medicina.
Campus Universitario de Teatinos. 29010 Málaga.

Manuscrito recibido el 15-12-2000; aceptado para su publicación el 26-3-2001.

cánicas (hipertensión arterial), químicas (tabaco, homocistinuria, hipercolesterolemia e hiperglucemia), inflamatorio-infecciosas (periodontitis, por citomegalovirus, *chlamydia* y *Helicobacter pilorii*)²⁻⁴.

Las causas del daño endotelial, limitadas a la enfermedad diabética, son también múltiples. Se pueden mencionar no sólo la hiperglucemia y la hiperinsulinemia, sino también otros factores de presentación frecuente y que se asocian a la diabetes mellitus, mediados tanto por la alteración metabólica global como por una posible asociación genética⁵. Entre ellos destacan la hipertensión arterial y la hiperlipemia. Esas noxas patógenas coincidentes constituyen lo que se conoce por síndrome metabólico, síndrome X o de Reaven⁶.

La evolución del daño endotelial comienza por una mera disfunción. Aumenta la permeabilidad vascular y hay alteraciones de la motricidad y del tono de los vasos. Se desencadenan también estímulos reparadores angiogénicos. Al final aparecen lesiones evidentes y determinantes de patología vascular, bien en forma de fenómenos proliferativos vasculares, signo de una angiogénesis excesiva, bien en forma de procesos obstructivos, ateroscleróticos. La microangiopatía, representada tanto por la retinopatía como por la nefropatía, produce en algún momento de su evolución un aumento de la permeabilidad vascular y en sus formas más avanzadas presenta fenómenos proliferativos. La macroangiopatía se caracteriza por el depósito ateromatoso obstructivo en vasos de mediano y gran calibre⁷.

LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

Es la primera alteración en el camino hacia el daño endotelial, antecedendo en el tiempo a la aparición de manifestaciones clínicas, por lo que se le concede un valor pronóstico. Ya se observa su presencia en muchos casos del “síndrome de resistencia a la insulina”. La disfunción endotelial se caracteriza por la incapacidad del endotelio para ejercer sus competencias de regulación vasomotora, al no producir ni liberar factores relajadores (EDRF), entre los que el principal parece ser el óxido nítrico y sus derivados. Al mismo tiempo, se produce un exceso de prostanoides vasoconstrictores, lo que repercute sobre el resto de las funciones del endotelio⁸.

Hay una serie de marcadores que permiten detectar de forma temprana esta disfunción endotelial. Unos son de carácter bioquímico, como el factor de Von Willebrand, la endotelina o los reguladores del plasminógeno. Entre estos últimos se citan tanto el activador como el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI). Mención especial merecen el factor de crecimiento endotelial (VEGF), la s-trombomodulina, la SE-selectina, el sVCAM-1, la fibronectina, el fragmento de colágeno IV y la microalbuminuria. Una sustancia predictor de la microalbuminuria parece ser la metaloproteínasa-9, producida por la célula endotelial en la diabetes mellitus tipo 2⁹. Otros marcadores son de naturaleza mecánica, como la variación de la vasodilatación postisquémica medida con ecografía de alta definición y Doppler en arteria braquial.

Los estudios existentes, de tipo transversal, han demostrado la existencia de diversos fenómenos, como una alteración de la vasodilatación dependiente del endotelio y el aumento de las concentraciones plasmáticas de las proteínas reguladoras, originadas en la pared vascular. Todo ello se ha observado en pacientes con enfermedades relacionadas con lesión endotelial, aterosclerosis, preeclampsia y vasculitis. Igualmente, se han podido evidenciar en sujetos con factores de riesgo aterosclerótico como la hipertensión, el hábito tabáquico o la hipercolesterolemia¹⁰. Estos marcadores no tienen actualmente un uso clínico, aunque su estudio ha per-

mitido avanzar mejor en el conocimiento fisiopatológico de este campo.

