

Trabajo científico

**[ARTÍCULO RETRACTADO]El inhibidor de los receptores para interleucina-1 anakinra restaura parcialmente la disfunción endotelial presente en la diabetes tipo I experimental**

**[RETRACTED ARTICLE]Inhibitor of interleukin-1 receptors anakinra partially restores the endothelial dysfunction in experimental diabetes type I**

Erika Palacios Rosas, Ángela Orozco Alarcón

Este artículo se retiró puesto que fue publicado con anterioridad en la revista

[Cardiovascular Diabetology 2014 13:158](#)

Palacios Rosas, Erika, & Orozco Alarcón, Ángela. (2014). El inhibidor de los receptores para interleucina-1 anakinra restaura parcialmente la disfunción endotelial presente en la diabetes tipo I experimental. Revista mexicana de ciencias farmacéuticas, 45(4), 1-6.

Trabajo científico

# El inhibidor de los receptores para interleucina-1 anakinra restaura parcialmente la disfunción endotelial presente en la diabetes tipo I experimental

## Inhibitor of interleukin-1 receptors anakinra partially restores the endothelial dysfunction in experimental diabetes type I

Erika Palacios Rosas,<sup>1</sup> Angela Orozco Alarcón<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciencias de la Salud, Escuela de Ciencias,  
Universidad de las Américas Puebla, México

<sup>2</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, España

### Resumen

Se evaluó el papel de interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) en la disfunción endotelial asociada a la diabetes mellitus mediante la técnica de reactividad vascular en microvasos mesentéricos de raza Sprague-Dawley. Se demostró que la incubación de los microvasos con IL-1 $\beta$  produce disfunción endotelial de manera concentración-dependiente. El tratamiento de los microvasos con el antagonista del receptor de IL-1, anakinra (AK), produjo un bloqueo concentración dependiente de la disfunción causada por IL-1 $\beta$ . Se estudió la función endotelial en un modelo de diabetes-1, donde se produjo un deterioro de la relajación transcurridas dos semanas de evolución de la enfermedad, la función endotelial se restauró parcialmente mediante el tratamiento con AK.

### Abstract

The role of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) on endothelial dysfunction associated with diabetes mellitus was evaluated by the technique of vascular reactivity in mesenteric microvessel of Sprague-Dawley rat. It was shown that the mere increase of D-glucose is not sufficient to induce an impairment in endothelium-dependent relaxation. However, pre-incubation with IL-1 $\beta$  produced endothelial dysfunction concentration-dependently, enhanced by increasing concentrations of D-glucose. Treatment of microvessel with the receptor antagonist IL-1, anakinra (AK), produced a concentration-dependent blocking dysfunction caused by IL-1 $\beta$ . Endothelial function was studied in a model of diabetes-1, where there was a deterioration of the relaxation elapsed two weeks of disease progression, endothelial function was partially restored by treatment with AK.

**Palabras clave:** Disfunción endotelial, diabetes mellitus, interleucina-1beta.

**Key words:** Endothelial dysfunction, diabetes mellitus, interleukin-1beta.

### Correspondencia:

Dra. Erika Palacios Rosas  
Departamento de Ciencias de la Salud, Escuela de Ciencias  
Universidad de las Américas Puebla  
Ex hacienda Sta. Catarina Mártir, 72810 San Andrés  
Cholula, Puebla, México  
Tel. (222) 2292304, Fax(222) 2292419  
erika.palacios@udlap.mx

Fecha de recepción: 17 de septiembre de 2014  
Fecha de recepción de modificaciones:  
04 de febrero de 2015  
Fecha de aceptación: 02 de marzo de 2015

## Introducción

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica degenerativa cuya relevancia en la morbi-mortalidad en el mundo se ha visto incrementada sobre todo en la segunda mitad del siglo XX. La Federación Internacional de Diabetes indica que en el mundo existen 382 millones de personas con diabetes, y se estima que esta cifra se duplicará en el año 2035.

La Organización Mundial de la Salud define la diabetes mellitus como un desorden metabólico de múltiples etiologías, caracterizado por una hiperglucemia crónica con alteración del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, y causado por un defecto en la secreción de insulina, en su acción o de ambas cosas. Las consecuencias de sufrir DM incluyen a largo plazo, la aparición de enfermedades en diversos órganos o sistemas, como la retina, el riñón o el aparato cardiovascular.

