

Trabajo original

**CARACTERIZACION Y CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS
ENDOTELIALES DE RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS
ALIMENTADAS CON FRUCTOSA**

**Carina Lembo*, Nicolás Renna^{#*}, Emiliando Diez^{#*}, Marcela Vazquez-Prieto* y
Roberto Miatello^{#*}**

[#]Facultad de Ciencias Médicas - Universidad Nacional de Cuyo,

*Laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular. Instituto de Medicina y Biología
Experimental de Cuyo, CONICET.

Correo electrónico de contacto: clemb@fcm.uncu.edu.ar

RESUMEN

Objetivo: Examinar cómo se ve afectada la participación de las células progenitoras endoteliales (CPE) por la resistencia a la insulina (IR) asociada a un modelo experimental de síndrome metabólico (SM), generado por la administración crónica de fructosa a ratas espontáneamente hipertensas.

Material y métodos: Ratas WKY y SHR, macho, distribuidas en 4 grupos (n=8 c/u): WKY: controles; FFR: WKY recibiendo fructosa en agua de bebida al 10 % (v/v) durante 6 semanas; SHR; FFHR: SHR recibiendo fructosa en agua de bebida al 10 % (v/v) durante 6 semanas. Al finalizar el protocolo se determinó: presión arterial sistólica, variables bioquímicas, índice HOMA, cuantificación por citometría de flujo de los niveles de CPE en sangre periférica y en médula ósea, inmunofluorescencia en cultivo celular, para identificar los marcadores CD34 y VEGFR-2, recuento de colonias de CPE y actividad de NAD(P)H-oxidasa en tejido aórtico.

Resultados: Se confirmó el modelo experimental en base a las variables metabólicas analizadas. Se observó una disminución en los niveles de CPE; en sangre periférica y médula ósea, la que se hace más importante en los grupos de animales tratados con fructosa. En estos también hay menor número de colonias de CPE desarrolladas en cultivo celular y presentan un aumento en los niveles de estrés oxidativo, estimado por la actividad de NAD(P)H oxidasa.

Conclusión: el SM causado por la administración crónica de fructosa en FFHR ha demostrado generar una disminución en los niveles de CPE, así como en su capacidad funcional. Los mecanismos intracelulares que producen este fenómeno podrían estar desencadenados por el grado de IR que presenta este modelo experimental.

Palabras clave: resistencia a la insulina; células progenitoras endoteliales

ABSTRACT

Characterization and quantification of endothelial progenitor cells from spontaneously hypertensive fructose-fed rats

Objective: To examine alterations in participation of endothelial progenitor cells (EPC) because of insulin resistance (IR) associated with an experimental model of metabolic syndrome (MS) generated by chronic administration of fructose to spontaneously hypertensive rats (SHR)

Material and methods: WKY and SHR rats, male, were distributed into 4 groups (n = 8 c/u): WKY: control; FFR: WKY receiving fructose in drinking water to 10% (v/v) for 6 weeks, SHR; FFHR: SHR receiving fructose in drinking water to 10% (v/v) for 6 weeks. At the end of the protocol the following variables were determined: systolic blood pressure, biochemical variables, HOMA index, levels of EPC quantified by flow cytometry in peripheral blood and bone marrow, immunofluorescence in cell culture to identify markers CD34 and VEGFR-2, EPC colony count and NAD(P)H-oxidase activity in aortic tissue.

Results: We confirmed the experimental model based on metabolic variables analyzed. A decrease in the levels of CPE, in peripheral blood and bone marrow, which becomes more important groups of animals treated with fructose was observed. In these groups there are also fewer colonies of developed EPC in cell culture and exhibit an increased levels of oxidative stress, estimated by the activity of NAD(P)H-oxidase.

Conclusion: the SM caused by chronic administration of fructose in FFHR has proven to generate a decrease in the levels of CPE, as well as its functional capacity. The intracellular mechanisms that produce this phenomenon could be triggered by the degree of IR presented in this experimental model.