Disfunción endotelial en la diabetes mellitus

En la diabetes mellitus inicial, la hiperglucemia aumenta la liberación de óxido nítrico por el endotelio vascular, contribuyendo en etapas tempranas a un incremento del flujo sanguíneo. Se eleva la tensión mecánica de la pared de los vasos, con la consiguiente sobrecarga. En fases más avanzadas, aparecen mecanismos de agresión. Se estimula la vía de los polioles que depleciona el endotelio de NADPH y de glutatión, el primero es un cofactor de la sintetasa endotelial del óxido nítrico, y la segunda, un antioxidante protector contra los radicales libres. La glucosa, por otro lado, aumenta el diacérol y la actividad proteínasa C, lo que reduce más aún la producción de óxido nítrico. A largo plazo, el efecto más dañino lo produce la síntesis de los “productos finales de la glucosilación avanzada” (AGE), que impiden la formación de óxido nítrico y glucosilan las lipoproteínas de baja densidad (LDL), haciéndolas más susceptibles a la oxidación por radicales libres, lo que a su vez daña el endotelio y reduce aún más la síntesis de óxido nítrico, con lo que se crea un círculo vicioso. Aunque en la diabetes las concentraciones de LDL suelen ser cuantitativamente normales, es evidente que en esta lipoproteína ocurren cambios cualitativos, que no sólo son causantes de la aterosclerosis de las grandes arterias, sino también del daño endotelial aislado de las pequeñas arterias¹¹.

Otros factores que pueden tener un papel en la disfunción endotelial de la diabetes mellitus son:

– *La hipertensión arterial.* Se ha demostrado que la vasomotricidad endotelial está alterada en las arterias tanto de humanos como de animales con hipertensión arterial¹².

– *La hiperlipemia.* Existen numerosos trabajos sobre la relación existente entre las alteraciones de la función endotelial y las concentraciones plasmáticas elevadas de colesterol y/o de triglicéridos, tanto basales en ayunas como posprandiales, provocados por comidas de prueba con sobrecarga lipídica. Hoy día tiene un gran interés el estudio del posible efecto de ciertos hipolipemiantes sobre la disfunción endotelial, más allá de su efecto normalizador de las concentraciones de los lípidos plasmáticos².

– *La inflamación.* En los últimos años, se está confiriendo a la infección e inflamación un papel etiopatogénico especial sobre las alteraciones vasculares. Las infecciones crónicas por *chlamydia*, *H. pilorii*, citomegalovirus y periodontitis se han visto asociadas a la presencia de patología vascular. Marcadores de infección e incluso de inflamación se han correlacionado con la aparición de angiopatía, y a ciertos marcadores inespecíficos de inflamación como son el fibrinógeno, la proteína C reactiva, el número de leucocitos o la microalbuminuria se les confiere un valor predictivo angiopático¹³⁻¹⁸.

Un factor de daño endotelial citado por algunos autores está constituido por la predisposición, es decir, por la existencia de un “antecedente común endotelial” que pudiera favorecer de una forma genéticamente programada el desarrollo y mantenimiento de estas alteraciones, lo que siempre conferiría un grado de incertidumbre a todo este esquema patogénico⁶.

Comportamiento de los marcadores de disfunción endotelial

Existen numerosos datos bibliográficos sobre la elevación plasmática de marcadores bioquímicos en el daño endote-

lial. Entre ellos ha tomado gran interés el VEGF, sobre todo en relación con la presencia de retinopatía diabética. Son clásicos los hallazgos en la diabetes del gran aumento de VEGF, que aparece en ciertos componentes del globo ocular, demostrados tanto en animales como en humanos¹⁹. El VEGF es el causante directo del aumento de la permeabilidad vascular y de la angioproliferación retiniana²⁰⁻²², y parece bastante específico de la situación diabética. Las concentraciones plasmáticas del VEGF no están tan aumentadas como las intraoculares pero, aun con alguna controversia bibliográfica, parece que guardan relación con la existencia de retinopatía diabética²³. El tratamiento oftalmológico y endocrinológico eficaz de la retinopatía diabética se ve seguido de un descenso en las concentraciones plasmáticas de VEGF. También se ha estudiado el comportamiento de este factor en otras alteraciones angiopáticas, diabéticas o no. Se ha detectado aumentado en los vasos coronarios de aquellos pacientes con una buena circulación colateral. Finalmente, se señala que el VEGF está elevado tanto en la hipertensión arterial como en las hiperlipemias²⁴⁻²⁸.

