

Efecto de la metformina sobre la función endotelial en pacientes con síndrome metabólico y pre-hipertensión

Effect of metformin on the endothelial function in patients with metabolic syndrome and prehypertension

58

Emma A. Armanie Cabral*, Beatriz A. Sosa-Canache**, Nicola Virgilio***, Amanda C. Duin Balza**, Beatriz Pacheco**, Rafael Hernández-Hernández**

*Departamento de Medicina Interna, Hospital Universitario "Antonio María Pineda", Barquisimeto, Venezuela; ** Consulta de Hipertensión y Factores de Riesgo Cardiovascular, Unidad de Farmacología Clínica, Decanato de Ciencias de la Salud, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto, Venezuela. ***Sección de Farmacología, Departamento de Ciencias Funcionales, Decanato de Ciencias de la Salud, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto, Venezuela.

Autor para correspondencia: Beatriz A. Sosa-Canache: Consulta de Hipertensión y Factores de Riesgo Cardiovascular, Unidad de Farmacología Clínica, Decanato de Ciencias de la Salud, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto, Venezuela, Teléfono: +58-251-259 1838, correo electrónico: beatrizsosa@ucla.edu.ve.

Este trabajo fue subvencionado por el Centro Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico, CDCHT, de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado", por fondos provenientes del proyecto 014-ME-2005. Barquisimeto, Venezuela.

Recibido: 31/05/2010

Aceptado: 18/09/2010

Resumen

El Síndrome Metabólico es una entidad compleja conformada por un conjunto de factores de riesgo de origen metabólico que tienden a presentarse juntos, vinculados a disfunción endotelial y estrés oxidativo y, es un factor de riesgo de enfermedad aterosclerótica. En el marco de este estudio se planteó como objetivo determinar el efecto de la Metformina sobre los niveles séricos y urinarios de óxido nítrico, del activador del plasminógeno tisular (tPA), del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) y, sobre los niveles séricos de malondialdehído en pacientes con Síndrome Metabólico, con glicemias alteradas en ayuna, prehipertensos. La población estuvo conformada por 15 pacientes que acudieron a la Consulta Externa de Medicina Interna del Hospital Central Universitario "Antonio María Pineda", Barquisimeto-Lara. Se encontró que hubo una disminución significativa de los niveles de peso, índice de masa corporal, circunferencia abdominal y glicemia basal, un aumento significativo en los niveles séricos y urinarios de óxido nítrico, y una disminución del PAI-1. Estos resultados podrían sugerir que la metformina es capaz de mejorar la función endotelial en pacientes con Síndrome Metabólico.

Palabras claves: Síndrome Metabólico, Metformina, Óxido Nítrico.

Abstract

The metabolic syndrome is a complex entity constituted by a set of risk factors of metabolic origin that tend to occur together. They are related to endothelial dysfunction and oxidative stress and, also related to atherosclerotic disease. The aim of this study was to determine the effects of metformin on the serum and urinary levels of nitric oxide, tissue-type plasminogen activator (t-PA), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and on the serum malondialdehyde levels in patients with the metabolic syndrome, with altered fasting glucose serum levels. The sample included 15 patients that visited the outpatient internal medicine clinic at the University Hospital "Antonio María Pineda", in Barquisimeto, Venezuela. The study showed a significant decrease in the levels of weigh, mass body index, abdominal circumference and basal glucose levels; also, a significant increase in nitric oxide serum and urinary levels, and reduction of PAI-1. These results suggest metformin was able to improve the endothelial function in patients with metabolic syndrome.

El síndrome metabólico (SM) es una entidad clínica compleja conformado por un conjunto de alteraciones metabólicas y cardiovasculares que tienden a presentarse juntos, vinculados a disfunción endotelial y estrés oxidativo, y su presentación es un factor de riesgo de enfermedad aterosclerótica. Entre los cambios metabólicos destacan la intolerancia a la glucosa y una dislipidemia caracterizada por hipertrigliceridemia y niveles bajos de colesterol-HDL.

El incremento de los casos de SM es una de las causas de la creciente epidemia mundial de diabetes mellitus tipo 2 y de enfermedades cardiovasculares. Según datos de la Federación Internacional de Diabetes (FID) las personas con SM tienen una probabilidad tres veces mayor de sufrir un síndrome coronario agudo o una enfermedad cerebrovascular y, una probabilidad dos veces superior de morir por esas causas que las personas que no lo padecen^{1,2,3}. El SM lo presentan entre el 20-25% de la población mundial⁴; recientemente, ha sido reportada la prevalencia de SM en Venezuela y México, en la población de 25 a 64 años, de 25,8% y 27,2%, respectivamente⁵.

