

REVISTA ARGENTINA DE MEDICINA

ISSN 1515-3460

Buenos Aires

Catanzaro OL, Di Martino I, Aira

Capponi J. El rol del sistema

calicreína-cininas en un modelo

experimental de diabetes. Estudio

de la patología aórtica. *Rev Arg Med*

2017;5[2]:97-102

Recibido: 3 de enero de 2017.

Aceptado: 30 de marzo de 2017.

¹ Doctor, Universidad del Salvador; Escuela de Medicina, Universidad Argentina John F. Kennedy.

² Licenciada en Ciencias, Departamento de Salud, Universidad Argentina John F. Kennedy.

³ Bioquímica, Departamento de Salud, Universidad Argentina John F. Kennedy.

Los autores manifiestan no poseer conflictos de intereses.

AUTOR PARA CORRESPONDENCIA

Dr. Orlando L. Catanzaro. Av. Rivadavia 5126, dep. 18-3, CABA. Tel.: (+54911) 5632-7079. Correo electrónico: ocatanzaro@hotmail.com.ar

EL ROL DEL SISTEMA CALICREÍNA-CININAS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES. ESTUDIO DE LA PATOLOGÍA AÓRTICA

A PRIMARY ROLE OF THE KALLIKREIN-KININ SYSTEM IN A DIABETIC ANIMAL MODEL. EXPERIMENTAL STUDY OF AORTIC PATHOLOGY

Orlando L. Catanzaro,¹ Irene di Martino,² Jorgelina Aira Capponi³

RESUMEN

La hiperglucemia progresiva en la diabetes mellitus está asociada con daño significativo y disfunción del sistema endotelial vascular, así como con alteraciones micro y macrovasculares, permeabilidad vascular, aterosclerosis y modificaciones del estrés oxidativo. La diabetes mellitus aumenta la producción de proinflamatorios (citoquinas), lo que involucra particularmente el sistema calicreína-cininas. El receptor BKB1 es un importante componente de este sistema y está sobrerregulado en el estado inflamatorio (como lo es la diabetes mellitus). En el presente estudio, evaluaremos el modo en que el sistema mencionado modifica de forma progresiva la glucemia y el estrés oxidativo en plasma y en la arteria aorta mediante la actividad del malondialdehído (MDA), el glutatión (GSH) y la permeabilidad vascular en un modelo diabético inducido por estreptozocina (STZ). Los resultados obtenidos muestran que la hiperglucemia diabética aumenta a los 12 y a los 18 días después de la aplicación de STZ, en tanto que el estrés oxidativo plasmático medido por MDA lo hace a los 8 días luego de la STZ, mientras que el antioxidante GSH desciende y se relaciona con el aumento de la hiperglucemia. En la arteria aorta se observaron cambios similares del estrés oxidativo (MDA y GSH). La permeabilidad vascular acompañó el progreso de la hiperglucemia. La administración de R-954 –antagonista del receptor BKB1– inhibió significativamente la hiperglucemia y el estrés oxidativo plasmático, en tanto que también modificó el estrés oxidativo y la permeabilidad vascular en la arteria aorta. Estos datos proveen evidencia de la participación del receptor BKB1 en el sistema calicreína-cininas en la patología aórtica diabética.

PALABRAS CLAVE. Diabetes, aorta, estrés oxidativo, sistema calicreína-cininas, BKB1-R.

ABSTRACT

Progressive hyperglycemia in diabetes mellitus is associated with significant long-term damage and micro- and macrovascular complications. Vasculopathy is associated with oxidative stress, vascular permeability, and atherosclerosis. Diabetes mellitus increases pro inflammatory cytokines, involving particularly the kallikrein-kinin system. Kinin B1 receptor (BKB1-R), an important component of this system, is upregulated in the inflammatory state as diabetes. In the present study we evaluated how the kallikrein-kinin system modified diabetic hyperglycemia and oxidative stress (MDA and GSH) in plasma and aortic artery, progressively in a mice STZ diabetic model. In the diabetic mice hyperglycemia increased at days 12 and 18 after STZ, whereas components of oxidative stress (measured through MDA and GSH) in plasma did so at day 8 after STZ; on the other hand, antioxidative GSH was significantly decreased. Aortic artery showed modifications in vascular permeability and oxidative stress (MDA, GSH). The effect of BKB1-R antagonist R-954 on diabetic mice significantly inhibited plasma and aortic artery MDA, GSH, and permeability, with a similar decrease in diabetic hyperglycemia. These data provide further experimental evidence for the role of BKB1-R and kallikrein-kinin system in the aortic pathology in the diabetic state.