La enfermedad vascular es una característica común en pacientes con diabetes mellitus. Al inicio de la enfermedad predominan las alteraciones funcionales que afectan al endotelio que recubre la luz vascular, lo que se conoce como disfunción endotelial. La disfunción endotelial se define en general como una disminución de las respuestas vasodilatadoras dependientes del endotelio y se considera el primer eslabón de la cadena de mecanismos fisiopatológicos que conducen a la vasculopatía diabética. Entre los diferentes mecanismos implicados, la inflamación sistémica y vascular fortalece considerablemente.<sup>1</sup> Cada vez existen más evidencias sobre la estrecha relación que existe entre las citoquinas pro-inflamatorias en el desarrollo de enfermedades vasculares, incluyendo la vasculopatía diabética.<sup>2-4</sup> La interleucina - 1 $\beta$  (IL - 1 $\beta$ ) se ha involucrado en la patogénesis de la diabetes mellitus tanto en modelos animales como en pacientes con diabetes tipo 1 y 2.<sup>5-7</sup> Es así como se han obtenido resultados muy prometedores al emplear antagonistas de los receptores de IL- 1 en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2.<sup>8-10</sup>

La disfunción endotelial es una manifestación temprana y decisiva en las enfermedades vasculares relacionadas con la diabetes mellitus. Actualmente, existe poca evidencia sobre el posible papel de las citoquinas pro- inflamatorias, y en particular IL- 1 $\beta$ , en la disfunción endotelial, no obstante, se cuenta con algunos datos previos que informan sobre la capacidad de esta citoquina para generar un deterioro de las relajaciones dependientes del endotelio inducido por la diabetes.<sup>11-13</sup> En el presente trabajo, se determinó si un antagonista recombinante humano de los receptores de IL - 1, anakinra<sup>14</sup> puede interferir con la disfunción endotelial observada en la microvasculatura mesentérica aislada de un modelo de rata diabética inducida por estreptozotocina.

## Material y método

### Animales de experimentación

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (SD) de tres meses de edad (300 a 350g), en estas ratas se indujo Diabetes mellitus tipo 1 (DM) mediante estreptozotocina (STZ: 60 mg/kg; i.p.) disuelta en un tampón de citrato trisódico (0.1 mmol/L)-ácido cítrico, que mantenía un pH de 4.5. A las 72 horas de la inyección, se obtuvieron muestras de sangre de la cola y se midió la concentración de D-glucosa con la ayuda de un glucómetro OptiumXcee (Mediscense, Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA). Se consideró que la inducción de la diabetes se había conseguido cuando la glucemia superó los 200mg/dl. Un grupo de ratas se inyectaron con solución salina y se mantienen en condiciones idénticas como el control de animales no diabéticos.

Una vez asegurada la condición de animales diabéticos, se consideró una evolución de dos semanas y se aplicaron diferentes tratamientos antes del sacrificio de los animales, para formar los siguientes grupos: grupo control de ratas no diabéticas (n: 30); grupo de ratas diabéticas sin tratamiento (n: 15); grupo de no diabéticas con un tratamiento i.p. de anakinra (100 mg/kg/día) durante los 3 días previos al sacrificio (n: 3); grupo de diabéticas con un tratamiento i.p. de anakinra (100 mg/kg/día) durante los 3 días previos al sacrificio (n: 4); grupo de no diabéticas con un tratamiento i.p. de anakinra (100 mg/kg/día) durante los 7 días previos al sacrificio (n: 3); grupo de diabéticas con un tratamiento i.p. de anakinra (100 mg/kg/día) durante los 7 días previos al sacrificio (n:3); grupo de no diabéticas con un tratamiento i.p. de anakinra (160 mg/kg/día) 3 días previos al sacrificio (n: 3); grupo de diabéticas con un tratamiento i.p. de anakinra (160 mg/kg/día) durante los 3 días previos al sacrificio (n:10).

