

La “memoria metabólica” inducida por la hiperglucemia: el nuevo reto en la prevención de la enfermedad cardiovascular en la diabetes

Antonio Ceriello

Centre of Excellence in Diabetes and Endocrinology. University Hospital of Coventry and Warwickshire. Warwick Medical School. University of Warwick. Coventry. Reino Unido.

En estudios aleatorizados amplios se ha establecido que un control intensivo temprano de la glucemia reduce el riesgo de complicaciones diabéticas, tanto microvasculares como macrovasculares. Sin embargo, los datos epidemiológicos y prospectivos respaldan la existencia de una influencia a largo plazo del control metabólico inicial sobre la evolución clínica posterior. A este fenómeno se le ha denominado recientemente “memoria metabólica”. Los posibles mecanismos para la propagación de esta “memoria” son la glicación no enzimática de proteínas y lípidos celulares, y el exceso de especies moleculares de nitrógeno y oxígeno reactivas celulares, en especial las originadas en las proteínas mitocondriales glicadas, que tal vez actúen de manera concertada entre sí para mantener las señales de estrés. Además, la aparición de esta “memoria metabólica” sugiere la necesidad de un tratamiento energético muy temprano destinado a “normalizar” el control metabólico y de la adición de fármacos que reduzcan las especies moleculares reactivas celulares y la glicación, además de normalizar las concentraciones de glucosa de los pacientes, para reducir al mínimo las complicaciones diabéticas a largo plazo.

Palabras clave: Memoria metabólica. Glicación no enzimática. Estrés oxidativo. Mitocondrias. Complicaciones diabéticas.

The Hyperglycemia-Induced “Metabolic Memory”: The New Challenge for the Prevention of CVD in Diabetes

Large randomized studies have established that early intensive glycaemic control reduces the risk of diabetic complications, both micro and macrovascular. However, epidemiological and prospective data support a long-term influence of early metabolic control on clinical outcomes. This phenomenon has recently been defined as “metabolic memory.” Potential mechanisms for propagating this “memory” are the non-enzymatic glycation of cellular proteins and lipids, and an excess of cellular reactive oxygen and nitrogen species, in particular originated at the level of glycated-mitochondrial proteins, perhaps acting in concert with one another to maintain stress signaling. Furthermore, the emergence of this “metabolic memory” suggests the need of a very early aggressive treatment aiming to “normalize” the metabolic control and the addition of agents which reduce cellular reactive species and glycation in addition to normalizing glucose levels in diabetic patients in order to minimize long-term diabetic complications.

Key words: Metabolic memory. Non-enzymatic glycation. Oxidative stress. Mitochondria. Diabetic complications.

INTRODUCCIÓN

La diabetes constituye un problema de salud pública grave y creciente que provoca una reducción de la esperanza de vida y un aumento de la morbilidad debida a las complicaciones específicas de la propia enfermedad. El dato que caracteriza a la diabetes es la hiper-

glucemia, un factor de estrés que puede controlarse clínicamente mediante la administración exógena de insulina o mediante fármacos que aumentan la secreción de insulina, reducen la liberación de glucosa procedente del hígado, aumentan el uso de glucosa en el músculo esquelético y la grasa, retrasan la absorción de la glucosa procedente de los alimentos y, en productos introducidos muy recientemente, actúan a través del sistema de la incretina¹. Estos avances, junto con la mejora de la monitorización de la glucosa y los mejores marcadores del control glucémico, han conducido a un control mucho más estricto de la hiperglucemia. A pesar de estos progresos terapéuticos, las com-

Correspondencia: Prof. A. Ceriello.
Warwick Medical School, Clinical Science Research Institute, Clinical Science Building, University Hospital–Walsgrave Campus, Clifford Bridge Road, Coventry CV2 2DX, Reino Unido.
Correo electrónico: antonio.ceriello@warwick.ac.uk

ABREVIATURAS

AGE: productos finales de glicación avanzada
 DCCT: *Diabetes Complications and Control Trial*
 ECA: enzima convertidora angiotensina
 ECV: enfermedad cardiovascular
 EDIC: *Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications*
 GPA: glucosa plasmática en ayunas
 iNOS: óxido nítrico sintasa inducible
 MGO: metilglioxal
 NO: óxido nítrico
 UKPDS: *United Kingdom Prospective Diabetes Study*
 3-NY: 3-nitrotirosina
 ($\bullet\text{O}_2^-$): anión superóxido

plicaciones vasculares debilitantes se continúan dando en la mayoría de los pacientes diabéticos.