La disfunción endotelial es un importante componente fisiopatológico del SM y de la resistencia a la insulina. En estudios realizados *in vitro* se determinó la presencia de vasodilatación inadecuada y/o vasoconstricción paradójica en arterias coronarias y periféricas en respuesta a estímulos que producen la liberación de óxido nítrico (ON). La deficiencia de ON puede deberse a una disminución en la síntesis y/o liberación, combinado con una mayor degradación debido a los altos niveles de especies reactivas de oxígeno, las cuales se producen por las alteraciones celulares en el metabolismo de los lípidos y la glucosa^{6,7}.

Las células endoteliales liberan varias sustancias que modulan el tono vascular; tales como, el óxido nítrico (ON), las prostaglandinas, el factor hiperpolarizante, las endotelinas y las sustancias reactivas de oxígeno. Aunque las mismas trabajan en concierto para regular el estado contráctil de todos los vasos sanguíneos, el ON juega un papel predominante en los vasos de gran calibre, mientras que el factor hiperpolarizante contribuye en mayor extensión a los vasos de resistencia. Numerosos receptores existen para agonistas paracrinos y endocrinos en la superficie de las células endoteliales, y cuando los mismos son activados por sus respectivos ligandos estimulan la liberación de vasodilatadores derivados del endotelio. En un endotelio sano la vasodilatación dependiente del endotelio predomina; sin embargo, cuando el endotelio está ausente o enfermo (disfunción endotelial) predomina la vasoconstricción⁸.

El SM se asocia con cambios en la proliferación de las células de la musculatura lisa y disfunción endotelial. Algunos estudios han señalado que la hiperinsulinemia anula la vasodilatación dependiente del endotelio en las grandes

arterias, probablemente por el incremento del estrés oxidativo. Estos datos pueden aportar una nueva base fisiopatológica al enlace entre hiperinsulinemia / resistencia a la insulina y aterosclerosis en los seres humanos⁹.

Varios estudios han puesto de manifiesto que la vasodilatación dependiente del endotelio es anormal en los pacientes portadores de los factores de riesgo que componen el SM. Esta anomalía en la vasodilatación dependiente del endotelio podría ser consecuencia de un descenso del ON, lo cual a su vez se ha relacionado con el aumento del estrés oxidativo y con la resistencia a la insulina.

En el presente estudio se evaluó el efecto producido por un sensibilizador de la insulina como lo es la metformina, sobre la concentración de ON, el activador del plasminógeno tisular (tPA), el inhibidor del plasminógeno tisular tipo 1 (PAI-1) y, del malondialdehído; como marcadores que reflejan el estado de la función endotelial, en pacientes con Síndrome Metabólico.

Se trató de una investigación experimental tipo ensayo clínico, cerrado, no controlado. Además, fue un estudio simple ciego, en el sentido de que el investigador que procesó las muestras de suero y orina desconocía el tratamiento que estaban recibiendo los pacientes. Asimismo, participó un médico observador ciego, quien se encargó de tomar la presión arterial y medir la circunferencia abdominal basal y al mes y medio del cumplimiento del tratamiento. La muestra la conformaron 15 pacientes provenientes de la Consulta Externa de Medicina Interna, Hospital Central Universitario "Antonio María Pineda" Barquisimeto, estado Lara.

El diagnóstico de SM se realizó siguiendo los parámetros propuestos por la Federación Internacional de Diabetes, además se incluyeron solo pacientes que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión: triglicéridos > de 150 mg/dL, HDL < de 50 mg/dL en la mujer y < de 40 mg/dL en el hombre, glicemia en ayuna (entre 100 mg/dL y 125 mg/dL), circunferencia abdominal > de 80 cm en la mujer y > de 90 cm el hombre (parámetros propuestos por la FID), además, que sus cifras de presión arterial sistólicas entre 120 y 139 mmHg y/o diastólicas entre 80 y 89 mmHg (clasificados como pre-hipertensos de acuerdo al Séptimo Informe JNC 2003)¹⁰ y, que firmaron el consentimiento escrito. Los criterios de exclusión fueron: presión arterial sistólica mayor o igual de 140 mmHg, presión arterial diastólica mayor o igual de 90 mmHg, colesterol total mayor de 240 mg/dL, triglicéridos mayor de 250 mg/dL, alteraciones renales o hepáticas. El daño renal se descartó por un nivel de creatinina sérica mayor de 1,3 mg/dL. Igualmente, se excluyeron los pacientes con niveles de transaminasas tres veces por encima del valor normal, embarazo o riesgo del mismo y lactancia, hipertensión arterial secundaria, trastornos mentales, historia de abuso de drogas, intolerancia conocida a los sensibilizadores