### Reactividad vascular en microvasos mesentéricos

Tras los periodos y tratamientos indicados, los animales fueron expuestos a una cámara con dióxido de carbono hasta que cayeron inconscientes e inmediatamente se sacrificaron por dislocación cervical. Se extrajo el mesenterio y se colocó en una caja de Petri con una solución fisiológica Krebs-Henseleit (KHS) a 4 °C, a continuación se dividió en segmentos cilíndricos de 4 a 5 mm de longitud. Se disecó la tercera rama mesentérica bajo microscopia óptica, eliminando el tejido conectivo que rodea los vasos al igual que la vena que circula paralela a la arteria. Se obtuvieron así pequeños segmentos arteriales (media de diámetro interior entre 200 y 400  $\mu$ m se observaron diferencias no significativas entre los diferentes grupos de ratas) los cuales fueron montados en un miógrafo para vasos capaz de medir tensión isométrica.<sup>15</sup> Las arterias se colocaron en un baño de órganos con 5 mL de Krebs (KHS) a 37 °C

en continuo burbujeo con una mezcla de 95 % O<sub>2</sub> y 5 % de CO<sub>2</sub> para asegurar un pH entre 7.3 y 7.4. Para cada segmento se determinó su diámetro interno y se fijaron a un diámetro equivalente al 90 % de lo que experimentan cuando están relajadas in situ bajo una presión transmural de 100 mm Hg.

Las arterias fueron contraídas con 125 mmol/L K<sup>+</sup> (KKHS, sustitución equimolar de KCl por NaCl en KHS) durante 2 min para comprobar la viabilidad del vaso, los segmentos que no produjeron una tensión activa máxima equivalente a una presión de 100 mmHg fueron descartados.<sup>15</sup>

Posteriormente, después de lavar en tres ocasiones las arterias con KHS, los segmentos se dejaron reposar 150 minutos para recuperar y estabilizar su tensión. A continuación, las arterias se contrajeron con noradrenalina (NA; 1 a 2  $\mu$ mol/L) requerida para producir aproximadamente el 80 % de la respuesta máxima a KKHS, cuando se alcanzó un tono de contracción estable, se añadieron concentraciones crecientes y acumulativas de acetilcolina (ACh, concentraciones de baño final de 1 nmol /L a 10  $\mu$ mol /L), en intervalos de 2 minutos.

Algunos microvasos se incubaron con concentraciones crecientes de IL-1 $\beta$  (1, 2.5, 5, o 10 ng/mL) con 120 min de antelación y durante la administración de NA y ACh. Otros segmentos vasculares fueron tratados con anakinra (10, 50, o 100  $\mu$ g/mL), durante 30 minutos de antelación y durante la administración de IL-1 $\beta$ , NA, y ACh.

Las respuestas vasodilatadoras no dependientes del endotelio vascular se analizaron en experimentos seleccionados, donde la relajación se realizó con el donante de óxido nítrico nitroprusiato sódico (NPS; 0,1 nM –10  $\mu$ M).

### Análisis Estadístico

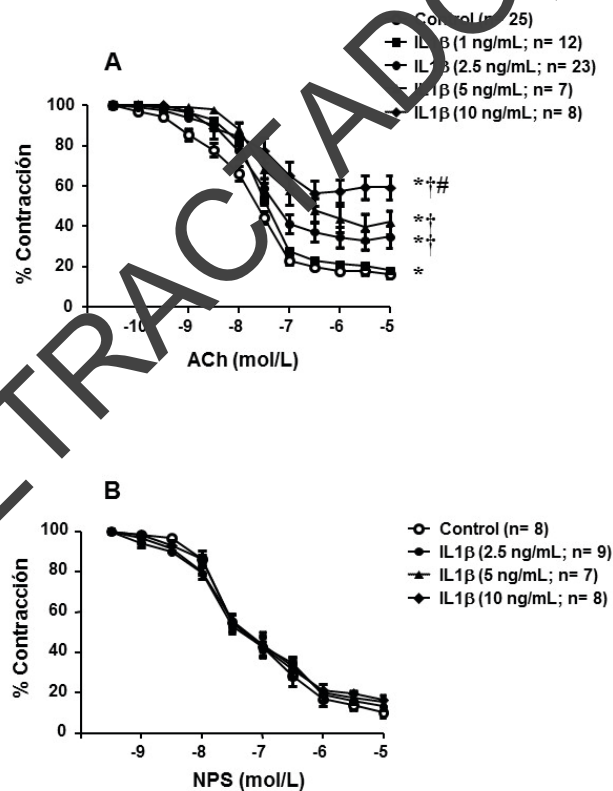
Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar (ES). Para comparar las curvas de respuesta se utilizó el análisis de varianza a dos factores (concentración y grupo). Mediante t de Student se compararon los valores discretos. Se empleó el programa estadístico SPSS Statistics 17.0. Los valores se consideraron significativamente distintos cuando la probabilidad de ser iguales fue menor del 5 % ( $p < 0,05$ ).