En el *Diabetes Complications and Control Trial* (DCCT), se aplicó a pacientes con diabetes tipo 1 un pauta de tratamiento estándar o de tratamiento intensivo para normalizar sus valores de glucemia. Dada la intensa reducción de la progresión de las complicaciones microvasculares observada en los pacientes con un control estricto de la glucosa, el DCCT se dio por finalizado tras una media de 6,5 años y todos los pacientes pasaron a recibir el tratamiento intensivo². Es de destacar que, en el ensayo *Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications* (EDIC), un estudio de seguimiento del DCCT, los pacientes que habían recibido la pauta de tratamiento estándar durante el DCCT continuaban presentando una incidencia de complicaciones superior a la de los pacientes que habían recibido un tratamiento intensivo durante todo el ensayo, varios años después de haber pasado al tratamiento intensivo^{3,4}. Además, los datos recientes del EDIC sugieren también que la influencia del control glucémico temprano sobre la progresión hasta presentar episodios macrovasculares puede hacerse más evidente con un seguimiento más prolongado^{5,6}.

Los datos del *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS) parecen coincidir con ello. Concretamente, los individuos que presentaban valores de glucosa plasmática en ayunas (GPA) más bajos en el momento del diagnóstico sufrieron menos complicaciones vasculares y menos resultados clínicos adversos a lo largo del tiempo que los individuos con valores de GPA más altos, a pesar de tener índices de aumento de la glucemia similares⁷, lo cual sugiere que el control metabólico temprano ejerce unos efectos beneficiosos mantenidos incluso en la diabetes tipo 2.

El conjunto de estas observaciones respalda el concepto de que el entorno glucémico inicial es recordado, y los autores del DCCT/EDIC se han referido a este fenómeno como una "memoria metabólica"⁶.

FUNDAMENTO MOLECULAR DE LA "MEMORIA METABÓLICA": POSIBLE VÍNCULO ENTRE EL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA GLICACIÓN NO ENZIMÁTICA

Papel del estrés oxidativo en las complicaciones diabéticas

Brownlee ha señalado recientemente la presencia de un exceso de aniones superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), una especie molecular reactiva, en las mitocondrias de las células endoteliales, en respuesta a la hiperglucemia, con la formación de complicaciones diabéticas⁸. Aun cuando el aumento de generación de $\bullet\text{O}_2^-$ en la hiperglucemia sea un proceso clave en la activación de otras vías que intervienen en la patogenia de las complicaciones diabéticas⁸, representa tan sólo un primer paso en la producción del estrés oxidativo celular global y la consiguiente lesión vascular a que éste conduce. La hiperglucemia favorece también, a través de la activación del NF- κB , un aumento de la expresión de NAD(P)H y de iNOS⁹, que sería de prever que provocara un exceso de NO y de $\bullet\text{O}_2^-$. Se cree que el NO contribuye a producir la disfunción endotelial de dos formas distintas. En primer lugar, el $\bullet\text{O}_2^-$ puede reaccionar también directamente con el NO, atenuándolo, con lo que se reduce la eficacia de un potente sistema vasodilatador derivado del endotelio que participa en la homeostasis general de los vasos sanguíneos¹⁰, y la evidencia existente sugiere que durante la hiperglucemia se produce una disminución de la disponibilidad de NO¹¹. En segundo lugar, como se ha mencionado antes, la sobreproducción de $\bullet\text{O}_2^-$, cuando se acompaña de un aumento de la generación de NO, favorece la formación del oxidante potente ONOO \cdot , y se ha descrito una sobreproducción de $\bullet\text{O}_2^-$ y NO en respuesta a la hiperglucemia¹². Se ha comprobado que un aducto proteico estable, la 3-nitrotirosina (3-NY), es un marcador del ONOO \cdot ¹³ y del $\bullet\text{NO}_2$ ¹⁴ y que puede determinarse con facilidad mediante ELISA o *western blot*. La posibilidad de que la diabetes se asocie a un aumento de la formación de ONOO \cdot está respaldada por la reciente detección de un aumento de las concentraciones plasmáticas de nitrotirosina en los pacientes con diabetes tipo 2¹⁵. Hay varios elementos de evidencia que respaldan un papel directo de la hipoglucemia para favorecer este fenómeno. Se detecta la formación de 3-NY en la pared arterial de los monos durante la hiperglucemia¹⁶, en el plasma de individuos sanos durante un *clamp* hiperglucémico¹⁷ y en pacientes diabéticos durante un aumento de la hiperglucemia posprandial¹⁸. La hiperglucemia se acompaña también de un depósito de 3-NY en el corazón de rata perfundido en funcionamiento¹⁹, y es razonable pensar que esté relacionado con el desequilibrio en la producción de NO y $\bullet\text{O}_2^-$ a través de la sobreexpresión de iNOS¹⁹ y a través de los muchos orígenes de $\bullet\text{O}_2^-$ que se han descrito an-