Key words: insulin resistance; endothelial progenitor cells

Introducción

Las células progenitoras endoteliales (CPE) corresponden a una subpoblación celular derivada de médula ósea que salen a la circulación sanguínea en respuesta a diversos estímulos como factores de crecimiento, citoquinas proinflamatorias, hipoxia e injuria vascular¹.

Se identifica a las CPE por la expresión de tres marcadores de superficie celular: CD34, que es una proteína involucrada en la interacción de la célula progenitora con el parénquima estromal de la médula ósea; VEGFR-2, un receptor tirosina quinasa encargado de mediar las funciones celulares de VEGF (factor de crecimiento de endotelio vascular) y CD133; un marcador involucrado en las funciones de auto-renovación y diferenciación características de una "stem-cell". Este último se encuentra presente en médula ósea, pero se va perdiendo una vez que la célula pasa a la circulación periférica. Se ha postulado que estas células son multipotentes y tienen la capacidad de diferenciarse a célula endotelial madura y tomar parte así de los procesos de neovascularización y reendotelización vascular².

El estrés oxidativo ha sido postulado como causa de daño cardiovascular al producir un acortamiento en la vida media y una alteración de las funciones de las CPE, acelerando la senescencia de las mismas a través de un mecanismo oxidativo^{3,4}.

Las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) proveen un modelo genético útil para el estudio de la hipertensión esencial⁵. Además, la alimentación de SHR con dietas enriquecidas en hidratos de carbono, especialmente fructosa, ha demostrado inducir insulino-resistencia (IR), hiperinsulinemia y dislipidemia, asociadas con una elevación de la presión arterial.

La IR relacionada con este modelo, probablemente podría deberse a un defecto en la actividad del receptor de insulina y a cambios en la cascada post-receptor, proporcionando un modelo de IR inducida que se ha utilizado ampliamente para

evaluar los mecanismos fisiopatológicos de los cambios metabólicos y cardiovasculares asociados con el síndrome metabólico (SM)⁶.

Una relación recíproca entre la IR y la disfunción del endotelio vascular ha sido recientemente identificada como un factor importante en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

En el presente trabajo se postula la hipótesis que asocia los cambios en el comportamiento de las CPE a la IR, el estrés oxidativo y la disfunción endotelial presentes en este modelo experimental de SM, analizando los niveles de CPE, su potencial proliferativo y su expresión fenotípica.

Materiales y métodos

Animales y diseño experimental:

Ratas Wistar Kyoto (WKY) y SHR de 30 días de edad fueron alimentadas con una dieta comercial estándar ad libitum y mantenidas en condiciones de temperatura controlada (20 °C), humedad, y un ciclo de 12 hs de luz / oscuridad.

Los animales de cada cepa fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos, totalizando cuatro grupos (n = 8 cada uno) y tratados durante un período experimental de 10 semanas.

Grupo I: WKY.

Grupo II: FFR (fructose-fed rats) WKY que reciben solución al 10% de fructosa (Parafarm, Buenos Aires, Argentina) en el agua de bebida.

Grupo III: SHR.

Grupo IV: FFHR (fructose-fed hypertensive rats): SHR recibiendo solución al 10% de fructosa en el agua de bebida.

Medición de la presión arterial sistólica:

La presión arterial sistólica (PAS) se controló por un método no invasivo (Non Invasive Blood Pressure System, CODA, Kent Scientific Corporation, USA) que se

basa en registrar el volumen de la presión, utilizando para esto un sensor que mide las diferencias de volumen en la cola. Los animales fueron ambientados previamente en el aparato antes de la medición.