## Resultados y discusión

### Efecto de IL-1 $\beta$ sobre la relajación inducida por ACh

Cuando los microvasos mesentéricos aislados de ratas SD se incubaron durante 2 horas con IL-1 $\beta$  (1 a 10 ng/mL), se observó un deterioro concentración dependiente en las relajaciones endoteliales inducidas por ACh (Fig. 1A), mientras que las relajaciones endotelio-independiente producidas por NPS no se

vieron afectados (Fig. 1B). A la concentración más baja (1 ng/mL) similar a la empleada por Wimalasundera,<sup>16</sup> no se observaron cambios respecto a la relajación endotelio-dependiente obtenida en situación control. Concentraciones superiores (2.5, 5 y 10 ng/mL) produjeron un creciente deterioro de las respuestas vasodilatadoras según la concentración de citoquina utilizada. La máxima concentración empleada (10 ng/mL) indujo una marcada disfunción endotelial, similar a la descrita previamente por otros autores.<sup>17, 18</sup>

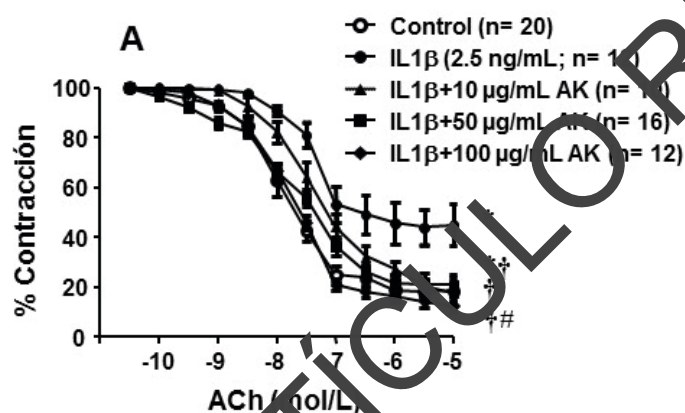


**Figura 1: (A) Efecto de la interleucina-1 $\beta$  (IL1 $\beta$ , 1, 2.5, 5, y 10 ng / ml) sobre las relajaciones dependientes de endotelio inducidas por acetilcolina (ACh, 1 nmol / l a 10  $\mu$ mol / L) en arterias mesentéricas aisladas de ratas Sprague - Dawley (SD) ratas. Los datos se expresan (media  $\pm$  ES) como el porcentaje de la pre-contracción inducida por 1  $\mu$ mol/L noradrenalina (NA), cuyo promedio es 10.19 $\pm$ 0.90, 12.13 $\pm$ 0.81, 9.09 $\pm$ 1.24, 11.85 $\pm$ 1.21, y 10.51 $\pm$ 3.56 mNewtons, en microvasos de control y segmentos tratados con 1, 2.5, 5, y 10 ng / ml IL1 $\beta$ , respectivamente. El número de segmentos utilizados para cada curva, que se obtuvieron de 5 a 12 animales, está en paréntesis \*  $p < 0,05$  vs control; †  $p < 0,05$  vs 1 ng/ml IL1 $\beta$ ; #  $p < 0,05$  vs 2.5 ng/ml IL1 $\beta$ . (B) Efecto de IL1 $\beta$  (2.5, 5, y 10 ng / ml) en las relajaciones independientes de endotelio inducidas por nitroprusiato de sodio (NPS, 1 nmol / L a 10  $\mu$ mol / L) en arterias mesentéricas aisladas de ratas SD. Los datos se expresan como el porcentaje de la pre-contracción inducida con 1  $\mu$ mol / L NA, cuyo promedio es 8.09 $\pm$ 0.71, 9.21 $\pm$ 1.15, 8.18 $\pm$ 0.96, y 7.40 $\pm$ 0.94, mNewtons, en microvasos de control y en segmentos tratados con 2.5, 5, y 10 ng / ml IL1 $\beta$ , respectivamente. El número de segmentos utilizados para cada curva, que se obtiene a partir de 4 animales, está en paréntesis.**

