

Editorial

Aterogénesis y diabetes: resistencia a la insulina e hiperinsulinemia

Atherogenesis and Diabetes: Focus on Insulin Resistance and Hyperinsulinemia

Rosalinda Madonna^{a,b} y Raffaele De Caterina^{a,*}^a Istituto di Cardiologia, Università G. d'Annunzio-Chieti, Chieti, Italia^b Texas Heart Institute and St. Luke's Episcopal Hospital, Houston, Texas, Estados Unidos

Historia del artículo:

On-line el 20 de febrero de 2012

RESISTENCIA A LA INSULINA, HIPERINSULINEMIA Y ENFERMEDAD VASCULAR: DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Tanto las complicaciones macrovasculares como las microvasculares son causas importantes de morbilidad en la diabetes tipo 1 y tipo 2¹, pero hay un aumento de la incidencia de las complicaciones macrovasculares incluso antes del inicio de la diabetes tipo 2². Aunque la glucemia elevada³ y las modificaciones de proteínas y lípidos inducidas por la glucosa (productos terminales de glucación avanzada⁴) pueden ser desencadenantes de la enfermedad tanto macrovascular como microvascular una vez aparecida la diabetes (tanto de tipo 1 como de tipo 2), desde hace mucho tiempo hay un debate respecto a los factores que causan la enfermedad macrovascular en el contexto del síndrome metabólico y la prediabetes. Ciertamente en la diabetes, y probablemente también en el contexto del síndrome metabólico^{5–8}, la enfermedad vascular y la enfermedad coronaria ateroscleróticas se producen en mayor medida de lo que explica la acumulación de otros factores de riesgo asociados, como la hipertrigliceridemia, las bajas concentraciones de lipoproteínas de alta densidad y la hipertensión. La resistencia a la insulina antes del inicio de la diabetes se caracteriza, por definición, por la hiperinsulinemia, y desde hace tiempo se ha especulado con la posibilidad de que esto tenga una relación causal con la enfermedad vascular^{9–12}. En esta breve revisión abordaremos la plausibilidad biológica y la evidencia existente respecto a que la hiperinsulinemia pueda ser un mecanismo causal en el desarrollo de la aterosclerosis antes y después del inicio de la diabetes tipo 2.

RESISTENCIA SELECTIVA A LA INSULINA E HIPERINSULINEMIA COMPENSATORIA: FISIOPATOLOGÍA

Inicialmente, Reaven et al definieron el síndrome de resistencia a la insulina como una agrupación de factores de riesgo cardiovascular, que incluía intolerancia a la glucosa, dislipemia e hipertensión, relacionada con una potenciación de la enfermedad cardiovascular¹³. Reaven et al definieron el síndrome metabólico

como un trastorno clínico caracterizado por resistencia a la insulina, deterioro de la glucemia basal en ayunas, obesidad, dislipemia e hipertensión¹³. Posteriormente se han propuesto otras dos definiciones del síndrome metabólico, una del *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*¹⁴ y la otra de la Organización Mundial de la Salud¹⁵. La resistencia a la insulina (medida con el método de referencia del *clamp* euglicémico hiperinsulinémico o con métodos indirectos, como la prueba de tolerancia a glucosa intravenosa con muestras frecuentes, la prueba de supresión de insulina o el índice HOMA) puede demostrarse en hasta un 76% de los individuos¹⁶ y se acompaña de una hiperinsulinemia compensatoria¹⁶. Aunque el conocimiento de los mecanismos moleculares de resistencia a la insulina es todavía incompleto, se han descrito anomalías de la señalización de la insulina¹⁷. En los tejidos periféricos, incluidos el músculo esquelético y el hígado, en condiciones normales, la insulina inicia su acción uniéndose a su receptor específico de la superficie celular, es decir, el receptor de insulina (IR), que es una proteína heterotetramérica formada por dos subunidades α extracelulares y dos subunidades β transmembrana, conectadas por puentes disulfuro. La unión de la insulina a la subunidad α extracelular induce cambios de conformación del IR que causan, a su vez, la dimerización de los receptores adyacentes y la activación del dominio de tirosinasa de la parte intracelular de la subunidad β . El inicio de la actividad de tirosinasa del IR fomenta la autofosforilación de la propia subunidad β y la fosforilación rápida de las denominadas «proteínas de acoplamiento» (*docking*), como los sustratos de IR (IRS) -1, -2, -3 y -4, y otras varias proteínas, incluidas las proteínas de homología de colágeno (shc) y la homología de SRC 2 (SH2), que activan, a su vez, múltiples sustancias intermedias de señalización intracelular (fig. 1). Así pues, las proteínas IRS, shc y SH2 desempeñan un papel regulador importante en la cascada de señalización de la insulina. En su forma fosforilada, estas proteínas se convierten en puntos de anclaje para las proteínas intracelulares que contienen dominios SH2 complementarios. Concretamente, la interacción entre las proteínas IRS-1 y la fosfatidilinositol (IP) 3-cinasa determina la activación de Akt (también denominada proteincinasa B), que desempeña un papel crucial en el mecanismo de acción de la insulina para la translocación de GLUT-4, el transporte de glucosa y la activación de la óxido nítrico (NO) sintasa («vía de señalización metabólica»). En cambio, los efectos no metabólicos, proliferativos, mitógenos y proinflamatorios de la insulina se producen mediante la activación de la Ras (principalmente a través de shc y, en menor