Determinaciones bioquímicas:

La insulina plasmática fue determinada mediante radioinmunoanálisis (Coat-A-Count, Siemens, Los Angeles.) Los niveles de glucosa en plasma fueron analizadas mediante un método colorimétrico comercial (Wiener lab., Argentina). La evaluación del modelo homeostático (HOMA) se usó como un índice para medir el grado de resistencia a la insulina y se calculó mediante la fórmula: $[\text{insulina } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glucosa } (\text{mmol/L}) / 22,5]^7$. Tres días antes de finalizar el período experimental, se llevó a cabo la prueba de tolerancia a la glucosa (GTT). Las ratas, en ayuno desde la noche anterior, fueron ligeramente anestesiadas con pentobarbital y se administró glucosa (2 g/Kg i.p.) Las muestras de sangre fueron tomadas a los 0, 30, 60 y 90 minutos después de la inyección para determinar la concentración de glucosa en plasma. El área total bajo la curva fue calculada como mmol/L/90 min.

Obtención de las muestras de médula ósea:

Al final del periodo experimental, las ratas fueron anestesiadas con ketamina (35 mg/Kg i.p.) y xilacina (15 mg/Kg i.p.) y sacrificadas.

Se extrajo fémur y tibia para obtener la médula ósea. El extremo del fémur fue cortado con bisturí para eliminar la cadera y las articulaciones de rodilla y así exponer la médula. De igual manera, la tibia fue cortada para quitar la rodilla y las regiones adyacentes al tobillo. A continuación, una jeringa de 5 mL llena con medio de cultivo RPMI con una aguja 25 / 8 se insertó en un extremo del hueso (utilizando pinzas para sostener el hueso) y se lavó el mismo con medio de cultivo, recolectando el material medular sobre un tubo Falcon de 15 ml, teniendo la precaución de mover la aguja de

la jeringa hacia arriba y abajo dentro del hueso para disgregar el tejido, de manera de obtener una suspensión celular.

Citometría de flujo:

Se realizó con un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Bioscience Becton Dickinson, San José CA, EE.UU.). Las muestras de sangre heparinizada y médula ósea fueron tratadas con solución de lisis (BD Bioscience) diluido 1/10 para la lisis de eritrocitos en condiciones de ligera hipotonía para preservar los leucocitos. Tras el lavado con PBA (solución tampón fosfato 1X, el 0,01% de BSA, azida sódica al 0,02%) y centrifugación a 1400 rpm durante 10 minutos, en las células se marcaron con FITC los anticuerpos monoclonales: anti-CD34 (BD Bioscience) y PE anti-VEGFR-2 (BD Bioscience). Sus correspondientes isotipos (IgG_{2a}) fueron utilizados para evitar uniones inespecíficas. El análisis de los datos se llevó a cabo por el software CellQuest (Becton Dickinson, San José CA, EE.UU.).

Separación celular magnética por selección positiva:

La suspensión celular de médula ósea se centrifugó 10 minutos a 1500. La fracción de células mononucleares se separó por centrifugación con gradiente de Ficoll-Paque PREMIUM 1.084 (GE Healthcare Bio-Sciences). Esta fracción mononuclear se marcó con anti-VEGFR-2 unido a PE (BD Bioscience), luego las células VEGFR-2⁺ fueron incubadas con una suspensión de partículas magnéticas recubiertas un anticuerpo dirigido contra el fluoróforo PE (BD Imag Particles) y se colocaron en un campo magnético (BD Imagnet), así las células marcadas con PE migraron hacia la pared del tubo, dejando en suspensión la fracción de células negativas, que fueron eliminadas por sucesivos lavados con PBA. Luego del tercer lavado, el sobrenadante fue eliminado y la fracción de células positivas (células adheridas a las paredes del tubo) fue removida con medio RPMI y colocadas en un frasco de cultivo.

Las células se cultivaron en medio RPMI (Invitrogen Co.) suplementado con suero fetal bovino al 20%, stem cell factor 100ng/ml, vascular endothelial growth factor 10 ng/ml, Flt-3 0,01ml/ml, penicilina-streptomina: 100 U/ml y100ug/ml en un frasco de cultivo (EPP Switzerland) previamente recubierto con gelatina al 2%.