Un aspecto interesante de nuestra investigación es el tiempo de incubación con IL-1 $\beta$  necesario para producir disfunción endotelial. Algunos autores utilizan periodos de incubación prolongados (14 h), por lo que la disfunción endotelial observada se explica por un desarrollo completo de la respuesta inflamatoria, incluyendo el aumento en la expresión de enzimas pro-inflamatorias como iNOS y COX.<sup>17, 18</sup>

En otro trabajo, periodos mucho más cortos de estimulación (30 min) producen una disfunción endotelial significativa, lo que sugiere la participación de mecanismos de señalización mucho más tempranos que no requieren la síntesis de nuevas proteínas.<sup>16</sup> Nuestros resultados, obtenidos incubando los microvasos mesentéricos durante un periodo relativamente breve (2 h) indican también este tipo de señalización temprana.

El deterioro de las relajaciones endotelio dependientes producidas por 2.5 ng/mL IL-1 $\beta$  fueron antagonizadas de manera concentración dependiente por el antagonista de IL-1 anakinra (10, 50, and 100  $\mu$ g/mL) incubado con 30 minutos de antelación (Fig. 2). Anakinra no presentó ningún efecto sobre la contractilidad a NA ni sobre relajación inducida por ACh (datos no mostrados).



**Figura 2:** Efecto de anakinra (AK, 10 , 50 , y 100  $\mu$ g / mL) en el deterioro producido por 2,5 ng / ml IL1 $\beta$  en las relajaciones dependientes del endotelio inducidas por ACh ( 1 nmol / L a 10 $\mu$ mol / L) en arterias mesentéricas aisladas de ratas SD. Los datos se expresan (media  $\pm$  ES) como el porcentaje de la pre- contracción inducida con 1  $\mu$ mol / L NA, cuyo promedio es 8.94 $\pm$ 0.87 , 9.10 $\pm$ 0.99 , 12.07 $\pm$ 1.33 , 10.98  $\pm$  0,75 , y 9.86 $\pm$ 1.56 mNewtons, en microvasos de control y en segmentos tratados con 10 , 50 , o 100  $\mu$ g / ml AK , respectivamente. El número de segmentos utilizados para cada curva, que se obtuvieron de 4 a 6 animales, está en paréntesis. \* p < 0,05 vs control; † p < 0,05 vs IL1 $\beta$ ; # p<0.05 vs IL1  $\beta$  más 10 ng / ml AK.

Datos previos de nuestro grupo sugieren que la hiperglucemia, por si misma no produce disfunción endotelial, ya que en ratas con diabetes tipo 1 inducida por STZ de una semana de evolución y una hiperglucemia muy elevada (rango 25 mM), no se observa todavía disfunción endotelial ni en la aorta ni el lecho microvascular mesentérico.<sup>19</sup>

De igual forma en cultivos celulares de músculo liso y endotelio vascular humano se demostró que las respuestas inflamatorias inducidas por IL-1  $\beta$  se potencian en presencia de concentraciones altas de D-glucosa aunque la D-glucosa por sí misma no tiene efectos inflamatorios.<sup>20, 21</sup> Asimismo la elevación de la D-glucosa potencia el reclutamiento, la adhesión y la migración leucocitarias producidas por IL-1  $\beta$ .<sup>21</sup> La D-glucosa puede tener un papel modulador importante en el daño vascular, al aumentar los efectos inducidos por otros factores pro-inflamatorios; posiblemente la disfunción endotelial en respuesta directa a la hiperglucemia ocurre solo en vasos ya inflamados por un estímulo previo o concomitante, como ocurre en el caso de la IL-1  $\beta$ .