* Autor para correspondencia: Istituto di Cardiologia, Università G. d'Annunzio-Chieti, C/o Ospedale SS. Annunziata, Via dei Vestini, 66013 Chieti, Italia.

Correo electrónico: rdecater@unich.it (R. De Caterina).

Full English text available from: www.revespcardiol.org

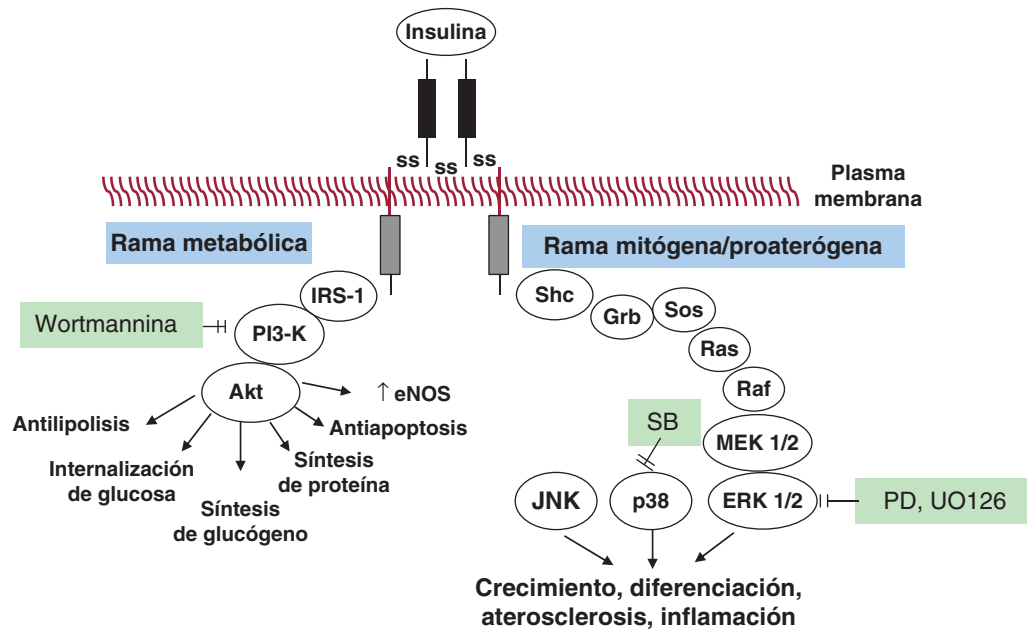


Figura 1. La vía de señalización de la insulina y su deterioro en la resistencia a la insulina. Tras la unión a su receptor de tirosincinasa, la insulina induce la dimerización del receptor y la activación de una cascada de fenómenos de fosforilación que produce dos clases de efectos: a) efectos «metabólicos», que fomentan el transporte de glucosa, la síntesis de glucógeno y proteínas, la inhibición de la lipólisis, la protección contra la apoptosis y la liberación de óxido nítrico (que se describen de manera amplia como efectos «antiinflamatorios»), y b) efectos de fomento del crecimiento y la diferenciación que conducen a fomento de la inflamación y la aterogénesis (es decir, la señalización de la insulina proinflamatoria y mitógena). Akt: proteínas B; eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial; ERK: cinasa receptora extracelular; IRS-1: receptor de sustrato de insulina 1; JNK: cinasa terminal c-Jun NH₂-1; MEK: proteínas activada por mitógenos/cinasa receptora extracelular; p38: proteínas activada por mitógenos p38; PD (PD98059) y UO126: inhibidores de cinasa receptora extracelular 1/2; PI3-cinasa: fosfatidilinositol(IP)3 cinasa; wortmannina: inhibidor de PI3-cinasa.