KEY WORDS. Diabetes, aortic pathology, oxidative stress, kallikrein-kinin system, BKB1-R.

Introducción

La diabetes mellitus es un estado hiperglucémico progresivo asociado con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, con un 80% de morbilidad y mortalidad cardiovascular, referidas a complicaciones macrovasculares tales como aterosclerosis (1-3). En los individuos con diabetes, el aumento del riesgo de desarrollar complicaciones vasculares ocurre a pesar del estricto control glucémico y aun de acentuar los esfuerzos por disminuir el daño progresivo macrovascular diabético (4).

La diabetes es una de las causas principales de mortalidad en el mundo y es, comparativamente, 3 o 4 veces más común que en los individuos no diabéticos (5,6). La diabetes mellitus está asociada con estados de hipercoagulación y protrombosis que conducen a una respuesta inflamatoria, seguida de infecciones que afectan múltiples órganos (7,8). Ha sido, también, reconocida como un solo factor de riesgo independiente para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (9).

El endotelio vascular juega un papel crucial en la diabetes asociada a aterosclerosis a través de la regulación de la permeabilidad vascular, la inflamación y la trombosis (10,11). La función del endotelio vascular está significativamente deteriorada durante el estado diabético, en un fenómeno llamado "disfunción endotelial" y caracterizado por la reducida biodisponibilidad de un mediador celular endotelial, el óxido nítrico (ON). La disminución del ON liberado derivado del endotelio promueve la activación de plaquetas y leucocitos, y la adhesión modifica la integridad de la barrera endotelial celular y causa la sobreexpresión de genes proinflamatorios (12-14). La diabetes mellitus aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y citoquinas proinflamatorias e involucra particularmente el sistema calicreína-cininas (15). El aumento de ROS, producido por el endotelio vascular y las células sanguíneas circulantes, modifica las funciones de la barrera endotelial y aumenta la producción de trombos (16); también el estrés oxidativo es determinante para la activación de las plaquetas, lo cual es un factor de riesgo para la aterotrombosis (17).

Objetivo

El presente estudio fue realizado para determinar si en el estado diabético progresivo interviene el sistema calicreína-cininas y si, como consecuencia de la diabetes, se altera el estrés oxidativo en la arteria aorta de un modelo murino.

Material y métodos

Se utilizaron ratones machos C57BL/Ks mdb (Instituto Nacional de Microbiología Dr. Malbrán) de 25-30 g de peso. Los animales fueron distribuidos en grupos de 6 con alimentación y agua a voluntad y mantenidos en condiciones

de luz estándar (12 horas de luz, 12 horas de oscuridad) a 22 °C. Se les inyectó 5 dosis consecutivas de STZ (40 mg/kg). Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con las recomendaciones del Comité de Ética de la Universidad Argentina John F. Kennedy.

Protocolo experimental

Los animales fueron divididos en los siguientes grupos ($n = 6$): 1) control; 2) control + R-954; 3) STZ; 4) STZ + R-954. Fueron tratados con 4 dosis de R-954 (300 mcg/kg) a partir del quinto día después de la aplicación de STZ, a partir del noveno día después de la STZ y a los 15 días a partir de la STZ y sacrificados a los 0, 8, 12 y 18 días luego de la administración de STZ.

Determinaciones bioquímicas

La determinación de glucemias fue confirmada a los 0, 8, 12 y 18 días después de la aplicación de STZ midiendo la glucosa sanguínea en un analizador automático (Accu-Chek® Performa). Se obtuvieron muestras de plasma para determinar MDA, antioxidante GSH y colesterol. Muestras de arteria aorta de animales de control y diabéticos (G 1, 2, 3, 4) se analizaron a los 0, 8, 12 y 18 días después de la administración de STZ o STZ + R-954. Las muestras de arteria aorta fueron pesadas y homogeneizadas en Tris-Buffer pH 7,4 y centrifugadas a 3000 rpm y el Spr fue utilizado para determinaciones bioquímicas (18).