#### Efecto del tratamiento con anakinra en la disfunción endotelial diabética inducida

Después de la administración de estreptozotocina se requirieron dos semanas de evolución para observar una disfunción endotelial significativa en los microvasos mesentéricos de las ratas diabéticas, mientras que las relajaciones endotelio-independientes no se vieron alteradas (datos no mostrados).

Se observó una mejora significativa de la disfunción endotelial diabética cuando las ratas diabéticas recibieron la administración i.p. de 100 mg/kg anakinra /día durante los tres días previos al sacrificio, aunque todavía se produjo un deterioro endotelial restante (Fig. 3A). Esta recuperación de la función endotelial no se mejoró mediante la prolongación del tratamiento con 100 mg/kg/anakinra/día durante 7 días antes del sacrificio (Fig. 3B).

La administración de una dosis más alta (160 mg/kg/anakinra/día durante 3 días) produjo una pequeña pero significativa mejoría de las relajaciones inducidas por ACh aunque una disfunción endotelial restante persistió (Fig. 3C). Ninguna de las dosis utilizadas de anakinra modificó las relajaciones dependientes de endotelio en el control de la vasculatura.



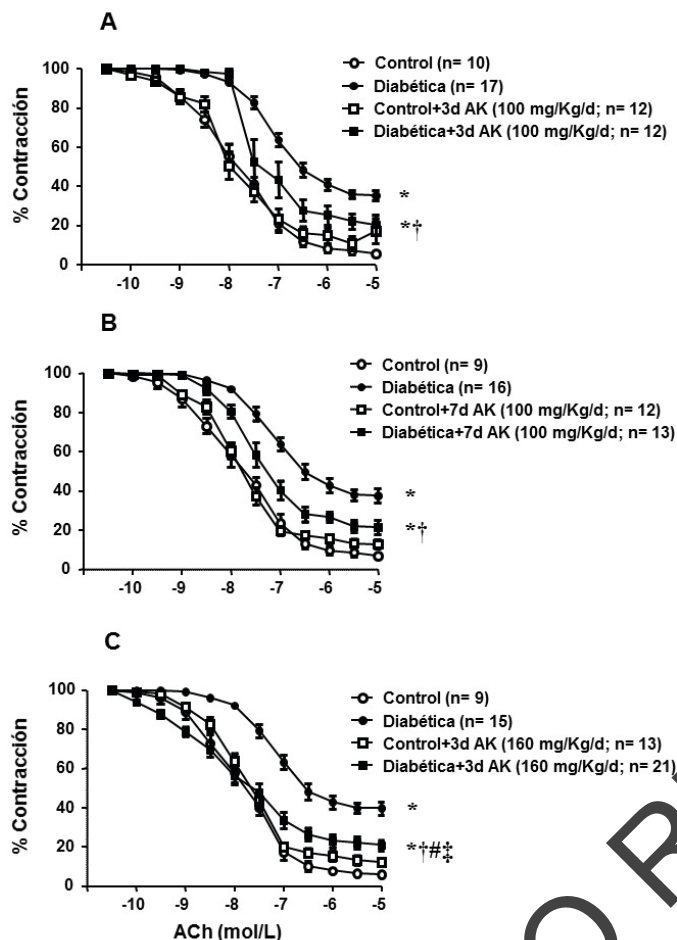


Figura 3: (A) Efectos del tratamiento con AK (ip 100 mg / Kg / día durante 3 días antes del sacrificio) en las relajaciones dependientes del endotelio a ACh (1 nmol / L a 10  $\mu$ mol / L) en arterias mesentéricas aisladas de ratas SD control y de dos semanas de evolución de diabetes inducida por estreptozotocina. Los datos se expresan (media  $\pm$  ES) como el porcentaje de la pre-contracción inducida con 1  $\mu$ mol / L NA, cuyo promedio es 11.98 $\pm$ 1.09, 11.14 $\pm$ 1.28, 8.50 $\pm$ 1.38, y 9.5 $\pm$ 1.14 mNewtons, en los segmentos del control, diabético, control tratado con AK, y diabéticos tratados con AK, respectivamente. El número de segmentos utilizados para cada curva, que se obtuvieron de 4 a 6 animales, está en paréntesis. \*  $p < 0,05$  vs control de ratas; †  $p < 0,05$  vs ratas diabéticas. (B) Efecto del tratamiento con AK (ip 100 mg / Kg / día durante 7 días antes del sacrificio) en las relajaciones dependientes del endotelio a ACh (1 nmol / L a 10  $\mu$ mol / L) en arterias mesentéricas aisladas de ratas SD control y de dos semanas de evolución de diabetes inducida por estreptozotocina. Los datos se expresan (media  $\pm$  ES) como el porcentaje de la pre-contracción inducida con 1  $\mu$ mol / L NA, cuyo promedio es 12.25 $\pm$ 1.16, 12.40 $\pm$ 1.25, 9.56 $\pm$ 0.70, y 12.19 $\pm$ 1.20 mNewtons, en los segmentos del control, diabéticos, de control tratado con AK y diabética tratada con AK, respectivamente. El número de segmentos utilizados para cada curva, que se obtuvieron de 4 a 6 animales,