grado, de proteínas IRS), la Raf y las cinasas de proteína activada por mitógenos (MAPK) («vía de señalización de crecimiento») ¹⁸. En los animales insulinoresistentes y en modelos *in vitro*, se puede demostrar una reducción de la activación de la señalización de la insulina a través de la vía de la IRS-1/PI3-cinasa, que da lugar a una disminución de la captación de glucosa, reducción de la síntesis de NO y reducción de la utilización de glucosa en los tejidos diana de la insulina. La misma reducción del transporte de glucosa se percibe en las células beta pancreáticas, e induce un aumento compensatorio de la secreción de insulina. Sin embargo, al mismo tiempo, la vía de la insulina a través de la MAPK se mantiene inalterada ¹⁹. Es fácil comprender que este desequilibrio selectivo de las dos vías de transducción de señal en situaciones como la hiperinsulinemia puede conducir a una señal excesiva de proliferación/fomento del crecimiento, y al mismo tiempo permitir que se mantengan normales el transporte y la homeostasis de la glucosa. La hiperinsulinemia compensatoria estimula diversos fenómenos proliferativos y proaterogénicos en las células endoteliales y del músculo liso vascular. Estos efectos incluyen un aumento de la producción de inhibidor de activador de plasmínógeno tipo 1 (PAI-1), endotelina, citocinas proinflamatorias y un aumento de la expresión de las moléculas de adhesión ¹⁹⁻²².

La insulina desempeña un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de los vasos sanguíneos a través de la activación del NO derivado del endotelio. La insulina aumenta la producción de NO endotelial al activar la NOS-III (NOS endotelial) mediante mecanismos postraduccionales rápidos que actúan a través de la vía de señalización de PI3K/Akt ²³. En los estados de resistencia a la insulina, la vía de PI3K/Akt es inhibida de manera selectiva, y ello lleva a una disfunción endotelial, con el consiguiente aumento del tono vascular e hipertensión, un aumento de la interacción entre células endoteliales y leucocitos y un estado protrombótico. Esta resistencia a la insulina «selectiva»

se ha puesto de manifiesto en el músculo esquelético de personas obesas y de pacientes con diabetes tipo 2 ²⁴, así como en los vasos sanguíneos y el miocardio de ratas Zucker obesas. En esta situación, los efectos antiaterogénicos fisiológicos normales de la insulina, debido en gran parte a su capacidad de aumentar la producción de NO, se convierten en efectos proaterogénicos ²⁵.

UN CÍRCULO VICIOSO ENTRE HIPERINSULINEMIA Y RESISTENCIA A LA INSULINA

Las concentraciones plasmáticas elevadas de insulina en estados de resistencia a la insulina pueden desencadenar también un círculo vicioso que aumente aún más la resistencia a la insulina ²⁶ mediante la supresión de los efectos que se producen a través del eje PI3K/AKT/NO, y ello puede desequilibrar el sistema como consecuencia de un fomento neto de los efectos relacionados con la activación de la MAPK. Dado que la insulina desencadena una serie de efectos biológicos a través de la unión y activación de su receptor (IR), dotado de actividad de tirosincinasa sobre sustratos específicos, como IRS -1 y -2 ²⁷, los ratones con una delección específica de los genes de IRS-1 e IRS-2 muestran un fenotipo de resistencia a la insulina ²⁸.

En los modelos animales de hiperinsulinemia, como los ratones *ob/ob* y las ratas Zucker obesas, se observan valores bajos de proteínas IRS-1 e IRS-2 en el hígado ^{29,30}. Estos modelos se caracterizan por tener resistencia a la insulina y reducción de la función del eje IR/IRS-1/PI3K/AKT en el hígado y el músculo esquelético. Se ha demostrado que las incubaciones breves *in vitro* de mioblastos con concentraciones elevadas de insulina determinan una reducción, mediada por la PI3K, de la expresión de la proteína IRS-1 y una desensibilización de los mecanismos de transducción de la señal de insulina ⁹. Por último, una exposición

prolongada de mioblastos en cultivo a concentraciones elevadas de insulina se asocia a una reducción de la actividad del eje IR/IRS-1/PI3K/AKT³¹. Nosotros hemos demostrado que la exposición prolongada de células endoteliales de vena umbilical humana a concentraciones de insulina elevadas induce una regulación negativa del eje PI3K/AKT/eNOS, que es paralela al aumento de expresión de la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1)³². Sin embargo, los mecanismos moleculares por los que la hiperinsulinemia da lugar a resistencia a la insulina o la agrava son todavía en gran parte desconocidos.