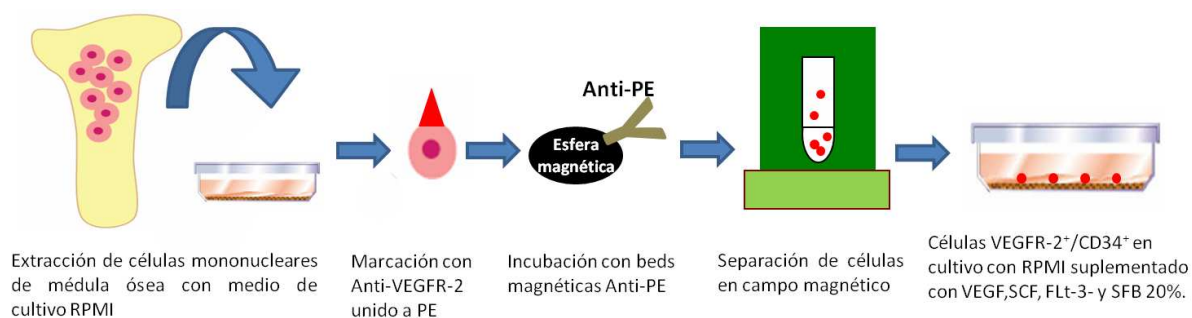


Figura 1: separación de CPE por selección inmunomagnética y posterior cultivo celular

Inmunofluorescencia:

Una vez obtenido el cultivo celular se procedió a constatar la pureza del mismo, para esto se realizaron tinciones inmunofluorescentes de las células previamente fijadas en paraformaldehído. Luego se incubaron durante 20 minutos en NH₄Cl 50 mM a temperatura ambiente para reducir la autofluorescencia, y luego durante 30 minutos con solución de bloqueo (solución tampón fosfato 0,2% de BSA, 0,01% saponina). Después los tejidos se incubaron con los siguientes anticuerpos monoclonales primarios: anti-CD34 (1/200 BD), anti-VEGFR-2 durante la noche a 4°C. Después de varios lavados con solución de bloqueo, los cortes se incubaron con los anticuerpos secundarios: anti-rabbit FITC (1/500Sigma), anti-gout TRITC (1/500, Sigma). Para la detección de inmunofluorescencia se usó un montaje especial (Dako) para mejorar la vida de fluoróforos. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal Olympus FV-1000, y fueron analizadas con el software Olympus Fluoview.

Ensayo de formación de colonias de CPE

Se realizó un ensayo de formación de colonias de CPE modificado. Luego de obtener la suspensión celular mediante separación magnética se realizó un recuento celular de la misma, de manera de sembrar en cada frasco de cultivo un millón células por mililitro.

Al quinto día se contaron 20 campos por cada frasco de cultivo con objetivo 40x en microscopio invertido Nikon ELWD 0.3/OD75.

Actividad de NAD(P)H-oxidasa en homogenados de arteria aorta

La reacción de quimioluminiscencia producida por la lucigenina se utilizó para determinar la actividad de NAD(P)H oxidasa en homogenados de arteria aorta. Los segmentos de aorta abdominal fueron extraídos inmediatamente después del sacrificio y se incubaron con buffer Jude-Krebbs, luego se adicionó β NADPH como sustrato, y se midió la luminiscencia en fluorómetro (Fluoroskan Ascent, Lab Systems, FL, USA) en forma continua durante 3 minutos. La actividad enzimática se ajustó al peso del tejido arterial y se expresó en cuentas por minuto por miligramo de tejido, como unidades relativas de luminiscencia (URL).

Análisis estadístico:

Los resultados se expresan como media \pm SEM. Los datos fueron analizados con las pruebas ANOVA de una vía o Kruskal-Wallis seguidas de los post test de Bonferroni o Dunn según corresponda. La significación estadística se determinó con un valor de P menor a 0,05.

Resultados

Determinaciones bioquímicas

La administración crónica de fructosa induce severas alteraciones incluidas en el grupo de factores de riesgo que caracterizan al SM. La comparación entre los índices HOMA evidencia que los grupos FFR y FFHR desarrollan intolerancia a la glucosa, en comparación con los controles WKY (Tabla 1) ($p < 0.001$ v WKY y SHR).