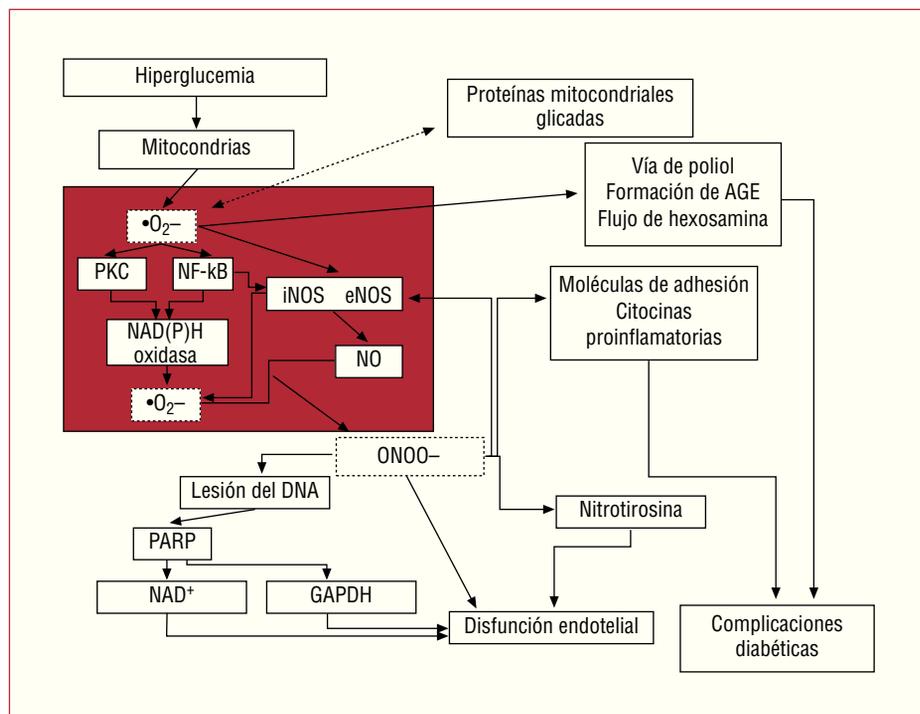


Fig. 1. La hiperglucemia intracelular induce una sobreproducción de superóxido a nivel mitocondrial. Esto constituye el primer proceso crucial en la activación de todas las demás vías que intervienen en la patogenia de las complicaciones diabéticas, como el flujo de la vía de poliol, el aumento de la formación de AGE, la activación de la proteína cinasa C y el NF-κB y el aumento del flujo en la vía de la hexosamina. Las proteínas mitocondriales sufren una glicación en la hiperglucemia y este efecto induce una superproducción de aniones superóxido en las mitocondrias. En este caso, a pesar de que la glucemia se reduzca o se normalice, las mitocondrias glicadas continúan sobreproduciendo superóxido, con lo que activan las mismas vías que intervienen en la generación de las complicaciones diabéticas. Esta hipótesis puede contribuir a explicar la aparición de la denominada "memoria metabólica".

tes. La formación de 3-NY se asocia también a la aparición de una disfunción endotelial tanto en los individuos sanos¹⁷ como en las coronarias de corazones de rata perfundidos¹⁹. Es interesante señalar que, en clínica, se ha observado que la 3-NY es un factor predictivo independiente para la enfermedad vascular²⁰. Todas las vías que se han descrito se resumen en la figura 1.

De los datos presentados parece deducirse claramente que tanto el estrés oxidativo como el nitrosactivo desempeñan un papel clave en el desarrollo de las complicaciones diabéticas, tanto microvasculares como macrovasculares. Sin embargo, si el exceso de especies moleculares reactivas desempeña un papel central en el desarrollo de las complicaciones diabéticas relacionadas con la hiperglucemia, ¿podría explicar dicho exceso la persistencia del riesgo de complicaciones aun cuando se haya reducido o normalizado la hiperglucemia?

Hace varios años hubo una descripción preliminar de una "memoria hiperglucémica" para una hiperproducción de fibronectina y colágeno en las células endoteliales, que persistía tras la normalización de la glucosa²¹. Utilizando el mismo diseño, 14 días de cultivo con glucosa elevada, seguidos de 7 días de cultivo con glucosa normal, los datos preliminares indican que, en las células endoteliales, persiste una sobreproducción de radicales libres tras la normalización de la glucosa, y que ello se acompaña de una prolongación de la inducción de PKC-β, NAD(P)H oxidasa, Bax, colágeno y fibronectina, además de 3-NY²², lo cual su-

giere que el estrés oxidativo puede intervenir en el efecto de "memoria metabólica".

Glicación de proteínas mitocondriales, estrés oxidativo y "memoria metabólica"

Se ha sugerido la sobreproducción mitocondrial de $\bullet\text{O}_2^-$ en la hiperglucemia como "hipótesis unificadora" para explicar el desarrollo de complicaciones diabéticas⁸. Parece razonable pensar, pues, que las mitocondrias desempeñan también un papel importante en la propagación de la "memoria metabólica".