Permeabilidad vascular

La permeabilidad vascular a albúmina fue evaluada mediante azul de Evans (EB, por sus siglas en inglés) inyectado en la vena yugular (20 mg/kg en un volumen de 100 µl). Se permitió la circulación del EB durante 15 minutos. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se obtuvieron muestras de arteria aorta a 0, 8, 12 y 18 días luego de la administración de STZ o STZ + R-954, que fueron pesadas y su EB, determinado de acuerdo con Tidjane y colaboradores (19).

Fármacos

La estreptozotocina-STZ (SIGMA, Co, Mo) fue disuelta en solución fisiológica (pH 4,5) y administrada i.p. R-954 antagonista específico del receptor BKB1 de cininas fue disuelto en solución fisiológica y administrado i.p. en 5 dosis consecutivas (R-954: Ac-Orn-[Oic2, α -MePhe5, D β Nal7, Ile8] des Arg9-BK) Inst. Pharmacology Sherbrooke, Canadá. Evans Blue EB (SIGMA Co, Mo), disuelto en solución fisiológica.

TABLA 1. CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE GLUCOSA, MALONDIALDEHÍDO [MDA], GLUTATIÓN [GSH] Y COLESTEROL EN ANIMALES ($n = 6$)

	Glucosa mmol/l	MDA nmol/100 mcl	GSH nmol/100 mcl	Colesterol mmol/ml
Control	5,1+/-0,5	10,9+/-1,2	9,5+/-2,1	3+/-1,3
D 8 d	5,9+/-0,8	14,1+/-1,1*	5,4+/-1,3*	4,1+/-1,5
D 8 d + R-954	6,1+/-0,7	12,2+/-1,3	6,8+/-1,5	3,8+/-0,6
D 12 d	12,8+/-1,7*	19,5+/-2,6*	4,1+/-1,1*	6,3+/-0,8*
D 12 d + R-954	6,2+/-1,6	11,8+/-0,7	8,5+/-1,7	5,9+/-1,1
D 18 d	18,4+/-2,4*	21,3+/-2,6*	3,1+/-0,6*	8,1+/-0,5*
D 18 d + R-954	6,1+/-0,6	11,9+/-1,3	7,6+/-1,2	6,3+/-1,1

Control, diabéticos y diabéticos + R-954 a los 0, 8, 12 y 18 días después de la aplicación de STZ.

* $p < 0,05$ control vs. diabéticos.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron expresados como $\pm$ ES de la media y se efectuaron análisis de varianza (ANOVA) seguidos de pruebas t de Student para comparaciones múltiples. Una $p < 0,05$ fue considerada significativa.

Resultados

La STZ indujo una diabetes insulín dependiente (DDI) asociada con marcadas alteraciones del estrés oxidativo plasmático y vasculares. La concentración de glucosa plasmática (mmol/l) se observó significativamente aumentada a partir de los 12 días y hasta los 18 días posteriores a la aplicación de STZ. El efecto de R-954, antagonista del BKB1, redujo de forma importante la hiperglucemia diabética a partir del día 12 después de la administración de STZ. MDA, un marcador de la peroxidación lipídica, se observó progresivamente aumentado en plasma a partir del día 8 luego de la aplicación de STZ, con valores aumentados de manera significativa respecto del control (nmol/100 mcl: 40, 90 y 110%, respectivamente). El tratamiento con R-954 restauró a niveles normales la peroxidación lipídica. Los niveles de GSH (nmol/100 mcl) fueron disminuidos progresiva y significativamente en el estado diabético respecto del control desde el día 8 hasta el día 18 después de la administración de STZ (-44, -57, -67%, respectivamente). Por otra parte, los valores de colesterol mostraron también diferencias significativas a los 12 y los 18 días posteriores a la STZ. La recuperación por el tratamiento con R-954 fue restaurada en parte (Tabla 1).