está en paréntesis. \*  $p < 0,05$  vs control de ratas; †  $p < 0,05$  vs ratas diabéticas. (C) Efecto del tratamiento con AK (ip 160 mg / Kg / día durante 3 días antes del sacrificio) en las relajaciones dependientes de endotelio a ACh (1 nmol / L a 10  $\mu$ mol / L) en arterias mesentéricas aisladas de ratas SD control y de dos semanas de evolución de diabetes inducida por estreptozotocina. Los datos se expresan (media  $\pm$  ES) como el porcentaje de la pre-contracción inducida con 1  $\mu$ mol / L NA, cuyo promedio es 11.95 $\pm$ 1.28, 11.02 $\pm$ 1.59s, 10.64 $\pm$ 1.64, y 11.54 $\pm$ 0.79 mNewtons, en los segmentos del control, diabéticos, de control tratado con AK y diabética tratada con AK, respectivamente. El número de segmentos utilizados para cada curva, que se obtuvieron de 4 a 10 animales, está en paréntesis. \*  $p < 0,05$  vs control de ratas; †  $p < 0,05$  vs ratas diabéticas; #  $p < 0,05$  vs diabéticos tratados con 100 mg / Kg / AK día durante 3 días; ‡  $p < 0,05$  vs diabéticos tratados con 100 mg / Kg / AK día durante 7 días.

## Conclusiones

El tratamiento de los microvasos mesentéricos de rata con el antagonista recombinante del receptor de IL-1, anakinra (AK), produce una mejora en la concentración dependiente de la disfunción endotelial causada por IL-1 $\beta$ .

En el modelo de diabetes experimental por la administración intraperitoneal de estreptozotocina, se produce un deterioro de la relajación endotelio-dependiente inducida por ACh que ocurren dos semanas de evolución de la enfermedad. En este modelo, la función endotelial de los microvasos mesentéricos se restaura parcialmente mediante el tratamiento de los animales con el antagonista competitivo de los receptores para IL-1, anakinra. Por tanto, la citoquina pro-inflamatoria IL-1 puede tener un papel relevante en la disfunción endotelial asociada a la diabetes mellitus.

Finalmente, este trabajo sugiere que las aproximaciones terapéuticas para el tratamiento de la vasculopatía diabética deberían incluir una reducción del ambiente pro-inflamatorio vascular. En este sentido, los antagonistas de los receptores para IL-1 constituyen una prometedora posibilidad.

## Referencias

1. Sowers JR. Diabetes mellitus and vascular disease. Hypertension, 2013; 61: 943-947.
2. Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. Biochem Pharmacol. 2009; 78: 539-552.
3. Goldberg RB. Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. J Clin Endocrin Metab. 2009; 94: 3171-3182.
4. Frostegård J. Immune Mechanisms in Atherosclerosis, Especially in Diabetes Type 2. Front Endocrin. 2013; 4: 162.