La vasodilatación postisquémica dependiente del endotelio medida mediante ecografía de alta definición con Doppler sobre la arteria braquial es un método muy sensible, temprano y no agresivo, que se realiza *in vivo* para detectar las alteraciones de la vasomotricidad que acontecen en la disfunción endotelial en el humano²⁹⁻³¹. Todas las noxas patógenas ya comentadas productoras de lesión endotelial llevan asociadas variaciones en la vasomotricidad, caracterizadas por una disminución de la llamada vasodilatación postisquémica dependiente del endotelio³²⁻³⁴. Existen en la bibliografía una serie de datos aislados, referentes al comportamiento vasomotor en los enfermos con diabetes mellitus, que señalan algunas diferencias con respecto a otras causas de disfunción endotelial y podrían resumirse así: *a)* desde el inicio de la diabetes mellitus no complicada, y en contraste con personas no diabéticas, se presenta una disminución de la vasodilatación reactiva; *b)* en la diabetes mellitus con complicaciones microangiopáticas la vasodilatación reactiva es más acentuada si existe retinopatía, de una forma manifiesta, y en el caso de la nefropatía incipiente de un modo no tan intenso; *c)* la presencia de macroangiopatía, o de otros factores de riesgo vascular como pueden ser la hipertensión o la hiperlipemia, se asocia a una disminución de la vasodilatación postisquémica, y *d)* se ha demostrado que la presencia de estrógenos, en los niveles fisiológicos femeninos, aumenta la vasodilatación reactiva en personas sanas.

El VEGF constituye hoy día uno de los eslabones patogénicos más destacados. Puede considerarse un mediador de algunas de las alteraciones que ocurren en el diabético y parece ser el principal protagonista en la génesis de la retinopatía. Se ha observado que el VEGF es una especie de citocina que está formada por una estructura glucoproteica, con una acción potente sobre la permeabilidad vascular. Tiene efectos angiogénicos, ya que es un mitógeno primario de la célula endotelial y está muy aumentado en los tumores de crecimiento rápido y de gran vascularización. Su producción la desencadena la isquemia y actúa por medio de dos receptores citoplasmáticos, el VEGF-R1 y el VEGF-R2, que son esenciales también para el desarrollo embrionario normal y la ausencia de sus genes determinantes produce una disrupción letal en la formación de la macro y de la microvascularización fetales. El VEGF constituye el mayor mediador de la neoproliferación vascular retiniana en la enfermedad diabética. Se produce por células del epitelio pigmentario, pericitos, células endoteliales y gliales, microglía, células de Müller y ganglionares. Las células endoteliales tienen receptores de alta afinidad para el VEGF, especialmente las que están localizadas en la retina, que los poseen

en gran número. El VEGF está aumentado en el líquido intraocular¹⁹. La administración de VEGF en la piel desencadena un aumento de la permeabilidad vascular dérmica, superior a la producida por la histamina³⁵. La inyección intraocular en animales ocasiona fenómenos similares a los de la retinopatía diabética. El VEGF aparece elevado en la retinopatía ya en fase incipiente. Se han observado valores aumentados tanto en la nefrona diabética³⁶ como en los nervios periféricos en la neuropatía diabética³⁷. En condiciones normales, las mujeres tienen valores más elevados de VEGF. En la diabetes mellitus, el sexo femenino tiene una mayor tendencia que el masculino a presentar retinopatía.