Arteria aorta. El estrés oxidativo en la arteria aorta se observa en la Fig. 1. El MDA aumentó progresivamente 1,5; 2,7, y 4,4 veces más, comparado con el control ($p < 0,05$), desde los 8 días hasta los 18 días después de la adminis-

tración de STZ. En cuanto al efecto de la diabetes sobre los antioxidantes como GSH, se observó una reducción progresiva temprana al cabo de 8 a 18 días luego de la aplicación de STZ (-35, -62, -68%, respectivamente; $p < 0,05$) (Fig. 2). La permeabilidad vascular medida por EB se observa en la Fig. 3. Comparada con el control, la diabetes aumentó progresivamente la permeabilidad vascular aórtica 2,3; 4, y 12 veces más a los 8, 12 y 18 días luego de la STZ. La administración de R-954, antagonista selectivo del receptor BKB1, disminuyó significativamente la glucemia, el estrés oxidativo y la permeabilidad vascular diabética y llevó los valores a términos normales ($p < 0,05$).

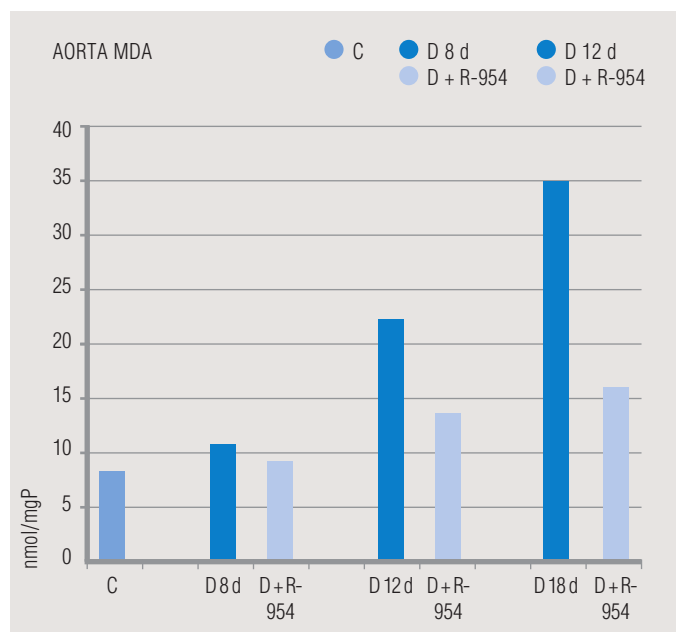


Figura 1. Concentración de malondialdehído (MDA) en tejido aórtico de animales de control (C), diabéticos y diabéticos + R-954. Los datos son $\pm$ ES de las medias. * $p < 0,05$ D vs. C; D vs. D + R-954.

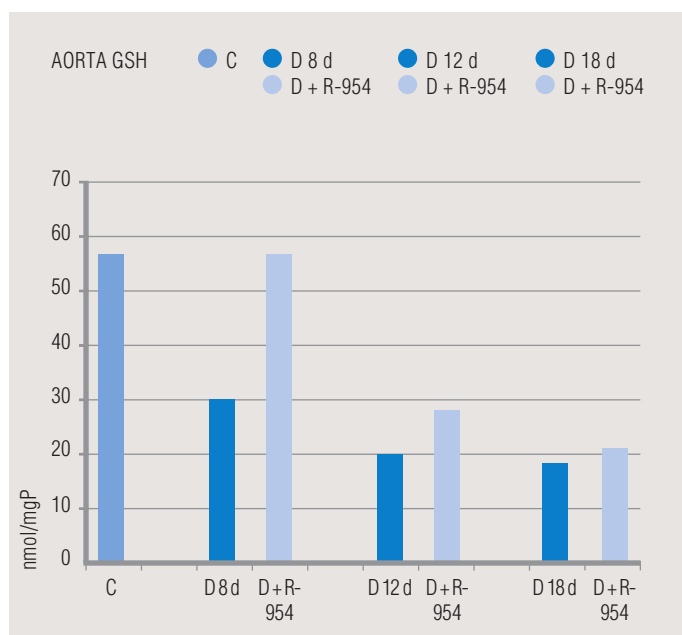


Figura 2. Determinación de GSH antioxidante en tejido aórtico de ratones control (C), diabéticos (D) y diabéticos +R954 antagonista de 0, 8, 12 y 18 días después de la aplicación de STZ. Los resultados son las medias $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ diabéticos vs. control.