Se cree que la hiperglucemia crónica altera la función mitocondrial a través de la glicación de las proteínas mitocondriales²³. Las concentraciones de metilglioxal (MGO), un producto α -dicarbonilo derivado de la glucólisis que es altamente reactivo, están aumentadas en la diabetes²⁴. El MGO reacciona con facilidad con la arginina, la lisina y los grupos sulfhidrilo de las proteínas²⁵, además de los ácidos nucleicos²⁶, induciendo la formación de diversos AGE estructuralmente identificados, tanto en las células diana como en el plasma²⁷. El MGO tiene un efecto inhibitorio sobre la respiración mitocondrial, y las modificaciones inducidas por el MGO tienen efectos específicos en determinadas proteínas mitocondriales²⁸. Estas premisas son importantes puesto que un estudio reciente ha descrito, por primera vez, una relación directa entre la formación de AGE intracelulares a partir de las proteínas mitocondriales, la disminución de la función mitocondrial y el exceso de formación de especies moleculares

reactivas²⁹. Así pues, las proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial que sufrían una glicación eran propensas a producir más $\bullet\text{O}_2^-$, independientemente del grado de hiperglucemia existente.

La formación de AGE es un fenómeno prolongado. En el DCCT, se examinó la formación de AGE en 215 pacientes a los que se practicó una biopsia cutánea 1 año antes del cierre del ensayo³⁰. En comparación con el tratamiento convencional, el tratamiento intensivo se asoció a unas concentraciones de AGE significativamente inferiores. La aparición de retinopatía, nefropatía y neuropatía³⁰ presentó una asociación significativa con los valores de AGE, y en el EDIC se ha observado que el aumento de las concentraciones de AGE en la piel se asocia de manera significativa a las complicaciones microvasculares³¹. Además, parece razonable pensar que los AGE puedan explicar también los resultados que indican un aumento de la incidencia de complicaciones cardiovasculares en el EDIC⁶, teniendo en cuenta que se ha observado una asociación de los AGE con la ECV incluso en las mujeres no diabéticas³².

Lo realmente importante es la evidencia clínica que indica que la inclinación de las proteínas, y en especial del colágeno, a la glicación es *independiente* de la concentración de glucosa existente en ese momento²⁷. Se ha propuesto también que la glicación del colágeno extracelular puede ser un marcador de la glicación de proteínas intracelulares y un factor predictivo de la lesión de órganos diana²⁷. Aunque la HbA1c glicada puede ser desglucada en parte enzimáticamente³³, no se ha observado todavía una reacción de este tipo para los AGE incorporados al colágeno. Así pues, parece que la formación de AGE de colágeno es un fenómeno irreversible.

En resumen, la glicación de las proteínas mitocondriales puede formar parte de la explicación del fenómeno de la "memoria metabólica". En las mitocondrias glicadas hay una sobreproducción de radicales libres, independientemente de la glucemia real, que mantiene la activación de las vías involucradas en la patogenia de las complicaciones diabéticas. En otras palabras, puede plantearse la hipótesis de que en la "memoria metabólica" la cascada de procesos sea la misma que la propuesta por Brownlee⁸ —el origen del $\bullet\text{O}_2^-$ continúan siendo las mitocondrias— pero que, además, la producción de especies moleculares reactivas no está relacionada con la presencia de hiperglucemia y depende del nivel de glicación de las proteínas mitocondriales. Esta hipótesis se describe en la figura 1.

"MEMORIA METABÓLICA" Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL: TRASCENDENCIA PARA EL RIESGO CARDIOVASCULAR EN LA DIABETES

La diabetes mellitus se asocia a un aumento de la incidencia de enfermedades macrovasculares. La enfer-

medad macrovascular acelerada se debe en parte a un aumento de la incidencia de los factores de riesgo clásicos, como hipertensión y dislipidemia³⁴. Sin embargo, la evidencia reciente sugiere que la hiperglucemia desempeña también un papel importante⁶.

El endotelio es un órgano importante en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular incluso en la diabetes³⁵. Todos los factores de riesgo que intervienen en la patogenia de la enfermedad cardiovascular, como la dislipidemia y la hipertensión, pueden inducir una disfunción endotelial, y se ha puesto claramente de manifiesto que ésta predice un futuro episodio cardiovascular³⁵.

La presencia de una disfunción endotelial se ha descrito a menudo en la diabetes³⁵. Sin embargo, aunque diversos estudios han puesto de manifiesto que la hiperglucemia induce una disfunción endotelial tanto en individuos diabéticos como en no diabéticos^{36,37}, no disponemos todavía de una demostración clara de que el control de la hipertensión permita restablecer/normlizar la función endotelial. Concretamente, en pacientes con diabetes tipo 1, se ha descrito que la disfunción endotelial aparece a pesar de que se alcance una normoglucemia^{38,39}. Además, hay varios estudios que indican que la hiperglucemia induce una disfunción endotelial a través de la generación de un estrés oxidativo, que se ha sugerido que es un factor clave en la generación de las complicaciones diabéticas, tanto microvasculares como macrovasculares⁸.