Existen varios métodos para neutralizar la acción del VEGF. Se han utilizado inhibidores de VEGF en forma de receptores solubles de proteínas quiméricas que se unen a él y lo inactivan. La inyección de anticuerpos anti-VEGF ha desencadenado una reducción de la neoproliferación vascular en los globos oculares isquémicos de animales. También se han empleado inhibidores de los mediadores bioquímicos de la cascada metabólica puesta en marcha por el VEGF. La administración oral en animales del LY333531, un inhibidor selectivo de la proteínasa C (PCK), ha propiciado cambios favorables llamativos, sin apenas efectos indeseables.

En la macroangiopatía diabética centrada en la circulación coronaria, se ha observado que tras un infarto agudo de miocardio aumentan las concentraciones plasmáticas de VEGF, normalizándose sus cifras tras la reperusión. La administración de VEGF en las soluciones cardiopléjicas en corazón aislado mejora el flujo coronario y los parámetros de función ventricular. En corazones de modelos animales con infartos miocárdicos, se han encontrado aumentados tanto los receptores de VEGF como los valores de VEGF³⁷.

Ultimamente se ha acuñado el término de "angiogénesis terapéutica", teniendo como principal candidato experimental el VEGF³⁸. La administración intracoronaria bien de este factor o de plásmidos que expresan el VEGF ha demostrado, tanto en animales de experimentación como en los estudios en fase I realizados en humanos, disminuir la isquemia y mejorar la función ventricular³⁹. Resultados igualmente favorables se han obtenido al inyectar estos plásmidos en la circulación de las extremidades isquémicas en humanos, por lo que en los últimos años se ha intentado experimentalmente en animales diabéticos la utilización de antagonistas inmunológicos de estos factores. En la actualidad, se están realizando ensayos clínicos para determinar la efectividad de agonistas y antagonistas angiogénicos del factor VEGF no solamente en el terreno de la macro y microangiopatía diabética, sino también, y quizá con más intensidad, en relación con la angiogénesis tumoral⁴⁰. Asimismo se están estudiando en este campo otros factores como la talidomida, la integrina y los antagonistas de la hormona de crecimiento⁴¹. Se conocen hoy día más de 20 agentes antiangiogénicos, y algunos estudios multicéntricos han comenzado a realizarse en humanos. La ampliación reciente y rápida de los conocimientos de estos fenómenos fisiopatológicos vasculares, centrados en especial en torno al factor VEGF y a su relación con las complicaciones diabéticas, ha acelerado el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas a paliar tanto el desarrollo de la macro como de la microangiopatía³⁰.

Es tanta la necesidad de mejorar la situación clínica de este numeroso grupo de pacientes que muchos de estos productos farmacológicos ya se encuentran en fase de ensayo clínico. Estos avances, sin embargo, han generado lo que en principio pudiera parecer una paradoja en el tratamiento de la angiopatía diabética. La terapéutica con anti-VEGF se revela muy prometedora en la reducción de las complicaciones microangiopáticas, fundamentalmente la retinopatía. También las terapéuticas con pro-VEGF levantan la misma

expectación, al aumentar la vascularización colateral y reducir por ello las complicaciones macrovasculares asociadas al infarto de miocardio y a la arteriopatía de extremidades^{40,42}. El hecho de que, por lo menos en teoría, un tratamiento sistémico dirigido a mejorar una complicación diabética pudiera agravar otras ha llevado a diversos autores a expresar ciertas dudas. No obstante, existen varios factores a considerar: la administración temporalmente oportuna del fármaco, teniendo en cuenta la evolución no siempre sincrónica de las diversas complicaciones; el aporte local de estos medicamentos, evitando las acciones a distancia; su corta vida media y las diferencias existentes, a este respecto, entre los distintos medicamentos. Se cree que se podría suministrar para permitir que ejerza el efecto beneficioso deseado sobre una región orgánica propicia, sin que se alcanzan estructuras en las que estos medicamentos pudieran ser perjudiciales⁴³.