Por otro lado, los animales FFR y FFHR también mostraron diferencias significativas en los valores de triglicéridos y colesterol HDL, respecto de sus controles. La tabla 1 muestra también el curso que siguen los valores de PAS hasta el final del período experimental. Para la décima semana, los grupos FFR y SHR presentan un incremento significativo en la PAS comparados con el grupo control ($p < 0.001$ v C), el incremento que presenta el grupo FFR es menor pero también significativo.

Variable	WKY(n=8)	FFR (n=8)	SHR (n=8)	FFHR(n=8)
Glucemia en	4.88± 0.14	6.44±0.18*	5.0±0.19	6.5±0.19*^
Triglicéridos	0.8 ± 0.01	0.9 ±0.01	1.8 ±0.02*#	1.9 ± 0.1*#
índice HOMA	4.32 ± 0.1	7.20 ± 0.1*	10.93±0.1*#	14.1±0.4*^
Colesterol HDL	22,5±0,7	19,3±0,9*	12,2±0,8*#	13,6±1,2*#
Presión arterial sistólica (mmHg)				
Basal	105±3	102±1	103±1	106±3
5 semanas	113±2	131±3*	161±3*	162±2*#
10 semanas	120±1,3	136±3 *	177±1*#	181±1*#

Tabla 1: Variables metabólicas y presión arterial. Los símbolos indican: *

$P < 0.001$ vs WKY, ^ $P < 0.001$ vs SHR, # $P < 0.01$ vs FFR.

Análisis por citometría de flujo de los niveles de CPE

Las CPE de médula ósea pertenecen a la fracción de células mononucleares; éstas pueden ser identificadas por su bajo side scatter usando un gate morfológico. Una vez identificada ésta fracción celular, se analizó en forma individual; un gate para las células CD34⁺ y otro para las VEGFR-2⁺, y en la intersección de ambos gates se identificó a las células CD34⁺/ VEGFR-2⁺ en el cuadrante superior derecho. Al cuantificar las muestra de médula ósea y sangre periférica por citometría de flujo, se observó un marcado descenso en los niveles de CPE en los animales tratados con fructosa: (% en sangre periférica) WKY: 0,15±0,02, FFR: 0,008±0,005*#, SHR: 0,11±0,005, FFHR: 0,05±0,005*# el cual se hace mayor en el grupo FFHR (P<0,01), (% en médula ósea) WKY: 0,30±0,06, FFR: 0,18±0,01*^, SHR: 0,25±0,09 y FFHR: 0,06±0,02*^ . Estos resultados sugieren que la administración de fructosa afecta los niveles de CPE incluso en sus estadios más inmaduros en médula ósea.

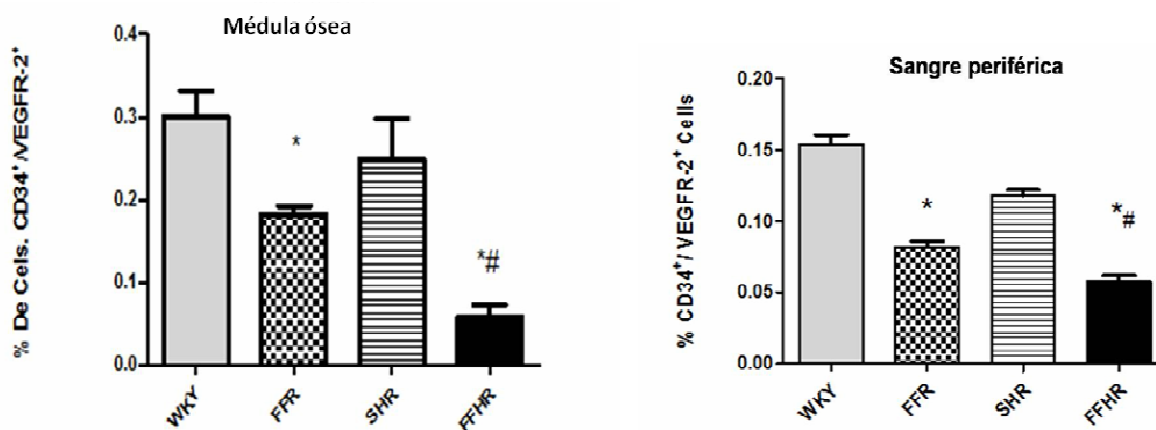


Figura 2. Los resultados demuestran una disminución en los niveles de CPE respecto del control, medidos por citometría de flujo, el cual se hace más importante en los dos grupos de animales tratados con fructosa. Los símbolos indican * p<0.01 vs WKY; # vs SHR.