HIPERINSULINEMIA Y ENFERMEDAD VASCULAR: EVIDENCIA PROCEDENTE DEL LABORATORIO

Los experimentos realizados en animales^{33,34} y varios estudios *in vitro* han aportado evidencias de plausibilidad biológica de la hipótesis según la cual las concentraciones altas de insulina son proaterogénicas. La relación entre enfermedad coronaria y concentraciones elevadas de insulina se propuso por primera vez a finales de los años sesenta¹⁰ y se confirmó después (véase la revisión de Reddy et al³⁵). *In vitro*, se ha demostrado que la insulina estimula la proliferación y la migración de las células de músculo liso arterial en preparados tisulares²¹ e induce la adhesión monocitaria al aumentar la expresión de la VCAM-1 en las células endoteliales^{22,36,37}. La VCAM-1 probablemente sea la molécula de adhesión más relevante para el desarrollo de la aterosclerosis³⁸. Este aumento de la expresión en presencia de insulina se produce en un sistema en el que la insulina puede elevar todavía la biodisponibilidad de NO, lo cual inhibiría normalmente la activación endotelial y la aterogénesis³⁹. En consecuencia, estas observaciones indican que el efecto neto de las concentraciones altas de insulina para las células endoteliales es principalmente un fenotipo proinflamatorio. Nosotros hemos demostrado también que estos efectos pueden ser potenciados por el inhibidor de la IP-3-cinasa wortmannina²², lo cual nos lleva a proponer que pueden amplificarse en mayor medida en situaciones de resistencia a la insulina simuladas por la wortmannina. Dado que la capacidad de la insulina de inducir la activación endotelial (para la cual la expresión de VCAM-1 es a la vez un marcador y un mediador) es una explicación plausible de la enfermedad macrovascular que acompaña a los trastornos hiperinsulinémicos, hemos examinado los posibles mecanismos moleculares involucrados en este patrón específico de activación endotelial. Se incubaron células endoteliales de vena umbilical humana con insulina (0-24 h) ± inhibidores de las vías de señalización potencialmente involucradas. La incubación de células endoteliales con inhibidores de ERK1/2 no influyó en la expresión de VCAM-1 inducida por la insulina. En cambio, los inhibidores de p38 MAPK, SB203580 y SB202190, el inhibidor de la isoforma de proteincinasa C (PKC)-β LY379196, y (parcialmente) el inhibidor de la c-Jun terminal NH₂ cinasa SP600127, todos ellos evaluados a concentraciones próximas a su media concentración inhibitoria máxima (CI₅₀) para la inhibición de la fosforilación del sustrato, redujeron el efecto de la insulina en la VCAM-1. La silenciancia génica de la p38 MAPK por la acción de moléculas pequeñas de ARN de interferencia, que inhibían la expresión de la p38 MAPK, causó una supresión de la expresión de VCAM-1 estimulada por la insulina^{22,36,37}. El tratamiento con insulina condujo también a una activación de NF-κB^{22,36}.

En animales, se ha demostrado que el tratamiento a largo plazo con insulina induce lesiones arteriales que son ricas en lípidos y estimulan el engrosamiento de la pared¹⁰. Los mecanismos que causan estas lesiones son el aumento de la síntesis de colesterol en el tejido adiposo, un desequilibrio en la proporción de receptores de lipoproteínas de baja densidad y lipoproteínas de alta densidad (con un aumento de los primeros

y una reducción de los segundos) y un aumento de la unión de las lipoproteínas de baja densidad a las células de músculo liso arteriales¹⁰. La insulina es también un factor de crecimiento capaz de fomentar la angiogénesis y la proliferación de células de músculo liso mediante la activación de las mismas vías que son activadas por los factores de crecimiento insulínico (IGF)⁴⁰. Estos efectos de la insulina parecen intervenir en la neovascularización retiniana y desempeñan, pues, un papel clave en la fisiopatología de la microangiopatía diabética y (potencialmente) de la desestabilización de la placa aterosclerótica^{41–43}.

Otros posibles mecanismos relevantes por los que la elevada concentración de insulina favorece la aterosclerosis son la disfunción endotelial⁴⁴ y la inhibición de la apoptosis de los macrófagos⁴⁵. La disfunción endotelial precede a los episodios macrovasculares y los predice. En humanos sanos, la infusión de insulina, al alcanzar unas concentraciones fisiopatológicamente relevantes (> 120 pmol/l), puede inducir una disfunción endotelial grave en las arterias grandes⁴⁴. Los mecanismos probablemente incluyan un aumento del estrés oxidativo intracelular⁴⁶. Los estudios realizados *in vitro* han puesto de manifiesto que la insulina estimula la producción de endotelina, la actividad del sistema simpático y la retención de sodio⁴⁷. Además, la insulina facilita la migración y la proliferación de las células de músculo liso, aumenta la producción de matriz extracelular e induce un estado procoagulante⁴⁸, con lo que posiblemente contribuye a la reestenosis tras la angioplastia, que se observa con mayor frecuencia en los pacientes diabéticos que en los no diabéticos⁴⁹.