En un reciente estudio, se incluyó a 36 pacientes con diabetes tipo 1 y 12 individuos de control. Se dividió a los pacientes diabéticos en tres grupos⁴⁰. El primero de ellos fue tratado durante 24 h con insulina, y alcanzó una casi-normalización de la glucemia. A las 12 h de este tratamiento, se añadió vitamina C durante las 12 h restantes. El segundo grupo fue tratado durante 24 h con vitamina C. A las 12 h de este tratamiento se inició la administración de insulina, y se alcanzó una casi-normalización de la glucemia durante las 12 h restantes. El tercer grupo fue tratado durante 24 h con vitamina C e insulina, y alcanzó una casi-normalización de la glucemia. Ni la normalización de la glucemia ni el tratamiento con vitamina C sola lograron normalizar la disfunción endotelial o el estrés oxidativo. La combinación de insulina y vitamina C normalizó la disfunción endotelial y redujo el estrés oxidativo hasta valores normales. Este estudio sugiere que la hiperglucemia de larga duración en los pacientes con diabetes tipo 1 induce alteraciones permanentes en las células endoteliales, que pueden contribuir a producir una disfunción endotelial mediante el aumento del estrés oxidativo a pesar de que la hiperglucemia se haya normalizado⁴⁰. Los resultados de este estudio se muestran en la figura 2.

La observación de que tan sólo el control simultáneo de la glucemia y del estrés oxidativo permite normalizar la función endotelial en los pacientes con diabetes tipo 1 tiene una clara trascendencia. La evidencia

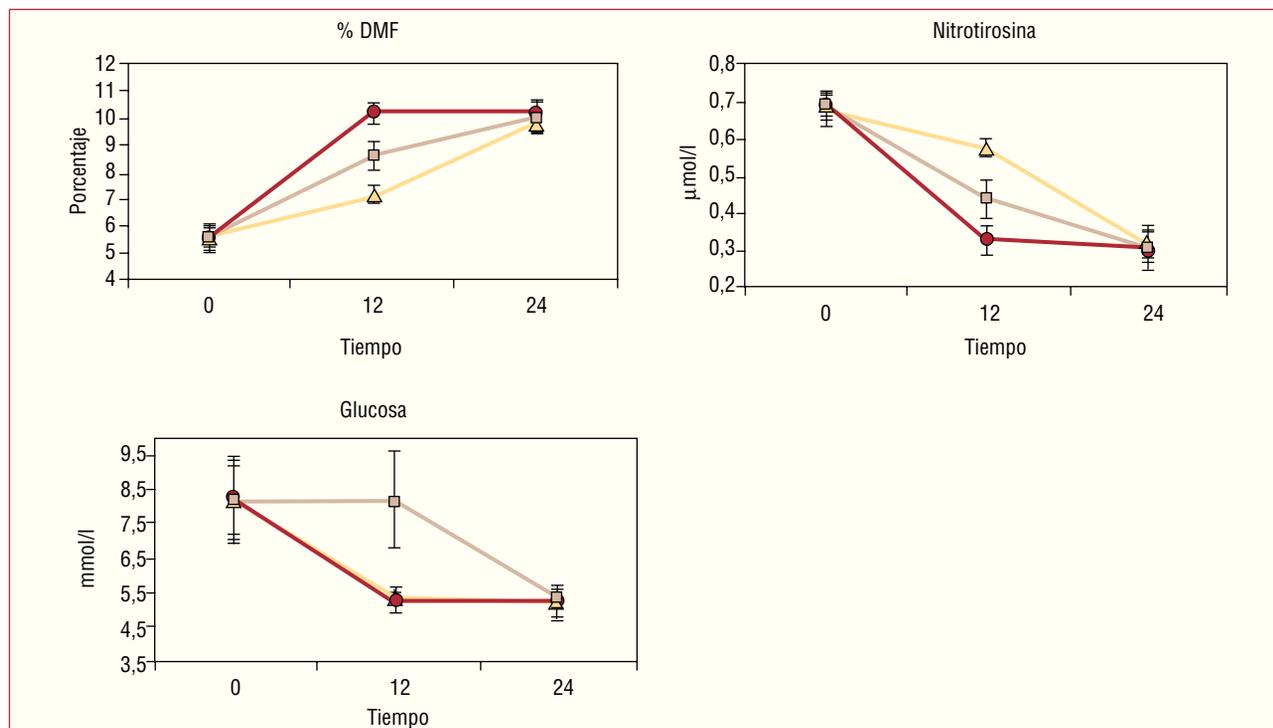


Fig. 2. Glucemia, dilatación mediada por el flujo (DMF) y concentraciones plasmáticas de nitrotirosina en pacientes con diabetes tipo 1 tratados con: ● Insulina y Vit. C 24 h; ■ Vit. C 24 h + Insulina 12 h; ▲ Insulina 24 h + Vit. C 12 h. Tomado de la referencia 40

existente parece sugerir la existencia de 2 vías diferentes que intervienen en la generación de la disfunción endotelial en la diabetes tipo 1: una directamente relacionada con la hiperglucemia y otra que no lo está. Una posible explicación de estas observaciones es que las 2 vías actúen de manera simultánea: una como consecuencia del nivel de glucemia que genere radicales libres durante la utilización de la glucosa en las mitocondrias, y otra por el daño permanente inducido en las células endoteliales por la hiperglucemia crónica, posiblemente a través de la glicación no enzimática de las mitocondrias.