Ensayo de formación de colonias de CPE

El número de colonias por campo se contaron al quinto día y resultó ser significativamente menor en el grupo FFHR ($1,25 \pm 0,91^*$) que en WKY ($3,4 \pm 0,82$) y SHR ($2,5 \pm 0,98$) y no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el grupo FFR ($3 \pm 0,94$) * $P < 0,01$ vs WKY y SHR.

Este resultado podría indicar que la administración de fructosa altera el desarrollo de las colonias de CPE, probablemente por provocar un acortamiento en su vida media.

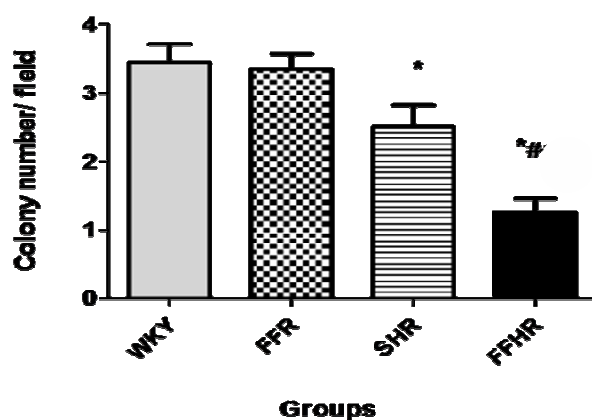


Figura 3: Efecto de la administración de fructosa sobre la formación de colonias de CPE en cultivo celular de médula ósea. Es interesante observar el menor desarrollo de colonias en SHR a pesar de que posee mayores niveles de CPE. Se podría atribuir el mayor nivel de IR que expresa este grupo como posible causante de esta diferencia. Los símbolos indican: * $p < 0.01$ vs WKY; # vs SHR.

Inmunofluorescencia

En las imágenes obtenidas por inmunofluorescencia se pudo observar que un 100% de las células expresaron los marcadores de CPE, confirmando así la efectividad del método de separación empleado.

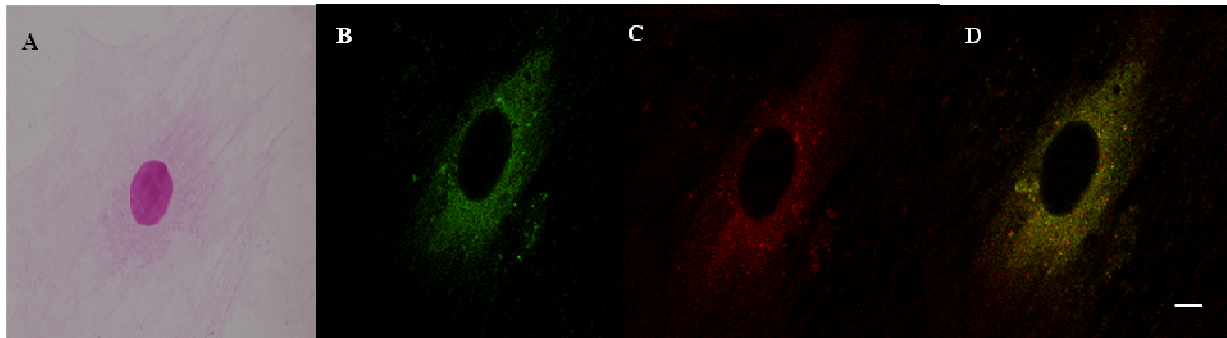


Figura 4: A. Morfología de CPE, tinción con hematoxilina y eosina. Inmunofluorescencia de CPE en cultivo celular. B: CD34-FITC (verde). C: VEGF-2-PE (rojo). D: Co-localización de ambos marcadores. La barra indica 2 μ (600x).