de la insulina (Biguanidas) y finalmente, pacientes que estuvieran recibiendo fármacos que pudieran ocasionar aumento de nitratos o nitritos y/o efecto antioxidante (inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, bloqueadores de angiotensina II, estatinas, betabloqueante, inhibidores de la fosfodiesterasa).

Se formó un grupo experimental de 15 pacientes con SM, los mismos fueron evaluados por un médico observador quien se encargó de realizar la historia clínica completa, verificar los criterios para síndrome metabólico y planificar el día para la recolección de orina de 24 horas y la toma de muestra de sangre para la determinación del malondialdehído, de los nitritos y nitratos (medición indirecta del ON, por ser éstos los metabolitos estables del ON), del activador del plasminógeno tisular (tPA) y el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) y para los exámenes paraclínicos. Estas determinaciones constituyeron los valores pretratamiento. Seguidamente, se les indicó la metformina 500 mg antes del desayuno y de la cena durante seis semanas y, no se hicieron recomendaciones dietéticas en particular y el paciente debió continuar con su dieta habitual. Los pacientes fueron evaluados cada 15 días para verificar el cumplimiento del tratamiento y una evaluación de su estado físico general. Finalmente, los pacientes fueron evaluados por el médico observador, una vez cumplidas las seis semanas del tratamiento, y les solicitaron las determinaciones en sangre. Estas últimas mediciones constituyeron los valores post tratamiento.

Para la determinación del óxido nítrico (ON) se usó un kit colorimétrico no enzimático de ON (Oxford Biomedical Research, Oxford MI 48371, USA). Se tomaron muestras de suero y orina. La orina la coleccionó el paciente a partir del día anterior de la visita (8:00 a.m.) y se alicuotizó al momento de recibirla. Para evitar la interferencia de nitratos y nitritos exógenos se les indicó a los pacientes no consumir alimentos que contengan nitratos o nitritos durante las 72 hora previas a la recolección de las muestras. Para la determinación de malondialdehído (MDA) se empleó el método de Naito et al, 1993¹¹. Para la medición del Activador del Plasminógeno tisular (tPA) y del Inhibidor del Activador del Plasminógeno tipo 1 (PAI-1) se emplearon kits comerciales (ELITEST-tPA, ELITEST-PAI, HYPHEN BioMed, FRANCIA). La significancia estadística fue determinada usando la prueba "t" de Student para datos pareados. Se consideraron significativos los valores de p menores de 0,05 ($p < 0,05$), para dos colas.

En total se evaluaron 15 individuos con criterios de SM según la FID, que tenían glicemias alteradas en ayuna, normo o pre hipertensos; cuyas edades estaban comprendidas entre $50,8 \pm 2,47$ años; (5 hombres y 10 mujeres); con un índice de masa corporal (I.M.C.) promedio de $30,51 \pm 2,84$ kg/m². Se presentan las mediciones de los diferentes parámetros antes y después del tratamiento con metformina. El número de pacientes que iniciaron el estudio fue de 33 en total, pero

2 fueron retirados por efectos adversos (diarrea, reacción adversa medicamentosa más frecuente descrita para la metformina), 8 ameritaron terapias no permitida (según criterios de exclusión) y finalmente, 8 no continuaron por causas ajenas al estudio. Por lo tanto, el porcentaje de abandono fue del 24,24%.

Efecto sobre el Perfil Metabólico:

En la **tabla 1** se presentan los resultados de los exámenes paraclínicos tales como colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL, triglicéridos, creatinina y glicemia en ayunas. En estas mediciones no hubo diferencias significativas al comparar el antes y después del tratamiento con metformina, con la excepción de un descenso significativo de la glicemia basal después de 6 semanas de tratamiento ($p = 0,03$). En el resto de los exámenes paraclínicos de rutina realizados a los pacientes como hematología completa, electrolitos (Na+ y K+), transaminasas y uroanálisis, no hubo alteraciones.