HIPERINSULINEMIA Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR: EVIDENCIA OBTENIDA A LA CABECERA DEL PACIENTE

A pesar de la clara evidencia fisiopatológica y experimental de un efecto proaterogénico de la hiperinsulinemia secundaria a una resistencia a la insulina, es muy frecuente que a los pacientes con diabetes tipo 2 se les administre insulina para normalizar la hiperglucemia, las concentraciones de ácidos grasos libres y la glucohemoglobina. Este tratamiento implica a menudo la administración de insulina a dosis muy altas (de hasta 100 o incluso 625 U/día)⁵⁰, lo cual causa la aparición de efectos indeseables, como aumento de peso, inhibición de la secreción endógena residual de insulina⁵¹ y sobreexpresión de la vía de MAPK¹⁹. Sin embargo, dados los efectos favorables de la insulina en la glucemia y los efectos nocivos causados por la glucosa elevada en la función vascular, la evidencia respecto al efecto negativo neto de las dosis altas de insulina en la diabetes no está clara. El estudio DAI (Grupo de Estudio de Diabetes e Informática, Asociación Italiana de Diabetólogos e Instituto Nacional de la Salud de Italia)⁵², un estudio de cohorte multicéntrico sobre la prevalencia y la incidencia de los eventos cardiovasculares (infarto de miocardio, tromboembolia cerebral y amputaciones periféricas) en pacientes con diabetes tipo 2, puso de relieve que, en comparación con el tratamiento con antidiabéticos orales (como metformina, que no comporta un aumento de la secreción de insulina), el tratamiento con insulina se asoció a un mayor número de eventos cardiovasculares en los varones y las mujeres con diabetes tipo 2. En los pacientes con diabetes tipo 2, se ha demostrado que el tratamiento con insulina aumenta de manera independiente el riesgo de úlceras del pie⁵³, hipertensión⁵⁴ y la agregación plaquetaria dependiente de adenosin difosfato⁵⁵. En el Framingham Heart Study, los pacientes diabéticos tratados con insulina fueron los que presentaron mayor incidencia de morbilidad y mortalidad por enfermedad cardiovascular⁵⁶. En la First National Health and Nutrition Examination Survey, en un total de 7.381 pacientes observados, los que tenían su diabetes tratada con insulina presentaron un aumento del riesgo de muerte por todas las causas

y de muerte atribuible a enfermedad cardiovascular⁵⁷. En el *Veterans Affairs Cooperative Study on Glycemic Control and Complications in Type II Diabetes*, los pacientes que recibían un tratamiento intensivo con insulina presentaron una incidencia del 32% de eventos cardiovasculares, en comparación con la del 21% en los pacientes que recibían un tratamiento de insulina estándar⁵⁸. En el estudio *Atherosclerotic Risk in Communities*⁵⁹, los pacientes tratados con sulfonilureas (que también aumentan las concentraciones de insulina) presentaron un riesgo relativo de enfermedad cardiovascular de 1,82, mientras que los pacientes tratados con insulina tuvieron un riesgo relativo de 2,64. El estudio de Kumamoto⁶⁰, en el que los pacientes tratados con insulina no presentaron un aumento del riesgo de enfermedad macrovascular, no hizo una aportación sustancial para abordar esta cuestión, ya que los pacientes eran hipoinsulinémicos y no tenían obesidad. Un estudio reciente⁶¹ ha demostrado que la media de amplitud de las desviaciones de la glucemia observadas en los datos de monitorización continua de la glucosa tenía una correlación positiva e independiente con la excreción urinaria de 8-iso-prostaglandina F_{2α}, un marcador del estrés oxidativo, en pacientes con diabetes mal controlada con fármacos hipoglucemiantes orales. Los autores no observaron este tipo de asociaciones en los pacientes con diabetes tipo 1 o tipo 2 tratados con insulina, lo cual indica que el tratamiento insulínico en sí inhibe el estrés oxidativo en esos pacientes. Sin embargo, los efectos de la insulina en la homeostasis celular podrían depender también de las concentraciones de insulina, dado que se ha demostrado que las dosis suprafisiológicas de insulina inducen la generación de especies moleculares de oxígeno reactivo *in vitro*⁶². En conjunto, la insulina exógena produce efectos favorables (reducción de la hiperglucemia) y adversos (fomento de la aterogénesis)⁶³. Esto debe ser una advertencia para un uso menos amplio de la insulina en la diabetes tipo 2. En los pacientes con glucemia > 300 mg/dl, una administración inicial de insulina puede reducir la glucotoxicidad^{50,64,65}; después de ello, la reducción de la resistencia a la insulina mediante reducción del peso, aumento del ejercicio físico y uso de sensibilizadores a la insulina, como metformina o las glitazonas, probablemente sea una opción más lógica para prevenir las complicaciones cardiovasculares en los pacientes con diabetes tipo 2. Es de destacar que cinco grandes estudios aleatorizados del control intensivo de la glucosa en comparación con el tratamiento estándar en la diabetes tipo 2 no han mostrado reducción alguna de la mortalidad total o de causa cardiovascular^{58,66-69}; en cambio, esta reducción sí se ha observado en el estudio EDIC⁷⁰ en la diabetes tipo 1, en la que la resistencia a la insulina no es el problema principal y el tratamiento insulínico reemplaza el fallo primario de la producción de insulina por las células beta pancreáticas.