El mejor conocimiento de los mecanismos íntimos de la disfunción endotelial, que a veces parecen antagónicos, ayudará en un futuro a comprender no sólo las diferencias patogénicas existentes, sino también las divergencias de acción que la terapéutica a emplear pudiera tener en un momento dado.

BIBLIOGRAFÍA

- Donaghy KC, Robinson J, McCredie R, Fung A, Silink M, Celermajer DS. Large vessel dysfunction in diabetic adolescents and its relationship to small vessel complications. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1997; 10: 593-598.
- Lopes-Virella MF, Virella G. Cytokines, modified lipoproteins, and arteriosclerosis in diabetes. *Diabetes* 1996; 45 (Supl 3): 40-44.
- Lu M, Kuroki M, Amano S, Toletino M, Keough K, Kim I et al. Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression. *J Clin Invest* 1998; 101: 1219-1224.
- Hoffmann MA, Koh B, Zumbach MS, Borceau V, Bierhaus A, Henkels M et al. Hyperhomocysteinemia and endothelial dysfunction in IDDM. *Diabetes Care* 1998; 21: 841-848.
- Fernández-Real JM, Broch M, Vendrell JM, Gutiérrez C, Casamitjana R, Pugeat M et al. Interleukin-6 gen polymorphism and insulin sensitivity. *Diabetes* 2000; 49: 517-520.
- Tooke JE, Hannemann MM. Adverse endothelial function and insulin resistance syndrome. *J Intern Med* 2000; 247: 425-431.
- Poston L. Endothelial control of vascular tone in diabetes mellitus. *Diabetologia* 1997; 40: S113-S114.
- Steijouwer ACD. Is measurement of endothelial dysfunction clinically useful? *Eur J Clin Invest* 1999; 29: 459-461.
- Ricote M, Huang J, Fajas Li A, Welch J, Najib L et al. Expression of the peroxinome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) in human atherosclerosis and regulation by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7614-7619.
- Johnstone MT, Creager SJ, Scales KM, Cusco JA, Lee BK, Creager MA. Impaired endothelium-dependent vasodilatation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 1993; 88: 2510-2516.
- Stansberry KB, Shapiro SA, Hill MA, McNitt PM, Meyer MD, Vinik AI. Impaired peripheral vasomotion in diabetes. *Diabetes Care* 1996; 19: 715-721.
- Hsué WA, Anderson PW. Hypertension, the endothelial cell, and the vascular complications of diabetes mellitus. *Hypertension* 1992; 20: 253-263.
- Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease. *JAMA* 1998; 279: 1477-1482.
- Vallance P, Collen J, Bhagat K. Infection, inflammation, and infarction: does acute endothelial dysfunction provide a link? *Lancet* 1997; 349: 1391-1392.
- Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease. *Circulation* 1998; 97: 425-428.
- Schalkwijk CG, Poland DCW, Van Dijk E, Kok A, Emeis JJ, Dräger AM et al. Plasma concentration of C-reactive protein is increased in type I diabetic patients without clinical macroangiopathy and correlates with markers of endothelial dysfunction: evidence for chronic inflammation. *Diabetologia* 1999; 42: 351-357.
- Danesh J, Collins R, Peto R. Chronic infections and coronary heart disease: is there a link? *Lancet* 1997; 350: 430-436.
- Sobol A. Fibrinogen level in patients with type I diabetes with and without retinopathy. *Acta Haematol Pol* 1999; 26: 57-62.
- Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt B, Aiello LM, Jampel HD et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other disorders. *N Engl J Med* 1994; 331: 1480-1494.
- Aiello LP, Bursell SE, Clermont A, Duh E, Ishii H, Takagi C et al. Vascular endothelial growth factor-induced retinal permeability is mediated by protein kinase C in vivo and suppressed by an orally effective beta-isoform-selective inhibitor. *Diabetes* 1997; 46: 1473-1480.
- Boulton M, Foreman D, Williams G, McLeod D. VEGF localisation in diabetic retinopathy. *Brit J Ophthalmol* 1998; 82: 561-568.
- Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, Kostyk SK, D'Amato R, Sullivan R et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36: 2063-2070.
- Lip PL, Belgore F, Blann AD, Hope-Ross Mw, Gibson JM, Lip GY. Plasma VEGF and soluble VEGF receptor FLT-1 in proliferative retinopathy: relationship to endothelial dysfunction and laser treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 2115-2119.
- Burgos R, Simo R, Audi L, Mateo C, Mesa J, Garcia-Ramírez M et al. Vitreous levels of vascular endothelial growth factor are not influenced by its serum concentrations in diabetic retinopathy. *Diabetologia* 1997; 40: 1107-1109.
- Schultz A, Lavie L, Beyar R, Stone T, Skorecki K, Lavie P et al. Interindividual heterogeneity in the hypoxic regulation of VEGF: significance for the development of the coronary artery collateral circulation. *Circulation* 1999; 100: 547-552.
- Hivind P, Tarnow L, Oestergaard PB, Parving HH. Elevated vascular endothelial growth factor in type 1 diabetic patients with diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2000; 57: S56-S61.
- Kessler L, Wiese ML, Attali P, Mossard JM, Cazenave JP, Pinget M. Von Willebrand factor in diabetic angiopathy. *Diabetes Metab* 1998; 24: 327-336.
- Duncan BB, Schmidt MI, Offenbacher S, Wu KK, Savage PJ, Heiss G. Factor VIII and other hemostasis variables are related to incident diabetes in adults. The atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Diabetes Care* 1999; 22: 767-772.
- Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; 340: 1111-1115.
- Dult E, Aiello LP. Vascular endothelial growth factor and diabetes: the agonist versus antagonist paradox. *Diabetes* 1999; 48: 1899-1906.
- Sorensen KE, Xcelor DS, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Thomas O et al. Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *B Heart J* 1995; 74: 247-253.
- Vogel RA. Brachial artery ultrasound: a noninvasive tool in the assessment of triglyceride-rich lipoproteins. *Clin Cardiol* 1999; 2: 1134-1139.
- Poredos P, Kek A. Relation of blunted dilatation of the brachial artery in insulin-dependent diabetes mellitus to microalbuminuria. *Am J Cardiol* 2000; 86: 364-367.
- Predinelli R, Gampietro O, Carmassi F, Melillo E, Dell'Olmo G, Catapano G et al. Microalbuminuria and endothelial dysfunction in essential hypertension. *Lancet* 1994; 344: 14-18.
- Senger DR, Connolly DT, Van de Water L, Feder J, Dvorak HF. Purification and NH2-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res* 1990; 50: 1774-1778.
- Simon M, Rockl W, Hornig C, Grone EF, Theis H, Weich HA et al. Receptors of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) in fetal and adult human kidney. *Am J Physiol* 1995; 268: F240-F250.
- Samii A, Unger J, Lange W. Vascular endothelial growth factor expression in peripheral nerves and dorsal root ganglia in diabetic neuropathy in rats. *Neurosci Lett* 1999; 262: 159-162.
- Banay S, Jaklitsch MT, Shou M, Lazarous DF, Scheinowitz M, Biro S et al. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation* 1994; 89: 2183-2189.
- Losordo DW, Vale PR, Symes JF, Dunnington CH, Esakof DD, Mayski M et al. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* 1998; 98: 2800-2804.
- Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillet N, Phillips HS et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth *in vivo*. *Nature* 1993; 362: 841-844.
- Kenyon BM, Brown F, D'Amato RJ. Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization. *Exp Eye Res* 1997; 64: 971-978.
- Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K et al. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 1998; 97: 1114-1123.
- Yamamoto M, Egusa G, Okubo M, Yamakido M. Dissociation of microangiopathy in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1998; 21: 1451-1454.