Actividad de NAD(P)H-oxidasa

El grado de estrés oxidativo se interpretó a través la medición de la actividad de la enzima NAD(P)H. Se observó una diferencia que resultó significativa en los grupos tratados con fructosa; WKY: 38.3 \pm 0.16, FFR: 50.14 \pm 0.95*, SHR: 66.26 \pm 0.94*, FFHR: 160.65 \pm 0.71*#, (*p < 0,01 vs WKY; # vs SHR) siendo esta diferencia mayor en el grupo FFHR.

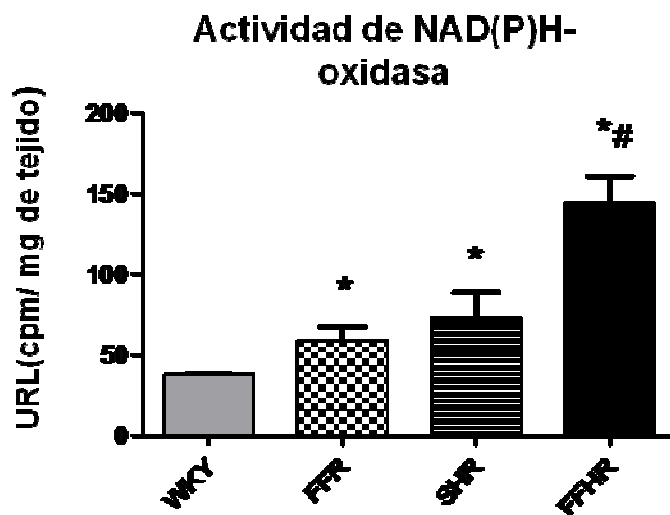


Figura 5: Efecto de la administración de fructosa sobre el estado oxidativo. Se observó una diferencia significativa en la actividad de NAD(P)H-oxidasa medida en homogenados de aortas.*p < 0.05 vs. WKY and # vs. SHR.

Discusión

La alimentación con fructosa a ratas hipertensas proporciona un modelo útil de SM, confirmando datos postulados en estudios anteriores en este modelo experimental⁸.

La combinación de estos dos modelos experimentales (FFR y SHR) permite evaluar en forma simultánea los factores genéticos y ambientales, lo cual representa un modelo de un cuadro clínico prevalente. Como se observa en la Tabla 1, las condiciones metabólicas son muy similares a las del SM; los animales presentan altos niveles de triglicéridos, bajo colesterol HDL, glucemia en ayunas ligeramente superior y curva de tolerancia oral a la glucosa muy alterada.

Las CPE derivadas de médula ósea, identificadas como CD34⁺/VEGFR-2⁺/CD133⁺, pueden eventualmente diferenciarse a célula endotelial madura. Hill *et al*⁹ (2003) postuló que la disfunción de las CPE claramente se correlacionó con el grado de afección cardiovascular sumada a varios factores de riesgo como la hipertensión, dislipidemia, diabetes mellitus y el tabaquismo. Fadini *et al*¹⁰ (2006) mostró una estrecha correlación negativa entre los niveles de CPE y el SM. En nuestro estudio se observó una disminución de los niveles de CPE en médula ósea y sangre periférica, medidos por citometría de flujo en los grupos de animales que recibieron fructosa en comparación con sus controles WKY y SHR, siendo FFHR el grupo más afectado. Este estudio *in vivo* es congruente con los resultados de trabajos *in vitro* publicados por otros grupos que reportaron una disminución del número de CPE cultivadas en condiciones de hiperglucemia.