CONSECUENCIAS TERAPÉUTICAS Y PERSPECTIVAS

La evidencia que está surgiendo y que indica que la hiperglucemia deja una importante impronta en el desarrollo de futuras complicaciones tiene notables consecuencias terapéuticas: parece obligado iniciar en los pacientes diabéticos un tratamiento enérgico temprano de la hiperglucemia que presentan. Sin embargo, aunque esta estrategia puede ser más fácilmente aceptada en los pacientes con diabetes tipo 1, puede plantearse una cierta preocupación en los pacientes de tipo 2, porque este enfoque terapéutico puede incluir un uso temprano de insulina. Además, un control estricto de la hiperglucemia puede tener que incluir también el tratamiento de la hiperglucemia "posprandial"^{41,42}, no

sólo porque la hiperglucemia posprandial contribuya de manera importante a producir la HbA1c, tanto en la diabetes tipo 1 como en la tipo 2^{43,44}, sino también porque la hiperglucemia posprandial se acompaña de la formación específica tanto de especies moleculares reactivas⁴⁵ como de AGE no sólo en el plasma⁴⁶, sino también intracelularmente⁴⁷.

Otra posible estrategia consiste en reducir la formación de AGE y la generación de estrés oxidativo concomitante con normalizaciones de la glucosa. Con varios compuestos se ha demostrado ya la capacidad de bloquear la formación de AGE. In vitro, se ha comprobado que metformina y pioglitazona previenen la formación de AGE⁴⁸. Los inhibidores de la ECA y los antagonistas de receptores AT-1 son compuestos que se emplean en el control de la presión arterial; sin embargo, también son capaces de reducir la formación de AGE⁴⁹. Es interesante señalar que estos fármacos actúan también como antioxidantes⁵⁰ y, al menos por lo que se refiere a los antagonistas de AT-1, hay datos que indican la presencia de una acción específica frente al estrés oxidativo inducido por la hiperglucemia⁵¹. Por último, las estatinas podrían aportar también un efecto beneficioso para reducir las especies moleculares reactivas⁵¹. Combinando todos estos datos, cabría prever una futura estrategia basada en el uso de compuestos activos sobre la formación de AGE⁵², junto con otro compuesto capaz de actuar específicamente sobre la generación de especies moleculares reactivas mitocondriales⁵³.