CONCLUSIONES

Las concentraciones fisiopatológicas de insulina aumentan la producción de endotelina, citocinas proinflamatorias, moléculas de adhesión leucocitaria endotelial y PAI-1 con lo que causan unos efectos proinflamatorios vasculares en general. Los resultados de los estudios realizados *in vitro* e *in vivo* apuntan a un papel patogénico de las concentraciones patofisiológicas y farmacológicas de insulina en la enfermedad vascular. Serán necesarias nuevas investigaciones sobre el uso de inhibidores específicos de las vías de MAPK y PKC, como nuevos agentes farmacológicos para abordar la señalización de la insulina proaterogénica.

FINANCIACIÓN

El trabajo original de los autores que se describe aquí fue financiado por subvenciones del *Istituto Nazionale per le Ricerche Cardiovascolari* a Raffaele De Caterina.

CONFLICTO DE INTERESES

Ninguno.

BIBLIOGRAFÍA

- Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA*. 2002;287:2570-81.
- Haffner SM, Stern MP, Hazuda HP, Mitchell BD, Patterson JK. Cardiovascular risk factors in confirmed prediabetic individuals. Does the clock for coronary heart disease start ticking before the onset of clinical diabetes? *JAMA*. 1990;263:2893-8.
- Cosentino F, Eto M, De Paolis P, Van der Loo B, Bachschmid M, Ullrich V, et al. High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation*. 2003;107:1017-23.
- Basta G, Schmidt AM, De Caterina R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc Res*. 2004;63:582-92.
- Vanuzzo D, Pilotto L, Mirolo R, Pirelli S. [Cardiovascular risk and cardiometabolic risk: an epidemiological evaluation]. *G Ital Cardiol (Rome)*. 2008;9:S6-17S.
- Gupta AK, Poulter NR. The concept of the metabolic syndrome is it dead yet? *J Am Coll Cardiol*. 2010;56:1355-6.
- Mente A, Yusuf S, Islam S, McQueen MJ, Tanomsup S, Onen CL, et al. Metabolic syndrome and risk of acute myocardial infarction a case-control study of 26,903 subjects from 52 countries. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55:2390-8.
- Tenenbaum A, Fisman EZ. "The metabolic syndrome... is dead": these reports are an exaggeration. *Cardiovasc Diabetol*. 2011;10:11.
- Pyörälä K. Relationship of glucose tolerance and plasma insulin to the incidence of coronary heart disease: results from two population studies in Finland. *Diabetes Care*. 1979;2:131-41.
- Stout RW. Insulin and atheroma. 20-yr perspective. *Diabetes Care*. 1990;13:631-54.
- Muntoni S, Draznin B. Effects of chronic hyperinsulinemia in insulin-resistant patients. *Curr Diab Rep*. 2008;8:233-8.
- Mitsuhashi T, Hibi K, Kosuge M, Morita S, Komura N, Kusama I, et al. Relation between hyperinsulinemia and nonculprit plaque characteristics in nondiabetic patients with acute coronary syndromes. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2011;4:392-401.
- Reaven GM, Chang H, Ho H, Jeng CY, Hoffman BB. Lowering of plasma glucose in diabetic rats by antilipolytic agents. *Am J Physiol*. 1988;254:E23-30.
- Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001;285:2486-97.
- World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation. Ginebra: WHO; 1999.
- Cheal KL, Abbasi F, Lamendola C, McLaughlin T, Reaven GM, Ford ES. Relationship to insulin resistance of the adult treatment panel III diagnostic criteria for identification of the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2004;53:1195-200.
- Russell JC, Proctor SD. Small animal models of cardiovascular disease: tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol*. 2006;15:318-30.
- Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7:85-96.
- Montagnani M, Golovchenko I, Kim I, Koh GY, Goalstone ML, Mundhekar AN, et al. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances mitogenic actions of insulin in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2002;277:1794-9.
- Ridray S. Hyperinsulinemia and smooth muscle cell proliferation. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1995;19 Suppl 1:S39-51.
- Golovchenko I, Goalstone ML, Watson P, Brownlee M, Draznin B. Hyperinsulinemia enhances transcriptional activity of nuclear factor-kappaB induced by angiotensin II, hyperglycemia, and advanced glycosylation end products in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 2000;87:746-52.
- Madonna R, Pandolfi A, Massaro M, Consoli A, De Caterina R. Insulin enhances vascular cell adhesion molecule-1 expression in human cultured endothelial cells through a pro-atherogenic pathway mediated by p38 mitogen-activated protein-kinase. *Diabetologia*. 2004;47:532-6.
- Montagnani M, Chen H, Barr VA, Quon MJ. Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca²⁺ but requires phosphorylation by Akt at Ser(1179). *J Biol Chem*. 2001;276:30392-8.
- Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, Pratipanawatr T, et al. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest*. 2000;105:311-20.
- Wang CC, Goalstone ML, Draznin B. Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology. *Diabetes*. 2004;53:2735-40.
- Combettes-Souverein M, Issad T. Molecular basis of insulin action. *Diabetes Metab*. 1998;24:477-89.
- Cheatham B, Kahn CR. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev*. 1995;16:117-42.

28. Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag 3rd B, Johnson RS, et al. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*. 1994;372:186–90.
29. Saad MJ, Araki E, Miralpeix M, Rothenberg PL, White MF, Kahn CR. Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. *J Clin Invest*. 1992;90:1839–49.
30. Anai M, Funaki M, Ogiwara T, Terasaki J, Inukai K, Katagiri H, et al. Altered expression levels and impaired steps in the pathway to phosphatidylinositol 3-kinase activation via insulin receptor substrates 1 and 2 in Zucker fatty rats. *Diabetes*. 1998;47:13–23.
31. Bertacca A, Ciccarone A, Cecchetti P, Vianello B, Laurenza I, Maffei M, et al. Continually high insulin levels impair Akt phosphorylation and glucose transport in human myoblasts. *Metabolism*. 2005;54:1687–93.
32. Madonna R, De Caterina R. Prolonged exposure to high insulin impairs the endothelial PI3-kinase/Akt/nitric oxide signalling. *Thromb Haemost*. 2009;101:345–50.
33. Duff GL, Mc MG. The effect of alloxan diabetes on experimental cholesterol atherosclerosis in the rabbit. *J Exp Med*. 1949;89:611–30.
34. Cruz Jr AB, Amatuzio DS, Grande F, Hay LJ. Effect of intra-arterial insulin on tissue cholesterol and fatty acids in alloxan-diabetic dogs. *Circ Res*. 1961;9:39–43.
35. Reddy KJ, Singh M, Bangit JR, Batsell RR. The role of insulin resistance in the pathogenesis of atherosclerotic cardiovascular disease: an updated review. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2010;11:633–47.
36. Madonna R, Massaro M, Pandolfi A, Consoli A, De Caterina R. The prominent role of p38 mitogen-activated protein kinase in insulin-mediated enhancement of VCAM-1 expression in endothelial cells. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2007;20:539–55.
37. Madonna R, Massaro M, De Caterina R. Insulin potentiates cytokine-induced VCAM-1 expression in human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1782:511–6.
38. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2001;107:1255–62.
39. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone Jr MA, 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;96:60–8.
40. Ruiz-Torres A, Lozano R, Melón J, Carraro R. On how insulin may influence ageing and become atherogenic throughout the insulin-like growth factor-1 receptor pathway: in vitro studies with human vascular smooth muscle cells. *Gerontology*. 2005;51:225–30.
41. Zunker P, Schick A, Buschmann HC, Georgiadis D, Nabavi DG, Edelmann M, et al. Hyperinsulinism and cerebral microangiopathy. *Stroke*. 1996;27:219–23.
42. Inukai T, Matsutomo R, Tayama K, Aso Y, Takemura Y. Relation between the serum level of C-peptide and risk factors for coronary heart disease and diabetic microangiopathy in patients with type-2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1999;107:40–5.
43. Sugimoto K, Baba M, Suda T, Yasujima M, Yagihashi S. Peripheral neuropathy and microangiopathy in rats with insulinoma: association with chronic hyperinsulinemia. *Diabetes Metab Res Rev*. 2003;19:392–400.
44. Arcaro G, Cretti A, Balzano S, Lechi A, Muggeo M, Bonora E, et al. Insulin causes endothelial dysfunction in humans: sites and mechanisms. *Circulation*. 2002;105:576–82.
45. Iida KT, Suzuki H, Sone H, Shimano H, Toyoshima H, Yatoh S, et al. Insulin inhibits apoptosis of macrophage cell line, THP-1 cells, via phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:380–6.
46. Cai XJ, Lister CA, Buckingham RE, Pickavance L, Wilding J, Arch JR, et al. Down-regulation of orexin gene expression by severe obesity in the rats: studies in Zucker fatty and Zucker diabetic fatty rats and effects of rosiglitazone. *Brain Res Mol Brain Res*. 2000;77:131–7.
47. Sarafidis PA, Bakris GL. Review: Insulin and endothelin: an interplay contributing to hypertension development? *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92:379–85.
48. Aronson D, Bloomgarden Z, Rayfield EJ. Potential mechanisms promoting restenosis in diabetic patients. *J Am Coll Cardiol*. 1996;27:528–35.
49. Radke PW, Friese K, Buhr A, Nagel B, Harland LC, Kaiser A, et al. Comparison of coronary restenosis rates in matched patients with versus without diabetes mellitus. *Am J Cardiol*. 2006;98:1218–22.