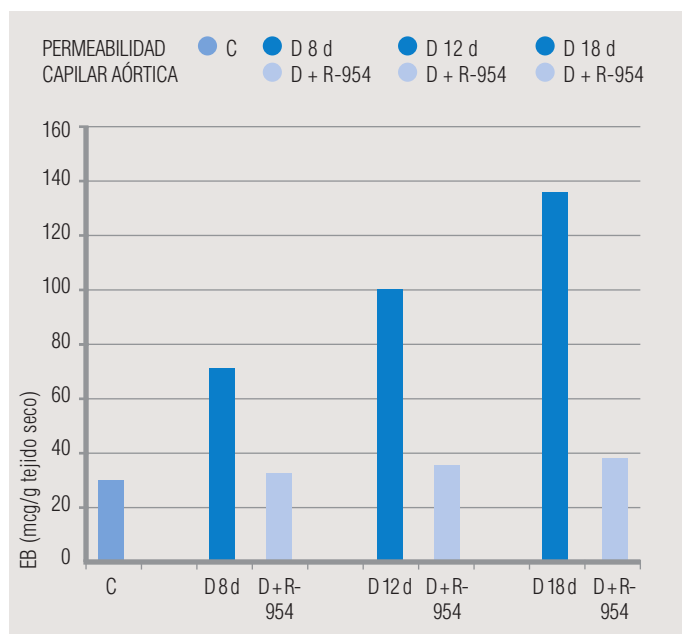


Figura 3. Permeabilidad capilar aórtica de animales de control (C), diabéticos (D) y diabéticos + R-954. Los datos significan $\pm$ ES de las medias de 6 animales por grupo. * $p < 0,05$ diabéticos vs. control; diabéticos + R-954 vs. diabéticos.

Discusión

Este estudio evidencia que la diabetes está asociada al sistema inflamatorio caliceína-cininas. La regulación y el rol potencial del sistema caliceína-cininas en la diabetes han sido demostrados por Margolius (20). En nuestro estudio, mostramos cómo la hiperglucemia diabética progresiva produce serias complicaciones tempranas en la arteria aorta. La alta concentración de glucosa aumenta progresiva y significativamente el estrés oxidativo y la permeabilidad capilar. Por otra parte, en condiciones inflamatorias –como la diabetes– se produce una activación de la inducción del receptor BKB1 que amplifica la acumulación de des-Arg9-bradicinina como resultado de la modificación de bradicinina en el sitio inflamatorio (21). La hiperglucemia ha sido aceptada como un factor esencial en el desarrollo de las complicaciones diabéticas vasculares (22). El estrés oxidativo está significativamente aumentado en la diabetes mellitus debido a la progresiva y prolongada exposición a la hiperglucemia; esto es una característica común en la diabetes, en la que la disminución de la actividad de antioxidantes es potenciada por la excesiva producción de ROS (23).

Estas observaciones han sido vistas en estudios realizados en seres humanos en los que se observan altos niveles de biomarcadores específicos de lípido-peroxidasa, lo que refleja estrés oxidativo en la diabetes (24). La disminución endotelial del ON liberado provoca la activación y la adhesión de plaquetas y leucocitos, lo que compromete la integridad de la barrera endotelial, causa sobreexpresión de genes proinflamatorios e induce a aterosclerosis (12,13). Por otra parte, las altas concentraciones de ON producen aniones superóxido (O_2^-) para formar peróxidos reactivos ($ONOO^-$), lo que reduce la biodisponibilidad y contribuye a aumentar la inflamación y el estrés oxidativo (25).