CONCLUSIONES

Los nuevos datos que están apareciendo sugieren de manera uniforme que la hiperglucemia puede dejar una importante impronta en las células de los vasos sanguíneos y los órganos diana, que favorezca la futura aparición de complicaciones. Además, la evidencia existente sugiere que esta "memoria" puede aparecer a pesar de que se alcance un buen control de la glucemia. A este fenómeno se le ha denominado "memoria metabólica"⁶. Sin embargo, la memoria metabólica parece ser un fenómeno más común y no solamente relacionado con la hiperglucemia. Considerados conjuntamente, estos datos plantean muchas preguntas relativas al manejo terapéutico de la diabetes. Concretamente, dado que se ha demostrado ya que una intervención multifactorial enérgica reduce el riesgo de complicaciones tanto microangiopáticas como macroangiopáticas de la diabetes⁵⁴, la existencia de la memoria metabólica sugiere que parece ser obligado un tratamiento enérgico muy temprano de los diversos factores de riesgo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Drugs for diabetes. In: Treatment Guidelines from the Medical Letter, 2005, p. 57-62
2. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1993;329:977-86.
3. Writing Team for the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. Effect of intensive therapy on the microvascular complications of type 1 diabetes mellitus. *JAMA.* 2004;287:2563-9.
4. Writing Team for the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. Sustained effect of intensive treatment of type 1 diabetes mellitus on development and progression of diabetic nephropathy: the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) study. *JAMA.* 2003;290:2159-67
5. Nathan DM, Lachin J, Cleary P, Orchard T, Brillon DJ, Backlund JY, et al. Diabetes Control and Complications Trial; Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. Intensive diabetes therapy and carotid intima-media thickness in type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 2003;348:2294-303.
6. Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, et al. Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study Research Group. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med.* 2005;353:2643-53.
7. Colagiuri S, Cull CA, Holman RR; UKPDS Group. Are lower fasting plasma glucose levels at diagnosis of type 2 diabetes associated with improved outcomes?: U.K. prospective diabetes study 61. *Diabetes Care.* 2002;25:1410-7.
8. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001;414:813-20.
9. Spitaler MM, Graier WF. Vascular targets of redox signalling in diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2002;45:476-94.
10. Benz D, Cadet P, Mantione K, Zhu W, Stefano GB. Total nitric oxide and health—a free radical and scavenger of free radicals. *Med Sci Monit.* 2002;8:RA1-4.
11. Giugliano D, Marfella R, Coppola L, Verrazzo G, Acampora R, Giunta R, et al. Vascular effects of acute hyperglycemia in humans are reversed by L-arginine. Evidence for reduced availability of nitric oxide during hyperglycemia. *Circulation.* 1997;95:1783-90.
12. Cosentino F, Hishikawa K, Katusic ZS, Lüscher TF. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation.* 1997;96:25-8.
13. Ischiropoulos H. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys.* 1998;356:1-11.
14. Prutz WA, Monig H, Butler J, Land EJ. Reactions of nitrogen dioxide in aqueous model systems: oxidation of tyrosine units in peptides and proteins. *Arch Biochem Biophys.* 1985;243:125-34.
15. Ceriello A, Mercuri F, Quagliaro L, Assaloni R, Motz E, Tonutti L, et al. Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: evidence of oxidative stress. *Diabetologia.* 2001;44:834-8.
16. Pennathur S, Wagner JD, Leeuwenburgh C, Litwak C, Heinecke JW. A hydroxyl radical-like species oxidizes cynomolgus monkey artery wall proteins in early diabetic vascular disease. *J Clin Invest.* 2001;107:853-60.
17. Marfella R, Quagliaro L, Nappo F, Ceriello A, Giugliano D. Acute hyperglycemia induces an oxidative stress in healthy subjects [letter]. *J Clin Invest.* 2001;108:635-6.
18. Ceriello A, Quagliaro L, Catone B, Pascon R, Piazzola M, Bais B, et al. The role of hyperglycemia in nitrotyrosine postprandial generation. *Diabetes Care.* 2002;25:1439-43.
19. Ceriello A, Quagliaro L, D'Amico M, Di Filippo C, Martella R, Nappo F, et al. Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat. *Diabetes.* 2002;51:1076-82.
20. Shishebor MH, Aviles RJ, Brennan ML, Fu X, Goormastic M, Pearce GL, et al. Association of nitrotyrosine levels with cardiovascular disease and modulation by statin therapy. *JAMA.* 2003;289:1675-80.
21. Roy S, Sala R, Cagliero E, Lorenzi M. Overexpression of fibronectin induced by diabetes or high glucose: phenomenon with a memory. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87:404-8.
22. Ceriello A, Ihnat M, Ross K, Sismey A, Green DW, Kaltreider RC, et al. Evidence for a cellular "memory" of hyperglycemic stress. *Diabetes.* 2005;54:218A.
23. Kang Y, Edwards LG, Thornalley PJ. Effect of methylglyoxal on human leukaemia 60 cell growth: modification of DNA G1 growth arrest and induction of apoptosis. *Leuk Res.* 1996;20:397-405.
24. Beisswenger PJ, Howell SK, Nelson RG, Mauer M, Szewgold BS. Alpha-oxoaldehyde metabolism and diabetic complications. *Biochem Soc Trans.* 2003;31:1358-63.
25. Lo TW, Westwood ME, McLellan AC, Selwood T, Thornalley PJ. Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N alpha-acetylarginine, N alpha-acetylcysteine, and N alpha-acetyllysine, and bovine serum albumin. *J Biol Chem.* 1994;269:32299-305.
26. Papoulis A, al-Abed Y, Bucala R. Identification of N2-(1-carboxyethyl)guanine (CEG) as a guanine advanced glycosylation end product. *Biochemistry.* 1995;34:648-55.
27. Thornalley PJ, Battah S, Ahmed N, Karachalias N, Agalou S, Babei-Jadidi R, et al. Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem J.* 2003;375:581-92.
28. Rosca MG, Monnier VM, Szewda LI, Weiss MF. Alterations in renal mitochondrial respiration in response to the reactive oxoaldehyde methylglyoxal. *Am J Physiol.* 2002;283:F52-F9.
29. Rosca MG, Mustata TG, Kinter MT, Ozdemir AM, Kern TS, Szewda LI, et al. Glycation of mitochondrial proteins from diabetic