Tabla 1. Exámenes Paraclínicos de Pacientes con Síndrome Metabólico Antes y Después del Tratamiento con Metformina

	Pre Tratamiento	Post Tratamiento	Valor de p
Glicemia (mg/dL)	114,23 ± 5,51	103,22 ± 3,03	p=0,05
Colesterol Total(mg/dL)	181,71 ± 9,85	180,84 ± 6,82	p=0,77
Colesterol HDL (mg/dL)	41,82 ± 3,01	42,98 ± 2,38	p=0,37
Colesterol LDL (mg/dL)	111,50 ± 7,27	109,51 ± 7,01	p=0,83
Triglicéridos (mg/dL)	140,89 ± 14,89	145,75 ± 14,07	p=0,81
Creatinina (mg/dL)	1,04 ± 0,028	1,09 ± 0,034	p=0,18

Criterios para SM: circunferencia abdominal más dos (2) de los otros criterios

Efecto sobre la Presión Arterial y Parámetros Físicos:

Por otra parte, en la **tabla 2** se presentan los niveles de presión arterial sistólica, diastólica y media de los pacientes con síndrome metabólico, con el fin de evidenciar que los pacientes antes y después del tratamiento con metformina tenían niveles de presión arterial en posición tanto supina como sentada, que les clasificaba como pre hipertensos según el Séptimo Informe JNC¹⁰.

Tabla 2. Niveles de Presión Arterial Sistémica de Pacientes con Síndrome Metabólico Antes y Después del Tratamiento con Metformina

	Pretratamiento	Posttratamiento	Valor p
Niveles de presión arterial (mmHg)			
Sistólica (a)	133,40 ± 2,89	128,07 ± 2,81	P= 0,16
Diastólica (a)	85,40 ± 1,96	84,33 ± 1,07	P= 0,54
Media (a)	101,40 ± 2,16	103,76 ± 3,73	P= 0,61
Sistólica (s)	130,93 ± 2,67	127,07 ± 3,44	P= 0,35
Diastólica (s)	86,73 ± 1,86	83,40 ± 1,52	P= 0,06
Media (s)	101,47 ± 1,92	97,96 ± 1,85	P= 0,13

(a) acostado (s) sentado

En la **tabla 3** se muestran el peso, el I.M.C. y la circunferencia abdominal (CA) de los pacientes antes y después del tratamiento. Se observó que hubo una mejoría estadísticamente significativa en estos tres parámetros, siendo más evidente para la CA la cual de $105,07 \pm 1,33$ cm pasó a ser de $100,92 \pm 1,60$ cm.

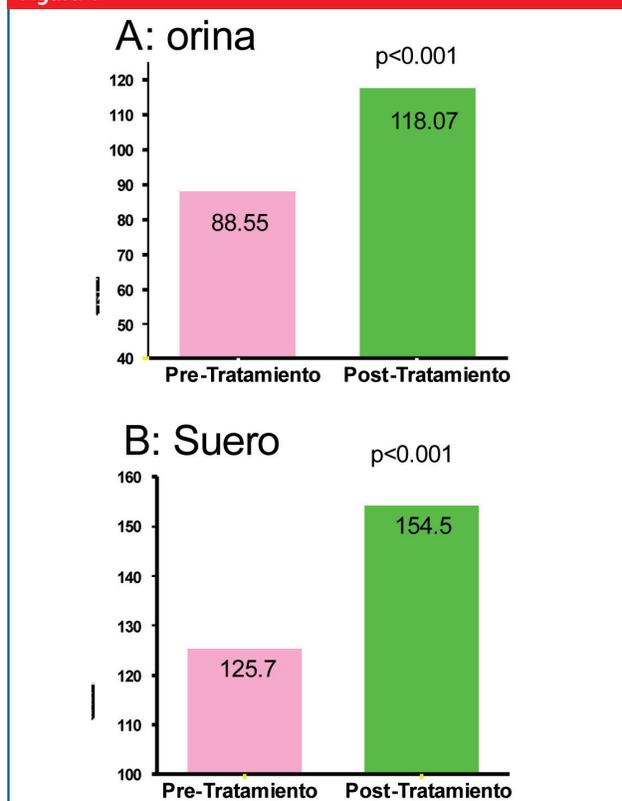
Tabla 3. Peso, Circunferencia Abdominal e I.M.C. de Pacientes con Síndrome Metabólico Antes y Después del tratamiento con Metformina