Nuestros resultados de marcadores tempranos del estrés oxidativo sin la correspondiente relación con la hiperglucemia diabética temprana podrían sugerir que en el estado prediabético ocurren modificaciones tempranas de los parámetros medidos del estrés oxidativo en plasma independiente de la hiperglucemia. Una interesante información de nuestros resultados indica que la participación del sistema caliceína-cininas es importante, dado que el antagonista del receptor BKB1 R-954 disminuye el estrés oxidativo hasta valores normales. Estos datos sugieren una nueva terapéutica de importancia del receptor BKB1 en la patología aterosclerótica diabética (26). En cuanto al efecto de la patología diabética en la arteria aorta, pudimos observar que los niveles progresivos de glucosa afectan el estrés oxidativo de la arteria.

El efecto de la diabetes sobre las complicaciones vasculares ha sido motivo de diferentes estudios (27). De acuerdo con Traub y colaboradores (28), el estrés oxidativo puede ser responsable de los cambios en la función endotelial. En estos casos, también el aumento de las ROS producido por el endotelio vascular y las células sanguíneas circu-

lantes modificarían las funciones de la barrera endotelial y aumentarían la formación de trombos (29). El aumento del estrés oxidativo observado en la arteria aorta en nuestro modelo animal sería un factor determinante de activación plaquetaria, lo cual determinaría un factor de riesgo para aterosclerosis.

La diabetes también es un factor predisponente a permeabilidad capilar y edemas, lo que puede reforzar la formación de trombos por aumentar la viscosidad sanguínea. En nuestro modelo también observamos un deterioro vascular progresivo. Los marcadores del estrés oxidativo se modifican desde el comienzo de la patología diabética; sin embargo, al observar el nivel de glucosa plasmática a los 8 días de diabetes, este no se correlaciona con las modificaciones tempranas de MDA y GSH, pero sí lo hace a los 12 y a los 18 días después de la administración de STZ. Se podría sugerir que tempranamente se producen modificaciones que afectan la integridad endotelial por el aumento temprano de ROS, independientes del nivel de glucosa. Durante el proceso inflamatorio diabético se alteran las bases morfológicas del endotelio por la acción de mediadores químicos, lo que produciría alteraciones tempranas de las uniones celulares. Por otra parte, modificaciones de los filamentos de actina y

miosina endotelial por fosforilación oxidativa aumentan los espacios interendoteliales por acción inflamatoria.

La consecuencia del antagonista R-954 sobre el bloqueo del receptor de cininas BKB1 demuestra ser doble: por un lado, el antagonista R-954 produce un efecto antidiabético –señalado por nosotros anteriormente– que consiste en una disminución de la hiperglucemia diabética (30); por otra parte, la disminución de la hiperglucemia diabética por el antagonista R-954 podría controlar los efectos del estrés oxidativo inflamatorio y, como resultado, disminuir la permeabilidad vascular y la producción de ROS, lo que mejoraría la patología diabética aórtica.

Conclusión

Todos los parámetros observados durante la hiperglucemia progresiva contribuyen al daño vascular, vía la generación de ROS con expresión del receptor inflamatorio BKB1 de cininas, en tanto que el tratamiento con el antagonista R-954 representa un nuevo enfoque terapéutico de las complicaciones aórticas diabéticas al estar involucrado el sistema calicreína-cininas en la patología diabética. [RAM](#)