- rat kidney is associated with excess superoxide formation. *Am J Physiol.* 2005;289:F420-F30.
30. Monnier VM, Bautista O, Kenny D, Sell DR, Fogarty J, Dahms W, et al. Skin collagen glycation, glycooxidation, and crosslinking are lower in subjects with long-term intensive versus conventional therapy of type 1 diabetes: relevance of glycated collagen products versus HbA1c as markers of diabetic complications. DCCT Skin Collagen Ancillary Study Group. *Diabetes Control and Complications Trial.* *Diabetes.* 1999;48:870-80.
 31. Genuth S, Sun W, Cleary P, Sell DR, Dahms W, Malone J, et al. DCCT Skin Collagen Ancillary Study Group. Glycation and carboxymethyllysine levels in skin collagen predict the risk of future 10-year progression of diabetic retinopathy and nephropathy in the diabetes control and complications trial and epidemiology of diabetes interventions and complications participants with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2005;54:3103-11.
 32. Kilhovd BK, Juutilainen A, Lehto S, Ronnema T, Torjesen PA, Birkeland KI, et al. High serum levels of advanced glycation end products predict increased coronary heart disease mortality in nondiabetic women but not in nondiabetic men: a population-based 18-year follow-up study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:815-20.
 33. Wu X, Monnier VM. Enzymatic deglycation of proteins. *Arch Biochem Biophys.* 2003;419:16-24.
 34. Schwab KO, Doerfer J, Hecker W, Grulich-Henn J, Wiemann D, Kordonouri O, et al. DPV Initiative of the German Working Group for Pediatric Diabetology. Spectrum and prevalence of atherogenic risk factors in 27,358 children, adolescents, and young adults with type 1 diabetes: cross-sectional data from the German diabetes documentation and quality management system (DPV). *Diabetes Care.* 2006;29:218-25.
 35. Esper RJ, Nordaby RA, Vilarino JO, Paragano A, Cacharrón JL, Machado RA, et al. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol.* 2006;5:4.
 36. Ceriello A, Taboga C, Tonutti L, Quagliaro L, Piconi L, Bais B, et al. Evidence for an independent and cumulative effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on endothelial dysfunction and oxidative stress generation: effects of short- and long-term simvastatin treatment. *Circulation.* 2002;106:1211-8.
 37. Sorensen VR, Mathiesen ER, Clausen P, Flyvbjerg A, Feldt-Rasmussen B. Impaired vascular function during short-term poor glycaemic control in type 1 diabetic patients. *Diabet Med.* 2005;22:871-6.
 38. Huvers FC, De Leeuw PW, Houben AJ, et al. Endothelium-dependent vasodilatation, plasma markers of endothelial function, and adrenergic vasoconstrictor responses in type 1 diabetes under near-normoglycemic conditions. *Diabetes.* 1999;48:1300-7.
 39. Dogra G, Rich L, Stanton K, Watts GF. Endothelium-dependent and independent vasodilation studies at normoglycaemia in type 1 diabetes mellitus with and without microalbuminuria. *Diabetologia.* 2001;44:593-601.
 40. Ceriello A, Kumar S, Piconi L, Esposito K, Giugliano D. Simultaneous control of hyperglycemia and oxidative stress normalizes endothelial function in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2007;30:649-54.
 41. Ceriello A, Hanefeld M, Leiter L, Monnier L, Moses A, Owens D, et al. Postprandial glucose regulation and diabetic complications. *Arch Intern Med.* 2004;164:2090-5.
 42. Ceriello A. Postprandial hyperglycemia and diabetes complications: is it time to treat? *Diabetes.* 2005;54:1-7.
 43. Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, Little RR, England JD, Tennill A, Goldstein DE. Defining the relationship between plasma glucose and HbA1c: analysis of glucose profiles and HbA1c in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care.* 2002;25:275-8.
 44. Monnier L, Lapinski H, Colette C. Contributions of fasting and postprandial plasma glucose increments to the overall diurnal hyperglycemia of type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2003;26:881-5.
 45. Ceriello A, Quagliaro L, Piconi L, Assaloni R, da Ros R, Maier A, et al. Effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on circulating adhesion molecules and oxidative stress generation and the possible role of simvastatin treatment. *Diabetes.* 2004;53:701-10.
 46. Ahmed N, Babaei-Jadidi R, Howell SK, Thornalley PJ, Beisswenger PJ. Glycated and oxidized protein degradation products are indicators of fasting and postprandial hyperglycemia in diabetes. *Diabetes Care.* 2005;28:2465-2471.
 47. Schiekofe S, Andrassy M, Chen J, Rudofsky G, Schneider J, Wendt T, et al. Acute hyperglycemia causes intracellular formation of CML and activation of ras, p42/44 MAPK, and nuclear factor kappaB in PBMCs. *Diabetes.* 2003;52:621-33.
 48. Rahbar S, Natarajan R, Yerneni K, Scott S, Gonzales N, Nadler JL. Evidence that pioglitazone, metformin and pentoxifylline are inhibitors of glycation. *Clin Chim Acta.* 2000;301:65-77.
 49. Miyata T, van Ypersele DS, Ueda Y, Ichimori K, Inagi R, Onogi H, et al. Angiotensin II receptor antagonists and angiotensin-converting enzyme inhibitors lower in vitro the formation of advanced glycation end products: biochemical mechanisms. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:2478-87.
 50. Ceriello A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy. *Diabetes Care.* 2003;26:1589-96.
 51. Ceriello A, Assaloni R, da Ros R, Maier A, Piconi L, Quagliaro L, et al. Effect of atorvastatin and irbesartan, alone and in combination, on postprandial endothelial dysfunction, oxidative stress, and inflammation in type 2 diabetic patients. *Circulation.* 2005;111:2518-24.
 52. Lapolla A, Traldi P, Fedele D. Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. *Clin Biochem.* 2005;38:103-15.
 53. Sheu SS, Nauduri D, Anders MW. Targeting antioxidants to mitochondria: a new therapeutic direction. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1762:256-65.
 54. Gaede P, Vedel P, Larsen N, Jensen GV, Parving HH, Pedersen O. Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2003;348:383-93.