	PRE TRATAMIENTO	POST TRATAMIENTO	Valor de p
Peso (Kg)	76,47 ± 2,71	75,21 ± 2,94	P<0,01
I.M.C. (kg/m ²)	30,55 ± 0,53	29,95 ± 0,58	P<0,01
CA (cm)	105,07 ± 1,33	100,92 ± 1,60	P < 0,01

Efecto sobre los Parámetros Endoteliales y Vasculares

En cuanto a los niveles de ON, expresados como el índice de ON (NOx), que es la suma de los nitratos más los nitritos, metabolitos estables del ON, encontramos en el suero de los pacientes antes del tratamiento (niveles basales) 88,55 ± 8,30 µmol/L y en la orina de 24 horas 125,70 ± 14,85 µmol/L; y después del tratamiento (niveles post tratamiento), un NOx de 118,07 ± 9,88 µmol/L y 158,47 ± 15,21 µmol/L en suero y orina, respectivamente (Figura 1). Es decir, hubo un aumento significativo del óxido nítrico en los pacientes después de ser tratados con metformina. Además, se calculó la depuración renal de ON que fue de 1,41 ml/min y 1,14 ml/min antes y después del tratamiento, respectivamente (resultados no graficados), sin cambios estadísticamente significativos (p > 0,05).

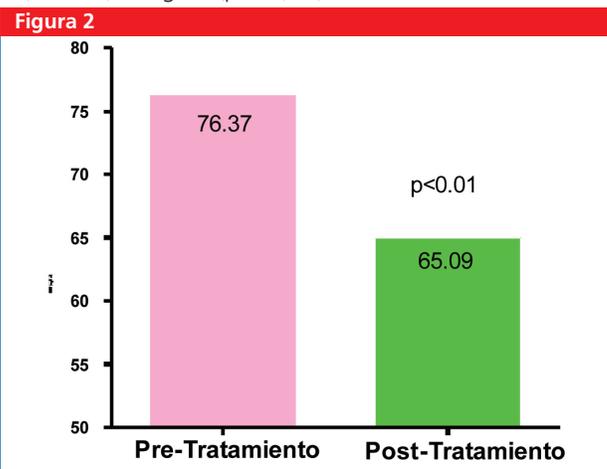
Figura 1



Niveles de Óxido Nítrico en Suero y Orina (NOx) de Pacientes con Síndrome Metabólico Antes y Después de ser tratados con Metformina.

Los niveles de malondialdehído (MDA), del activador del plasminógeno tisular (t-PA) no se modificaron de manera significativa.

En la figura 2 se representan los niveles del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), donde se evidencia una disminución significativa, de 76,37 ± 0,11 ng/ml a 65,09 ± 0,09 ng/ml (p > 0,05).



Niveles del Inhibidor del Activador del Plasminógeno tipo 1 (PAI-1) de Pacientes con Síndrome Metabólico Antes y Después de ser Tratados con Metformina.

Discusión

La patogénesis del síndrome metabólico se ha planteado como compleja y todavía hoy existen muchas interrogantes. La obesidad juega un rol preponderante ya que el tejido adiposo, sobre todo el visceral o abdominal, es muy activo en la liberación de distintas sustancias: ácidos grasos, factor de necrosis tumoral alfa, leptina, resistina, el factor inhibidor de la activación del plasminógeno tipo 1 o producido por las células endoteliales (PAI-1), IL6, etc. Estos factores pudieran favorecer la aparición de un estado proinflamatorio, de resistencia a la insulina y/o de daño endotelial.

Por otro lado, la obesidad centroabdominal tiene una estrecha relación con la insulinoresistencia. Los ácidos grasos libres no esterificados que se generan aumentan en plasma y se encuentran con un hígado y un músculo resistentes a la insulina. Esta mayor oferta de ácidos grasos en hígado conduce a: aumento de gluconeogénesis, incremento en la producción de triglicéridos, disminución de HDL, mayor producción de sustancias con actividad protrombótica (Fibrinógeno, PAI-1) y esteatosis hepática no alcohólica por depósito de triglicéridos. En nuestro estudio hubo una disminución del PAI-1 (p<0,05). Este resultado está en consonancia por lo descrito por otros investigadores, la metformina además de reducir la glucosa en plasma por acciones extrahepáticas, se ha comprobado que incrementa la actividad fibrinolítica al inhibir el inhibidor del activador tisular plasminógeno¹², lo cual contribuye al efecto cardioprotector de este fármaco.