5. Marques-Vidal P, Bastardot F, Von Kanel R, Paccaud F, Preisig M, Waeber G, Vollenweider P. Association between circulating cytokine levels, diabetes and insulin resistance in a population-based sample (CoLaus study). *Clin Endocrin*. 2013; 78(2):232-241.
6. Dinarello CA, Donath MY, Mandrup-Poulsen T. Role of IL-1beta in type 2 diabetes. *Curr Opin Endocrin Diabetes Obes*. 2010 17: 314-321.
7. Sumpter KM, Adhikari S, Grishman EK, White PC. Preliminary studies related to anti-interleukin-1 $\beta$  therapy in children with newly diagnosed type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2011; 12: 656-667.
8. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Vølund A, Ehlers JA, Seifert B, Mandrup-Poulsen T, Donath MY. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 2007; 356: 1517-1526.
9. Maedler K, Dharmadikari G, Schumann DM, Størling J. Interleukin-1 beta targeted therapy for type 2 diabetes. *Expert Opin Biol Ther*. 2009; 9: 1177-1188.
10. Maedler K, Dharmadikari G, Schumann DM, Størling J. Interleukin-targeted therapy for metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Handb Exp Pharmacol*. 2011; 203: 257-278.
11. Wimalasundera R, Fexby S, Regan L, Thom SA, Hughes AD. Effect of tumour necrosis factor-alpha and interleukin 1beta on endothelium-dependent relaxation in rat mesenteric resistance arteries in vitro. *Br J Pharmacol*. 2003; 138: 1285-1294.
12. Vila E, Salaices M. Cytokines and vascular reactivity in resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 288: H1016-H1021.
13. Jiménez-Altayó F, Briones AM, Giraldo J, Planas AM, Salaices M, Vila E. Increased superoxide anion production by interleukin-1beta impairs nitric oxide-mediated relaxation in resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006; 316: 42-52.
14. Donath MY, Mandrup-Poulsen T. The use of interleukin-1-receptor antagonists in the treatment of diabetes mellitus. *Nat Clin Pract Endocrin Metab*. 2008; 4: 240-241.
15. Rodríguez-Mañas L, Angulo J, Peiró C, Llergo JL, Sánchez-Ferrer A, López-Dóriga P, Sánchez-Ferrer CF. Endothelial dysfunction and metabolic control in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Pharmacol*. 1998; 123: 1495-1502.
16. Wimalasundera, Fexby S, Regan L, Thom SA, Hughes AD. Effect of tumour necrosis factor-alpha and interleukin 1 beta on endothelium-dependent relaxation in rat mesenteric resistance arteries in vitro. *Br J Pharmacol*. 2003 Apr; 138(7):1285-94.
17. Briones AM, Montoya N, Giraldo J, Vila E. Ageing affects nitric oxide synthase, cyclooxygenase and oxidative stress enzymes expression differently in mesenteric resistance arteries. *Auon Autacoid Pharmacol*. 2005; 25:155-162
18. Jiménez-Altayó F, Briones AM, Giraldo J, Planas AM, Salaices M, Vila E. Increased Superoxide Anion Production by Interleukin-1 $\beta$  Impairs Nitric Oxide-Mediated Relaxation in Resistance Arteries. *J Pharmacol*. 2006; 316:42-52.
19. Rodríguez-Mañas L, López-Dóriga P, Petidier R, Neira M, Solís J, Pavón I, Peiró C, Sánchez Ferrer CF. Effects of glycaemic control on the vascular nitric oxide system in patients with type 1 diabetes. *J Hypertension*. 2003; 21(6): 1137-1143.
20. Lafuente N, Matesanz N, Azcutia V, Romacho T, Nevado J, Rodríguez-Mañas L, Moncada S, Peiro C, Sanchez-Ferrer CF. The deleterious effect of high concentrations of D-glucose requires pro-inflammatory pre-conditioning. *Hypertens*. 2007;26:487-485
21. Azcutia V, Abu-Yaha M, Romacho T, Vázquez-Bella M, Matesanza N, Luscinskas FW, Rodriguez-Mañas L, Sanza MJ, Sánchez Ferrer CF, Peiró C. Inflammation Determines the Pro-Adhesive Properties of High Extracellular D-Glucose in Human Endothelial Cells In vitro and Rat Microvessels In Vivo. *Plos One*. 2010;5e10091