Al intentar estudiar cómo se ve afectado el potencial proliferativo de las CPE en este modelo experimental, se pudo ver que está disminuido en los animales tratados con fructosa con respecto a sus controles. Es interesante destacar que en el grupo SHR el crecimiento de las células es menor que en el FFR, a pesar de presentar mayores niveles de CPE tanto en sangre circulante como en médula ósea; esto podría deberse

a que las ratas SHR tienen niveles de IR más elevados, hecho que se interpreta por los mayores valores de índice HOMA, que fueron medidos al caracterizar el modelo.

Evidencias recientes sugieren que varias de las anomalías asociadas con la IR, como la reducción de la biodisponibilidad de NO, una mayor producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la baja regulación de las vías de señalización intracelular, tienen el potencial de alterar las funciones de las CPE.

El aumento en la producción de ROS es uno de los hechos más relevantes que implica la IR y este fenómeno afecta directamente a la función de las CPE, se demostró que las CPE son sensibles a los oxidantes, y si se las trata con H_2O_2 sufren aumento de la apoptosis y disminución de la formación de capilares. También ha sido demostrado que candesartan, un bloqueante de los receptores tipo 1 de angiotensina II, mejora la disfunción de las CPE a través de un mecanismo anti-oxidante¹¹. También se propone que en el curso crónico de la diabetes, las altas concentraciones de glucosa inhiben la proliferación de las CPE y este efecto se asocia con la excesiva producción de ROS.

Existe amplia evidencia que demuestra que el tejido vascular es una fuente rica de especies reactivas del oxígeno (ROS) como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el óxido nítrico (NO). En este escenario se ha propuesto a la determinación de la actividad de NAD(P)H-oxidasa como el mejor representante del estado redox de los vasos sanguíneos ya que es la principal fuente de ROS¹². En el presente trabajo se midió esta variable y se observó que existe una gran diferencia en la actividad de la enzima en los grupos tratados con fructosa en comparación con los grupos control. Este resultado apoyaría la idea de un alto grado de daño endotelial e inflamación en los vasos de este modelo experimental.

En conclusión, el SM causado por la administración crónica de fructosa en ratas espontáneamente hipertensas (FFHR) ha demostrado generar una disminución en los

niveles de CPE, así como en su capacidad funcional. Los mecanismos intracelulares que producen este fenómeno podrían estar desencadenados por el grado de IR que presenta este modelo experimental.

Referencias bibliográficas

1. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964 –7.
2. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34⁺ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 2000; 95: 952–958.
3. Zangh W, Wang XH, Chen SF, Zhang GP, Lu N, Hu RM, Jin HM. Biphasic response of endothelial progenitor cell proliferation induced by high glucose and its relationship with reactive oxygen species. *Journal of Endocrinology* (2008) 197,463-470.
4. Case J, Ingram DA and Haneline LS. Oxidative Stress Impairs Endothelial Progenitor Cell Function. NIH Public Access.
5. Carretero OA, Oparil S. Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation* 2000; 101:329-35.
6. Miatello R, Cruzado M, Risler N: Mechanisms of cardiovascular changes in an experimental model of syndrome X and pharmacological intervention on the renin-angiotensin-system. *Curr Vasc Pharmacol*. 2004; 2(4):271-277.
7. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetología* 1985;28:412–419.
8. Miatello R, Risler N, Castro C, Cruzado M, González S, Ponce Zumino A: chronic administration of losartan reverses cardiovascular changes in hypertensive fructose-fed rats. *Cell Mol Biol* 2003; 49: 945-952.

9. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating EPCs, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003; 348:593-600.
10. Fadini GP, de Kreutzenberg SV, Coracina A, Agostini C, Tiengo Antonio, Avogaro A. Circulating CD34⁺ cells, metabolic syndrome, and cardiovascular risk. *European Heart Journal* 2006; 27: 2247-2255.
11. Yi Y, Noboru F, En-Hui Y, Taro M, Naohiko K, Ryo S, Yoshiko T. Effects of an ARB on endothelial progenitor cell function and cardiovascular oxidation in hypertension. *American journal of Hypertension* 2008; 21-72-77.
12. Griending K, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase, role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000; 86:494-501.