La función endotelial normal depende de la secreción balanceada de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras por parte de las células endoteliales. Por lo tanto, la medición de cualquiera de esas sustancias permite hacer una evaluación de dicha función endotelial. Los factores que conforman el SM (presión arterial elevada, dislipidemia, hiperglicemia) producen disfunción endotelial, la cual

se manifiesta como una disminución de la vasodilatación dependiente del endotelio. Así, una manera de evaluar el estado funcional del endotelio es mediante la medición del óxido nítrico. La vida media de esta molécula es muy breve, por lo que se hace difícil su medición en los fluidos corporales. Es por ello, que se miden los nitritos (NO₂⁻) y nitratos (NO₃⁻), los cuales son el producto de la oxidación del ON¹³ y son relativamente estables en sangre y orina. La medición de su concentración se emplea como un indicador de la formación endógena de ON por la célula endotelial^{14,15}, y se expresa como el índice de ON (NOx) que es la suma de los nitratos más los nitritos.

Los pacientes incluidos tenían la particularidad de que, además de tener el criterio de la cintura abdominal por encima de los valores establecidos, todos los pacientes tenían glicemias alteradas en ayuno, lo que los confinaba a una verdadera condición de pre-diabéticos y justificaba el uso de sensibilizadores de la insulina, como la metformina.

Al igual que los resultados de otros estudios con metformina, encontramos que nuestros pacientes lograron un pequeño descenso significativo de peso y de I.M.C. de $76,47 \pm 2,71$ a $75,21 \pm 2,94$ Kg. y de $30,51 \pm 0,53$ a $29,96 \pm 0,58$ Kg./m² (de peso e índice de masa corporal respectivamente), lo que nos permite confirmar aun por mecanismo no aclarado que la metformina favorece disminución del peso corporal. El porcentaje de pacientes en quienes hubo esta disminución en el peso fue del 80,0% y en el IMC del 73,3%. También, el Diabetes Prevention Research Group, en el 2002¹⁶, demostró una reducción del 31% en la progresión de intolerancia a la glucosa a diabetes utilizando metformina, pero sólo en pacientes menores de 60 años; por otra parte; en el presente estudio, se evidenció un descenso significativo de la glicemia basal (de $114,23 \pm 5,51$ a $102,37 \pm 3,04$ mg/dL $p=0,03$), lo que pudiese traducirse en una disminución del riesgo a desarrollar diabetes mellitus tipo 2.

Es interesante resaltar que los pacientes incluidos en este estudio presentaban cifras de presión arterial que los calificaba como pre-hipertensos (según el Séptimo Informe JNC, 2003). Esto además de ser un criterio de inclusión se hizo con la finalidad de que los pacientes no ameritaran tratamiento con fármacos antihipertensivos que pudieran modificar per sé los niveles de ON y otros de los marcadores medidos. Además, por el hecho de que fueran pre-hipertensos, y no hipertensos, no se podrían atribuir nuestros resultados a una disminución significativa en la presión arterial. Asimismo, algunos estudios con pacientes hipertensos tratados con antagonistas del receptor de la angiotensina, la disminución de la presión arterial aumentó el ON^{17,18}.

En este estudio se encontró que los pacientes presentaban niveles de ON séricos y urinarios basales de $88,55 \pm 8,30$ $\mu\text{mol/L}$ y $125,70 \pm 14,85$ $\mu\text{mol/L}$ respectivamente; y posterior al tratamiento con metformina a dosis de 500 mg antes del desayuno y de la cena durante 6 semanas; los niveles aumentaron a $118,07 \pm 9,88$ $\mu\text{mol/L}$ y $158,47 \pm 15,21$ $\mu\text{mol/L}$ en suero y orina respectivamente, $p<0,01$. Esto podría indicar que la metformina mejora la función endotelial, o que, mejorando los niveles de glicemia (aun sin estar éstos en valores considerados para diagnóstico de

diabetes (> 125 mg/dl), aumentan los niveles de ON como una expresión de mejoría de la disfunción endotelial.