Referencias bibliográficas

1. Funk SD, Yurdagül A (h), Orr AW. Hyperglycemia and endothelial dysfunction in atherosclerosis: lessons from type 1 diabetes. *Int J Vasc Med* 2012;2012:569654
2. Pyörälä K, Laakso M, Uusitupa M. Diabetes and atherosclerosis: an epidemiologic view. *Diabet Metab Rev* 1987;3(2):463-524
3. Sharma A, Bernatchez PN, de Haan JB. Targeting endothelial dysfunction in vascular complications associated with diabetes. *Int J Vasc Med* 2012;2012:750126
4. Mannucci E, Dicembrini I, Lauria A, et al. Is glucose control important for prevention of cardiovascular disease in diabetes? *Diabetes Care* 2013;36 Suppl 2:S259-63
5. Barr EL, Zimmet PZ, Welborn TA, et al. Risk of cardiovascular and all-cause mortality in individuals with diabetes mellitus, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance: the Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle Study (AusDiab). *Circulation* 2007;116(2):151-7
6. Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997;349(9064):1498-504
7. Koh GC, Peacock SJ, van der Poll T, et al. The impact of diabetes on the pathogenesis of sepsis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31(4):379-88
8. Vazzana N, Ranalli P, Cuccurullo C, et al. Diabetes mellitus and thrombosis. *Thromb Res* 2012;129(3):371-7
9. Klein R. Hyperglycemia and microvascular disease in diabetes Kelly West Lecture. *Diabetes Care* 1995;18:1138-45
10. Kolka CM, Bergman RN. The endothelium in diabetes: its role in insulin access and diabetic complications. *Rev Endocr Metab Disord* 2013;14(1):13-9
11. Kuhlencordt PJ, Gyurko R, Han F, et al. Accelerated atherosclerosis, aortic aneurism formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. *Circulation* 2001;104(4):448-54
12. Chigaev A, Smagley Y, Sklar LA. Nitric oxide/cGMP pathway signaling actively down-regulates $\alpha 4\beta 1$ -integrin affinity: an unexpected mechanism for inducing cell de-adhesion. *BMC Immunol* 2011;12:28
13. De Caterina R, Libby P, Peng HB, et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995;96(1):60-8
14. Roberts W, Riba R, Homer-Vanniasinkam S, et al. Nitric oxide specifically inhibits integrin-mediated platelet adhesion and spreading on collagen. *J Thromb Haemost* 2008;6(12):2175-85
15. Couture R, Blaes N, Girolami JP. Kinin receptors in vascular biology and pathology. *Curr Vasc Pharmacol* 2014;12(2):223-48
16. Granger DN, Rodrigues SF, Yildirim A, et al. Microvascular responses to cardiovascular risk factors. *Microcirculation* 2010;17(3):192-205
17. Minuz P, Patrignani P, Gaino S, et al. Determinants of platelet activation in human essential hypertension. *Hypertension* 2004;43(1):64-70
18. Catanzaro O, Labal E, Andornino A, et al. Blockade of early and late retinal biochemical alterations associated with diabetes development by the selective bradykinin B1 receptor antagonist R-954. *Peptides* 2012;34(2):349-52
19. Tidjane N, Hachem A, Ziad Y, et al. A primary role for kinin B1 receptor in inflammation, organ damage, and lethal thrombosis in rat model of septic shock in diabetes. *Eur J Inflamm* 2015;13(1):40-52

20. Margolius HS. Tissue kallikreins and kinins: regulation and roles in hypertensive and diabetic diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1989;29:343-64
21. Marceau F, Bachvarov DR. Kinin receptors. *Clin Rev Allergy Immunol* 1998;16(4):385-401
22. Rösen P, Nawroth PP, King G, et al. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab Res Rev* 2001;17(3):189-212
23. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo in the cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004;142(2):231-55
24. Szuchman A, Aviram M, Musa R, et al. Characterization of oxidative stress in blood from diabetic vs. hypercholesterolaemic patients, using a novel synthesized marker. *Biomarkers* 2008;13(1):119-31
25. Kuhlencordt PJ, Chen J, Han F, et al. Genetic deficiency of inducible nitric oxide synthase reduces atherosclerosis and lowers plasma lipid peroxides in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* 2001;103(25):3099-104
26. Raidoo DM, Ramsaroop R, Naidoo S, et al. Kinin receptors in human vascular tissue: their role in atheromatous disease. *Immunopharmacology* 1997;36(2-3):153-60
27. Suzuki LA, Poot M, Gerrity RG, et al. Diabetes accelerates smooth muscle accumulation in lesions of atherosclerosis: lack of direct growth-promoting effects of high glucose levels. *Diabetes* 2001;50(4):851-60
28. Traub O, Van Bibber R. Role of nitric oxide in insulin-dependent diabetes mellitus-related vascular complications. *West J Med* 1995;162(5):439-45
29. Corrado E, Rizzo M, Coppola G, et al. An update on the role of markers of inflammation in atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2010;17(1):1-11
30. Zuccollo A, Navarro M, Catanzaro O. Effects of B1 and B2 kinin receptor antagonists in diabetic mice. *Can J Physiol Pharm* 1996;74(5):586-9