50. DeFronzo RA. Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med*. 1999;131:281–303.
51. DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care*. 1992;15:318–68.
52. DAI study group. The DAI prospective study on macrovascular complications in patients with type 2 diabetes. Characteristics of the study population. *Ann Ist Super Sanita*. 2001;37:289–96.
53. Faglia E, Favale F, Quarantiello A. Are insulin-treated type 2 subjects at higher risk for foot ulcers? *Diabetes Care*. 1999;22:1379–80.
54. Bruno G, Merletti F, Boffetta P, Cavallo-Perin P, Barger G, Gallone G, et al. Impact of glycaemic control, hypertension and insulin treatment on general and cause-specific mortality: an Italian population-based cohort of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1999;42:297–301.
55. Angiolillo DJ, Bernardo E, Ramirez C, Costa MA, Sabatè M, Jimenez-Quevedo P, et al. Insulin therapy is associated with platelet dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus on dual oral antiplatelet treatment. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48:298–304.
56. Garcia MJ, McNamara PM, Gordon T, Kannel WB. Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population. Sixteen year follow-up study. *Diabetes*. 1974;23:105–11.
57. Kleinman JC, Donahue RP, Harris MI, Finucane FF, Madans JH, Brock DB. Mortality among diabetics in a national sample. *Am J Epidemiol*. 1988;128:389–401.
58. Duckworth W, Abiraira C, Moritz T, Reda D, Emanuele N, Reaven PD, et al. Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2009;360:129–39.
59. Saito I, Folsom AR, Brancati FL, Duncan BB, Chambless LE, McGovern PG. Nontraditional risk factors for coronary heart disease incidence among persons with diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Ann Intern Med*. 2000;133:81–91.
60. Shichiri M, Kishikawa H, Ohkubo Y, Wake N. Long-term results of the Kumamoto Study on optimal diabetes control in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2000;23 Suppl 2:B21–9.
61. Monnier L, Colette C, Mas E, Michel F, Cristol JP, Boegner C, et al. Regulation of oxidative stress by glycaemic control: evidence for an independent inhibitory effect of insulin therapy. *Diabetologia*. 2009;53:562–71.
62. Ceolotto G, Bevilacqua M, Papparella I, Baritono E, Franco L, Corvaja C, et al. Insulin generates free radicals by an NAD(P)H, phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent mechanism in human skin fibroblasts ex vivo. *Diabetes*. 2004;53:1344–51.
63. BARI 2D Study Group, Frye RL, August P, Brooks MM, Hardison RM, Kelsey SF, et al. A randomized trial of therapies for type 2 diabetes and coronary artery disease. *New Engl J Med*. 2009;360:2503–15.
64. Madonna R, De Caterina R. Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes—part I: pathways of vascular disease in diabetes. *Vascul Pharmacol*. 2011;54:68–74.
65. Madonna R, De Caterina R. Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes—part II: cellular mechanisms and therapeutic targets. *Vascul Pharmacol*. 2011;54:75–9.
66. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*. 1998;352:837–53.
67. Charbonnel B, Dormandy J, Erdmann E, Massi-Benedetti M, Skene A. The prospective pioglitazone clinical trial in macrovascular events (PROactive): can pioglitazone reduce cardiovascular events in diabetes? Study design and baseline characteristics of 5238 patients. *Diabetes Care*. 2004;27:1647–53.
68. Ray KK, Seshasai SR, Wijesuriya S, Sivakumaran R, Nethercott S, Preiss D, et al. Effect of intensive control of glucose on cardiovascular outcomes and death in patients with diabetes mellitus: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Lancet*. 2009;373:1765–72.
69. Skyler JS, Bergenstal R, Bonow RO, Buse J, Deedwania P, Gale EA, et al. Intensive glycaemic control and the prevention of cardiovascular events: implications of the ACCORD, ADVANCE, and VA diabetes trials: a position statement of the American Diabetes Association and a scientific statement of the American College of Cardiology Foundation and the American Heart Association. *Circulation*. 2009;119:351–7.
70. Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, et al. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med*. 2005;353:2643–53.