Durante los últimos años, se ha logrado un entendimiento sustancial de la vía arginina/SONE/ON y de cómo ésta modula la reactividad vascular. Sin embargo, debido a la complejidad de la química, bioquímica y biología molecular del ON y sus vías de señalización y aunado a las posibles factores implicados en la disfunción endotelial presente en los pacientes con SM, hay varios posibles blancos terapéuticos que podrían ser usados para mejorar la función endotelial y mejorar el pronóstico en esta patología y en otras.

En conclusión, la metformina a la dosis de 500 mg dos veces al día durante seis semanas, produjo una disminución significativa del peso, IMC, CA y glicemia basal en pacientes con síndrome metabólico que tenían glicemias alteradas en ayuno. Igualmente, se observó un aumento significativo en los niveles séricos y urinarios del óxido nítrico y una disminución del PAI-1, lo que sugiere que este fármaco es capaz de mejorar la función endotelial. Es decir, podemos sugerir que el insulinosensibilizador, metformina, es capaz de mejorar la función endotelial a los pacientes con síndrome metabólico.

Referencias

1. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2001; 24(4): 683-689.
2. Reaven G. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988; 37:1595-1607.
3. International Diabetes Federation. *Diabetes Atlas*. 2003; 2ed. Brussels: IDF; 2003
4. Dunstan DW, Zimmet PZ, Welborn TA, De Courten MP, Cameron AJ, Sicree RA, et al. The rising prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance. The Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle Study. *Diabetes Care*. 2002. 25: 829-834.
5. Shardgrodsky H., Hernández-Hernández R. et al. CARMELA: Assessment of Cardiovascular Risk in Seven Latin American Cities. *An. J. Med.* 2008; 121: 58-65.
6. Rastaldo R., Pagliaro P., Cappello S., et al. Nitric Oxide and cardiac function. *Miner-view. Life Sciences*. 2007; 81: 779-793.
7. Maxwell A. Mechanisms of Dysfunction of Nitric Oxide Pathway in Vascular Diseases. *Review. Nitric Oxide: Biology and Chemistry*. 2002; 6; 2: 101-124.
8. Harrison D, Cai H. Endothelial control of vasomotion and nitric oxide production. *Cardiol Clin*, 2003; 21: 289-302.
9. Arcaro G, Cretti A. Insulin causes endothelial dysfunction in humans: Sites and mechanisms. *Circulation*. 2002; 105:576-582.
10. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *JAMA*. 2003; 289(19): 2560-2572.
11. Naito Chikayuki, Kawamura Mitsunobu, Yamamoto Yoshihiro. Lipid Peroxides as the Initiating Factor of Atherosclerosis. *Ann. N. Y. Acad Sci*; 1993. Mar.15; 676: 27-45.
12. Kirpichnikov D, McFarlane S, Sowers JR. Metformine: an update. *Ann Intern Med*. 2002; 137: 25-33.
13. Baylis C, Vallance P. Measurement of nitrite and nitrate levels in plasma and urine- what dose this measure tell us about the activity of the endogenous nitric oxide system? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1998; 7: 59-62.
14. Moshage H, Kok B, Reiter R, et al. Nitrite and nitrate determination in plasma: A critical evaluation. *Clin Chem*. 1995; 41: 892-896.
15. Jungersten L, Edlund A, Petersson AS, Wennmalm A. 1996. Plasma nitrate as an index of nitric oxide formation in man: analyses of kinetics and confounding factors. *Clin Physiol*. 1995; 16: 369-370.
16. Diabetes Prevention Research Group: Reduction in the evidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Eng J Med*. 2002; 346: 393-403.
17. Pierdomenico SD, Cipollone F, Lapenna D, et al. Endotelial function in sustained and white coat hipertensión. *Am J Hypertens*. 2002; 15: 946-952.
18. B. Sosa Canache, Armas-Padilla, Armas-Hernández, R. Cammarata, B. Pacheco, J. Guerrero, A.R. Carvajal and Hernández-Hernández. Nitric Oxide and and Malondialdehyde levels in healthy Normotensive Subjects and Patients with Hypertension. *Current Advances in Hypertension*. 2004. Monduzzi Editore; 1; 203: 143-206.